

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química

Igor Forattini Prates Carvalhais Noronha

**DETERMINAÇÃO DE EDULCORANTES E CONSTITUINTES  
INORGÂNICOS EM ADOÇANTES DE MESA**

Belo Horizonte

2019

UFMG/ ICEx/ DQ. 1.324<sup>a</sup>

D. 722<sup>a</sup>

Igor Forattini Prates Carvalhais Noronha

**DETERMINAÇÃO DE EDULCORANTES E CONSTITUINTES  
INORGÂNICOS EM ADOÇANTES DE MESA**

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Química do Instituto  
de Ciências Exatas da Universidade  
Federal de Minas Gerais, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
Mestre em Química – Química Analítica

Belo Horizonte

2019

Ficha Catalográfica

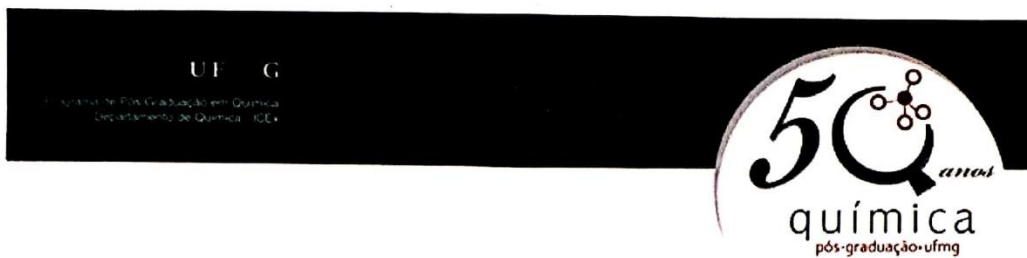
N852d Noronha, Igor Forattini Prates Carvalhais  
2019 D Determinação de edulcorantes e constituintes  
D inorgânicos em adoçantes de mesa [manuscrito] / Igor  
Forattini Prates Carvalhais Noronha. 2019.  
109 f. : il.

Orientadora: Clésia Cristina Nascentes.  
Coorientadora: Maria Beatriz de Abreu Glória.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais - Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses 2. Alimentos -  
Aditivos - Análise - Teses 3. Espectrometria de massa  
- Teses 4. Cromatografia líquida de alta eficiência -  
Teses 5. Alimentos - Adulteração e inspeção - Teses 8.  
Adoçantes artificiais - Teses I. Nascentes, Clésia  
Cristina, Orientadora II. Glória, Maria Beatriz de  
Abreu, Coorientadora III. Título.

CDU 043



**"Determinação de Edulcorantes e Constituintes Inorgânicos em Adoçantes de Mesa"**

**Ígor Forattini Prates Carvalhais Noronha**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Maria Beatriz de Abreu Glória - Coorientadora  
UFMG

Profa. Cláudia Carvalhinho Windmüller  
UFMG

Prof. Ricardo Mathias Orlando  
UFMG

Prof. Christian Fernandes  
UFMG

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, por todo apoio, força, paciência, serei eternamente grato. Sem vocês, jamais teria chegado até aqui, se sou o que sou hoje, foi por tudo o que fizeram e continuam fazendo por mim.

Aos amigos distantes, mas que estiveram presentes de coração, o meu muito obrigado.

Às prof. Clésia Cristina Nascentes e prof. Maria Beatriz de Abreu Glória, por terem se disponibilizado a me orientar e por toda ajuda, colaboração, paciência e confiança em mim depositada nesse período.

Aos colegas do grupo de pesquisa LEAQUAA, muito obrigado pela parceria e pela amizade, a qual pretendo levar para a vida toda, e ao LBqA, pela parceria.

Aos professores da banca, agradeço pela disponibilidade e por toda contribuição a este trabalho.

Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG pela bolsa e demais investimentos neste projeto.

À UFMG e ao Departamento de Química, por me acolherem como membro desta grande equipe e possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

A crescente preocupação com os malefícios causados pelo elevado consumo de açúcar tem feito muitas pessoas aderirem aos adoçantes intensos não-nutritivos, cujos princípios ativos, os edulcorantes, apresentam elevado poder adoçante, porém com pouco ou nenhum valor calórico. Assim, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de métodos para análise dos principais edulcorantes intensos presentes em adoçantes de mesa, empregando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e também para a determinação de constituintes inorgânicos, utilizando espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). No método cromatográfico para quantificação de edulcorantes, os modelos lineares construídos foram significativos e sem desvios da linearidade ( $p = 5\%$ ). LDs e LQs foram da ordem de partes por trilhão (ppt), indicando uma boa sensibilidade do método. Os DPRs foram satisfatórios ( $< 7\%$ ), e os ensaios de recuperação ficando, no geral, entre 80-115%. Na determinação dos edulcorantes sacarina, ciclamato, aspartame, acesulfame-K, sucralose e dois glicosídeos de esteviol, 50 amostras tiveram suas composições determinadas e, quando comparadas com as informações presentes nos rótulos, cinco apresentaram discrepâncias. Em misturas de edulcorantes artificiais e naturais, notou-se que as quantidades de glicosídeos de esteviol são inferiores aos demais edulcorantes. A validação do método por ICP-MS se mostrou, de modo geral, satisfatória para os elementos analisados, com modelos lineares significativos, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) inferiores a 10 ppb, DPRs  $< 5\%$  e recuperação entre 90-115%, com exceção de uma matriz, a qual demonstrou um pequeno ganho de sinal. Nesta etapa, 22 amostras foram analisadas, porém poucos metais foram detectados em níveis significativos. Dentre os analisados, apenas Rb e Sr foram detectados em quase todas as amostras, níveis elevados de Al foram detectados em algumas e Cr excedeu o limite estabelecido pela legislação em duas delas.

**Palavras-chave:** aditivos alimentares; LC; ICP-MS; estévia; segurança alimentar

## ABSTRACT

### Determination of sweeteners and inorganic constituents in tabletop sweeteners

Due to worries about the consequences of high sugar consumption, the use of high intensity sweeteners has increased. Their active principles, also called sweeteners, are molecules with higher sweetening power than sucrose with a small amount or none caloric contribution. As so, this work aimed to develop methods to analyze sweeteners in commercial tabletop sweeteners by liquid chromatography coupled with mass spectrometer (LC-MS) and also to determine some inorganic compounds in this products by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). In the chromatographic method, linearity was evaluated, the proposed linear models were significant and no lack of adjustment were detected at a 5% level of significance. LDs and LQs were at parts *per trillion* (ppt) levels, showing a good method's sensibility. The RSDs were satisfactory (< 7%), and recovery were, in general, between 80-115%. Sodium saccharin, sodium cyclamate, aspartame, sucralose, acesulfame-K and two steviol glycosides, stevioside and rebaudioside A, were determined in 50 samples, and when compared with information on their labels, five presented discrepancies. In samples made with mixture of artificial and natural sweeteners, the amount of steviol glycosides was relatively small. The elemental analysis method validation was satisfactory, with significant linear models and low LDs and LQs (~10 ppb). RSDs were below 5% and the recovery was in a range of 80-115%, with one exception, in which the matrix may be affecting the analytes signal. 22 samples were analyzed, only Rb and Sr were found in most all the samples, Al was found in high levels in some of them, and Cr has exceed the legislation's established limit in two samples.

**Keywords:** food additives; LC; ICP-MS; stevia; food safety

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

ACN – acetonitrila

ACS – Acessulfame-K

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASP – Aspartame

CE – Energia de colisão (do inglês, *collision energy*)

CE – Eletroforese Capilar (do inglês, *Capillary Eletrophoresis*)

CIC – Ciclamato

CXP – Potencial de saída da célula de colisão (do inglês, *Collision cell exit potential*)

DAD – Detector por arranjo de diodos (do inglês, *diode array detector*)

DP – Potencial de *declustering* (do inglês, *declustering potential*)

DPR – Desvio padrão relativo

DT – *Dwell time*

EI – Ionização por elétrons (do inglês, *electron ionization*)

ESI – Ionização por *electrospray* (do inglês, *electrospray ionization*)

FDA – *Food and Drugs Administration*

FIA – Análise por Injeção em Fluxo (do inglês, *Flow Injection Analysis*)

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês, *Fourier-transform Infrared Spectroscopy*)

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (do inglês, *gas chromatography cupled with mass spectrometer*)

GFAAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (do inglês, *Graphite Furnace's Atomic Absortion Spectrometry*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*)

ICP-MS – Plasma Indutivamente Acoplado à Espectrometria de Massas (do inglês, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

ICP-OES – Plasma Indutivamente Acoplado á Espectrometria de Emissão Ótica (do inglês, *Inductively Copled Plasma at Optical Emission Spectrometry*)

IDA – Ingestão Diária Aceitável

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

JECFA - *Joint Expert Committee for Food Additives*

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (do inglês, *liquid chromatography coupled with mass spectrometer*)

LD – Limite de detecção

LMT – Limite Máximo de Tolerância

LQ – Limite de quantificação

MALDI – do inglês, *matrix-assisted laser desorption ionization*

MMQO – Método dos mínimos quadrados ordinários

MRM – Monitoramento de reações múltiplas (do inglês, *multiple reaction monitoring*)

NCI – Instituto Nacional do Câncer (do inglês, *National Cancer Institute*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

QqQ – Triplo quadrupolo

RBD – Rebaudiosídeo A

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RP-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (do inglês, *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*)

SAC – Sacarina

SIM – do inglês, *selected ion monitoring*

SPE – Extração em Fase Sólida (do inglês, *Solid Phase Extraction*)

STV – Esteviosídeo

SUC – Sucralose

SVS/MS – Secretaria de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde

TEA – Trietilamônio

THF – Tetrahidrofurano

TOF – Analisador por tempo de voo (do inglês, *time of flight analyzer*)

UV – Ultravioleta

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Poder adoçante e Ingestão Diária Aceitável (IDA) (por kg de peso corporal) dos principais edulcorantes utilizados no Brasil, segundo estabelecido pelo Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) .....	20
<b>Tabela 2</b> - Estruturas e algumas informações dos principais edulcorantes artificiais. ....	21
<b>Tabela 3</b> - Estruturas e algumas informações dos principais extratos da <i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni), utilizados como edulcorantes naturais .....	29
<b>Tabela 4</b> - Limites máximos de tolerância determinados pelo Decreto nº 55.871 de 26 de março de 1965 para contaminantes inorgânicos em alimentos em geral .....	44
<b>Tabela 5</b> - Relação de amostras líquidas (nL) e sólidas (nS) de adoçantes de mesa utilizadas neste trabalho, os respectivos conteúdos em edulcorantes e demais componentes de acordo com o rótulo e país de procedência.....	53
<b>Tabela 5</b> - Relação de amostras líquidas (nL) e sólidas (nS) de adoçantes de mesa utilizadas neste trabalho, os respectivos conteúdos em edulcorantes e demais componentes de acordo com o rótulo e país de procedência.....	54
<b>Tabela 6</b> - Gradiente utilizado na separação cromatográfica de edulcorantes em adoçantes de mesa .....	55
<b>Tabela 7</b> - Transições de MRM e parâmetros instrumentais de análise utilizadas no MS-ESI-QqQ. A primeira transição corresponde ao par de quantificação e a segunda de confirmação, para cada analito.....	56
<b>Tabela 8</b> – Curvas analíticas utilizadas para cada edulcorante .....	58
<b>Tabela 9</b> - Condições instrumentais de análise do ICP-MS.....	60

<b>Tabela 10</b> - Transições utilizadas na espectrometria de massas para os edulcorantes artificiais. Para cada analito, a primeira transição corresponde à transição de quantificação e a segunda a transição de confirmação. ....	68
<b>Tabela 11</b> - Transições utilizadas na espectrometria de massas para os edulcorantes naturais. Para cada analito, a primeira transição corresponde à transição de quantificação e a segunda a transição de confirmação. ....	69
<b>Tabela 12</b> - Conclusões obtidas a partir da análise de variância (ANOVA) feita para os modelos propostos para os edulcorantes.....	70
<b>Tabela 13</b> - Resultados obtidos para linearidade e limites de detecção e quantificação avaliadas durante validação de método cromatográfico para análise de edulcorantes em adoçantes de mesa. ....	70
<b>Tabela 14</b> - Resultados obtidos para repetitividade e veracidade, a partir do DPR e recuperação, respectivamente, durante validação de método cromatográfico para análise de edulcorantes em adoçantes de mesa .....	71
<b>Tabela 15</b> - Teores de edulcorantes em amostras líquidas de adoçantes de mesa .....	73
<b>Tabela 16</b> - Teores de edulcorantes em amostras sólidas de adoçantes de mesa .....	74
<b>Tabela 17</b> - Doses diárias para cada amostra com base nas IDAs estabelecidos pelo JECFA, considerando um indivíduo de 70kg. Para as amostras líquidas, tem-se número de gotas e para as sólidas, número de sachês/ comprimidos .	75
<b>Tabela 18</b> - Teor de edulcorantes nas doses recomendadas pelos fabricantes das amostras líquidas de adoçantes de mesa e o respectivo poder adoçante	76
<b>Tabela 19</b> - Quantidade de edulcorantes por dose recomendada pelos fabricantes e poder adoçante de amostras sólidas de adoçantes de mesa .....	77
<b>Tabela 20</b> - Composição informada no rótulo (INF) e a determinada experimentalmente (EXP) das amostras em questão. Nenhuma destas	

apresentou os edulcorantes ACS, STV e RBD em sua respectiva composição ..... 85

**Tabela 21** - Conclusões relacionadas à linearidade dos modelos construídos para os analitos a partir do MMQO, após Análise de Variância (ANOVA) ..... 87

**Tabela 22** - Equação das curvas de calibração com os respectivos coeficientes de determinação, seguidos dos LDs e LQs para os elementos analisados ..... 88

**Tabela 23** - Resultados das figuras de mérito para estudo da repetitividade e veracidade, na validação de metodologia de análise de componentes inorgânicos em adoçantes de mesa por ICP-MS ..... 88

**Tabela 24** - Concentrações de elementos inorgânicos em algumas amostras sólidas e líquidas de adoçantes de mesa..... 93

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Número de publicações por ano envolvendo o termo "natural sweeteners" nos últimos 20 anos.....	27
<b>Figura 2</b> - Relação entre o número de publicações e a técnica utilizada para análise de diversos edulcorantes .....	34
<b>Figura 3</b> - Etapas esquematizadas em uma técnica de HPLC. HPLC solvent: solvente; HPLC pump: bomba; Injector: injetor; Sample: amostra; HPLC column: coluna; Detector: detector; Waste: resíduos; Data acquisition: processador de dados .....	35
<b>Figura 4</b> - Esquema de um espectrômetro de massas .....	37
<b>Figura 5</b> - Esquema de uma fonte de ESI de um instrumento da AB SCIEX® modelo 5500.....	38
<b>Figura 6</b> - Representação de uma configuração QqQ.....	41
<b>Figura 7</b> - Figura representativa de uma migração de íons quando incididos por um campo elétrico .....	46
<b>Figura 8</b> - Modelo esquemático da rotação de dipolo, mostrando (a) o alinhamento das moléculas na presença de um campo eletromagnético (b) a desordem exotermicamente reestabelecida na ausência desse.....	47
<b>Figura 9</b> - Esquema de um gerador de plasma .....	49
<b>Figura 10</b> - Esquema representativo de um ICP-MS, ilustrando suas partes principais: (1) amostra em solução; (2) bomba; (3) nebulizador; (4) câmara de spray; (5) entrada de Ar para o plasma e refrigeração; (6) bobinas de indução/tocha; (7) cone de amostragem; (8) skimmer; (9) lentes focalizadoras; (10) analisador de massas tipo quadrupolo; (11) detector tipo multiplicador de elétrons; (12) coletor de dados.....	50

<b>Figura 11</b> - Programa de aquecimento utilizado no forno micro-ondas para do preparo de amostras precedente à análise por ICP-MS .....	61
<b>Figura 12</b> - Fragmento de $m/z = 146$ utilizado na transição de confirmação do aspartame .....	65
<b>Figura 13</b> - Estrutura comum aos glicosídeos de esteviol. A depender dos grupos R1 e R2, tem-se um glicosídeo diferente .....	66
<b>Figura 14</b> - Cromatograma de uma solução padrão de edulcorantes obtido a partir de técnica de HPLC-ESI-MS/MS .....	67
<b>Figura 15</b> - Cromatograma obtido para a amostra 1L e a seleção referente aos edulcorantes ACS, SAC e CIC .....	80
<b>Figura 16</b> - Cromatograma obtido para a amostra 32S e a seleção referente ao edulcorante ACS .....	80
<b>Figura 17</b> - Cromatograma obtido para a amostra 6L e a seleção referente ao edulcorante ACS .....	81
<b>Figura 18</b> - Cromatograma obtido para a amostra 9L e a seleção referente ao edulcorante ACS .....	81
<b>Figura 19</b> - Cromatograma obtido para a amostra 30S, em que se nota a presença do aspartame (ASP), porém não se nota a presença de ciclamato (CIC) quando se analisa o cromatograma referente à sua transição MRM. ....	82
<b>Figura 20</b> - Representação em gráfico de pizza das amostras 3L, 4L e 5L, na qual se compara as proporções de edulcorantes naturais e artificiais, pela composição global do adoçante. ....	84
<b>Figura 21</b> - Concentração de Rb nas amostras de adoçantes de mesa analisadas. ....	94

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	17
2.1 CONSUMO DE AÇÚCARES E EDULCORANTES NO BRASIL E NO MUNDO .....	17
2.2 EDULCORANTES .....	18
2.2.1 <i>Edulcorantes artificiais</i> .....	20
2.2.2 <i>Edulcorantes Naturais</i> .....	27
2.3 MÉTODOS DE ANÁLISE DE PRODUTOS COMERCIAIS.....	29
2.3.1 <i>Determinação de edulcorantes em adoçantes de mesa e outras matrizes alimentícias</i> .....	30
2.3.2 <i>Análise elementar em adoçantes de mesa</i> .....	43
3 OBJETIVOS .....	52
3.1 OBJETIVO GERAL.....	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1 AMOSTRAS.....	53
4.2 DETERMINAÇÃO DE EDULCORANTES EM ADOÇANTES DE MESA	54
4.2.1 <i>Instrumentação e Reagentes</i> .....	54
4.2.2 <i>Preparo das amostras</i> .....	56
4.2.3 <i>Validação do método cromatográfico</i> .....	57

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS EM ADOÇANTES DE MESA .....	59
4.3.1 Instrumentação e reagentes.....	59
4.3.2 Preparo das amostras .....	60
4.3.3 Validação .....	61
4.4 TRATAMENTO DOS DADOS.....	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1 DETERMINAÇÃO DE EDULCORANTES EM ADOÇANTES DE MESA.....	64
5.1.1 Detecção por espectrometria de massas: Modo MRM.....	64
5.1.2 Validação do método.....	70
5.1.3 Determinação dos teores de edulcorantes em adoçantes de mesa.....	72
5.1.4 Rótulos e Composição .....	78
5.2 ANÁLISE DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS EM ADOÇANTES DE MESA.....	87
5.2.1 Validação .....	87
5.2.2 Constituintes inorgânicos nas amostras de adoçantes de mesa.....	91
6 CONCLUSÃO.....	95
REFERÊNCIAS.....	97

# 1 INTRODUÇÃO

Açúcares e alimentos doces sempre estiveram na dieta do ser humano, sendo o mel provavelmente o mais antigo adoçante, utilizado pelos antigos egípcios, por volta de 2100 A.C. (EREJUWA, SULAIMAN, AB WAHAB, 2012). Apenas no século XVIII, com os avanços em tecnologia, a sacarose, extraída da cana-de-açúcar e da beterraba, passou a ser o principal agente adoçante utilizado (EDWARDS et al., 2016).

Atualmente, com a maior disponibilidade e preços mais acessíveis, o consumo de açúcar tem extrapolado os valores recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o que vem contribuindo para o aumento de casos de obesidade, diabetes, problemas dentários, e outros problemas de saúde. Nesse contexto, houve o surgimento dos adoçantes não-nutritivos intensos, compostos por moléculas, denominadas edulcorantes, capazes de adoçar sem contribuir com calorias e aumento da taxa glicêmica no organismo, e estes vêm ganhando espaço na vida dos consumidores (CAROCHO et al., 2017).

Dentre os tipos de edulcorantes existentes no mercado, os intensos não-nutritivos são muito utilizados pela indústria alimentícia, uma vez que o poder adoçante destes aditivos chega a ser centenas de vezes maiores que o da sacarose, necessitando de quantidades mínimas para se ter uma doçura equivalente a níveis elevados de açúcar. Além disso, não são ou são pouco metabolizados pelo organismo humano, de forma que a contribuição energética destes produtos é praticamente nula, diferente de edulcorantes como outros sacarídeos e polióis, os quais apresentam poder adoçante próximo à sacarose e ainda contribuem (pouco) com calorias (DAS, CHAKRABORTY, 2016). Os edulcorantes mais comuns, que se enquadram dentro dessa classificação, são a sacarina, o ciclamato, o aspartame, o acessulfame-K e a sucralose, todos estes artificiais, e os glicosídeos de esteviol, extratos de uma planta chamada *Stevia rebaudiana* Bertoni, cujos compostos majoritários são o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A, de origem natural (CAROCHO et al., 2014; QUIROGA, 2013).

Com este crescente uso de adoçantes intensos, não só em alimentos industrializados mas também na forma de adoçante de mesa, métodos cada vez

mais eficazes de controle de qualidade devem ser desenvolvidos. Trabalhos envolvendo adoçantes de mesa já relataram produtos ditos naturais adulterados com edulcorantes sintéticos (VARGAS et al., 2016). Além disso, produtos brasileiros contendo misturas de edulcorantes naturais e sintéticos não especificam as proporções de cada um, podendo muitas vezes as quantidades do primeiro serem mínimas, não correspondendo ao preço mais elevado de produtos com estévia. Estes pontos e diversos outros referentes ao rótulo de produtos alimentícios são regulamentados por resolução específica, além da existência de resoluções específicas para adoçantes de mesa, as quais devem ser seguidas, de modo a garantir a saúde do consumidor. Para as determinações de edulcorantes, nesse intuito, métodos cromatográficos, principalmente de cromatografia líquida de fase reversa, vêm sendo muito utilizados (ZYGLER, ANDRZEJ, NAMIESNIK, 2009).

Outra preocupação é a presença de contaminantes inorgânicos, principalmente metais tóxicos, os quais também apresentam legislação que estabelece seus limites máximos em alimentos. Assim, métodos de preparo de amostra para a análise destas espécies metálicas vêm sendo desenvolvidos. Trabalhos envolvendo principalmente análises por técnicas de plasma indutivamente acoplado (ICP) precedidas de digestão ácida das amostras são os mais comuns (PORFÍRIO, 2004; SOUSA et al., 2006)

Sendo assim, a existência de métodos de análise de adoçantes de mesa eficientes são necessários, de modo a garantir a qualidade desses produtos e contribuir para a saúde do consumidor.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CONSUMO DE AÇÚCARES E EDULCORANTES NO BRASIL E NO MUNDO

A capacidade que o ser humano tem de perceber as mais diversas sensações advém de seus cinco sentidos básicos – visão, audição, olfato, paladar e tato – os quais processam milhares de informações a cada segundo. Tais informações são então interpretadas e, muitas vezes, dependendo de cada indivíduo, consideradas como sendo um estímulo agradável ou não (CAROCHO et al., 2017). Em relação ao paladar, é notável o quanto o sabor doce sobressai-se como o preferido, principalmente entre as crianças, mas não deixando de ser também muito apreciado por adultos, quando comparado por exemplo ao ácido e o amargo (KIM et al., 2017).

A preferência pelo sabor adocicado pode ser constatada por algumas pesquisas, as quais mostram o quão elevado tem sido o consumo de açúcar pela população. O Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute*, em inglês) - Estados Unidos (NCI - EUA), estimou que a ingestão diária média de açúcar no período de 2001-2004 pela população dos EUA foi de cerca de 22 colheres de chá, tendo como maiores consumidores os adolescentes (14-18 anos), os quais ingerem cerca de 34 colheres de chá por dia. Ambas as quantidades se encontram bem acima das 9 colheres de chá recomendadas pelas Orientações dietárias dos Estados Unidos (do inglês *US Dietary Guidelines*) para uma dieta de 2200 kcal por dia (JOHNSON et al., 2009). No Reino Unido, a porcentagem média de energia proveniente de açúcar é de 13%, sendo maior entre jovens de 4-18 anos. A participação de adoçantes nutritivos nas calorias diárias é de cerca de 15%, ultrapassando o que recomenda a Organização Mundial da Saúde (OMS), 10% (NDNS, 2014). No Brasil, um inquérito nacional de alimentação realizado em 2008-2009 mostrou que uma porcentagem significativa das calorias diárias ingeridas por um indivíduo são provenientes de açúcares presentes em alimentos ou adicionados antes do consumo, correspondendo a cerca de 13-14%, sendo também superior ao limite de 10% recomendado pela OMS. A maior

ingestão é observada entre adolescentes (10-19 anos), cujo consumo de açúcar corresponde à 15% do total das calorias diárias (MONTEIRO et al., 2017).

A grande quantidade de açúcares consumidos pela população, aliada a um estilo de vida sedentário, podem desencadear, a longo prazo, doenças como obesidade e diabetes. Dados de 2016 da OMS mostram que cerca de 39% e 13% da população adulta (acima de 18 anos) mundial se encontra em sobrepeso e obesa, respectivamente (WHO, 2016). Paralelamente, tem-se também um crescente aumento de diagnósticos de diabetes tipo 2, uma das principais consequências advindas de problemas de excesso de peso. Segundo a OMS, a porcentagem de indivíduos diabéticos quase duplicou desde a década de 80, quando era de 4,7% comparados aos 8,5% diagnosticados em 2014, com previsão de aumento para os próximos anos (WHO, 2015).

Além de doenças relacionadas ao metabolismo, a ingestão de açúcar também é a principal causa de problemas dentários. Devido à fermentação da sacarose pelas bactérias presentes naturalmente na boca, ocorre produção de ácido, causando a deterioração dos dentes – cárie (EDWARDS et al., 2016). Assim, associado à higienização precária, tem-se observado também um crescimento de tais problemas, consequência direta do consumo excessivo de produtos açucarados (DONALDSON et al., 2015).

Assim, no intuito de reduzir o consumo de açúcar e os seus possíveis malefícios, consumidores tem aderido aos chamados adoçantes não nutritivos, adoçantes intensos, ou adoçantes de mesa, os quais apresentam pouquíssimo ou nenhum valor calórico. Os princípios ativos responsáveis pela doçura nestes produtos são denominados edulcorantes, das quais porções mínimas são necessárias para se atingir a mesma doçura de quantidades significantes de sacarose (CAROCHO et al., 2017; COHEN, 1987;; SYLVETSKY; ROTHER, 2016).

## **2.2 EDULCORANTES**

A Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997, emitida pela Secretaria de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde (SVS/MS), classifica os edulcorantes como

aditivos alimentares (BRASIL, 1997). Estes são definidos na própria Portaria nº 540 como sendo:

“(...) qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais.” (PORTARIA Nº 540, SVS/ MS, BRASIL, 1997).

Os edulcorantes podem ser classificados como nutritivos, aqueles que fornecem certa quantidade de energia, como os sacarídeos e os polióis, e os não-nutritivos, cuja contribuição calórica é desprezível (DAS, CHAKRABORTY, 2016). No Brasil, os edulcorantes (ou adoçantes) não-nutritivos mais comumente encontrados no mercado são a sacarina sódica (SAC), o ciclamato de sódio (CIC), o aspartame (ASP), o acessulfame-K (ACS) e a sucralose (SUC), classificados como artificiais. Os glicosídeos de esteviol, cujos compostos majoritários são o esteviosídeo (STV) e o rebaudiosídeo A (RBD), são classificados como naturais (QUIROGA, 2013). Em geral, apresentam elevado poder adoçante<sup>1</sup> (Tabela 1), necessitando-se de quantidades mínimas para se atingir a mesma doçura equivalente a quantidades significativas de açúcar, sem contribuir com calorias ou aumento da taxa glicêmica no organismo, além de não serem cariogênicos. Assim, estas substâncias vêm sendo muito utilizadas por pessoas em dieta para controle de peso e por diabéticos como substitutos à sacarose (NEHRLING et al., 1985; O'DONNELL; KEARSLEY, 2012).

---

<sup>1</sup> Medida relativa à doçura de uma solução 30 g/L de sacarose a 20 °C, cujo poder adoçante equivale à 1, feita por análise sensorial (QUIROGA, 2013; CAROCHO et al., 2017).

**Tabela 1** - Poder adoçante e Ingestão Diária Aceitável (IDA) (por kg de peso corporal) dos principais edulcorantes utilizados no Brasil, segundo estabelecido pelo *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA)

<b>Edulcorante</b>	<b>Poder Adoçante</b>	<b>Ingestão Diária Aceitável (mg/kg)</b>
Sucralose	400-800	15
Glicosídeos de Esteviol	300	4
Sacarina	240-300	5
Aspartame	200	40
Acessulfame-K	150-200	15
Ciclamato	30-80	11
Açúcar (Sacarose)	1	-

Fonte: CAROCHO et al. (2017), MITCHELL (2006), e QUIROGA, (2013).

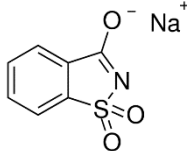
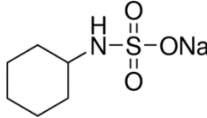
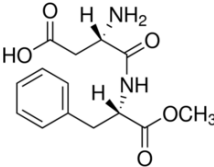
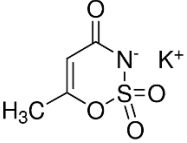
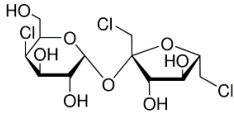
Tendo em vista a atual preocupação da população com relação à obesidade e vontade de emagrecer, o consumo destes produtos tem aumentado nos últimos anos, cerca de 5,1% ao ano no período de 2008 a 2015, sem perspectivas de se atingir um patamar. Os adoçantes e alimentos contendo sacarina e ciclamato são os mais consumidos no mundo, uma vez que são os edulcorantes mais baratos no mercado (SYLVETSKY; ROTHER, 2016).

### **2.2.1 Edulcorantes artificiais**

Os edulcorantes artificiais (Tabela 2) são quimicamente sintetizados e, geralmente, os produtos comerciais consistem de misturas destes, no intuito de se atingir a melhor relação poder adoçante:sabor, mas podem ser também encontrados de forma individual (O'MULLANE et al., 2014).

Os primeiros adoçantes sintéticos utilizados foram a sacarina, o ciclamato e o aspartame, seguidos pelo acessulfame-K, sucralose, e outros, como o neotame e o advantame, ainda pouco consumidos no Brasil (CAROCHO et al., 2017; MAGNUSON et al., 2017).

**Tabela 2** - Estruturas e algumas informações dos principais edulcorantes artificiais.

Composto	Formula molecular	Estrutura	Massa molar (g/mol)
Sacarina sódica	$C_7H_4NNaO_3S$		205,18
Ciclamato de sódio	$C_6H_{11}NH_2SO_3Na$		201,22
Aspartame	$C_{14}H_{18}N_2O_5$		294,30
Acessulfame-K	$C_4H_4KNO_4S$		201,24
Sucralose	$C_{12}H_{19}Cl_3O_8$		397,63

Fonte: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (Acesso em 11/06/2017)

### 2.2.1.1 Sacarina

Os primeiros registros de uma molécula, diferente da sacarose, com capacidade adoçante são do final do século XIX, advindos dos trabalhos de Remsem e Fahlberg (1879), quando produziram, por acidente, o composto hoje conhecido como sacarina, durante reações de oxidação de *orto*-metilbenzenosulfonamida (COHEN, 1986; O'DONNELL, KEARSLEY, 2012). Segundo a história, um pouco da solução produto derramou na mão do pesquisador, que sentiu um sabor adocicado em seu pão durante sua refeição. Fahlberg associou este sabor aos resíduos da solução produzida mais cedo, provenientes do pequeno acidente. Foram realizadas diversas tentativas de lançar o produto no mercado como um substituinte adoçante, porém seu uso foi contestado diversas vezes, durante vários anos. Entretanto, a escassez de açúcar durante a II Guerra Mundial, na

década de 40, fez com que o uso da sacarina em alimentos se tornasse uma alternativa (ARNOLD et al., 1983).

Por volta da década de 60, estudos envolvendo ratos levaram a crer que este composto, em altas concentrações, poderia estar induzindo câncer de bexiga nos animais. Estes resultados levaram o Canadá, em 1970, a limitar seu uso apenas como adoçante de mesa e, em 1981, os EUA obrigaram as empresas a colocar nos rótulos dos produtos que continham sacarina uma advertência quanto ao fato do composto ser um possível carcinogênico (O'MULLANE et al., 2014). Posteriormente, foi mostrado que o mecanismo de desenvolvimento desse tipo de câncer em roedores, envolvendo a sacarina, não pode ser aplicado aos humanos, partindo da ideia de que as características morfofisiológicas das espécies são diferentes, o que fez com que a molécula deixasse de ser considerada cancerígena (COHEN et al., 1998; O'MULLANE et al., 2014). Além disso, estudos com indivíduos que viveram na década de 40, período de maior consumo de sacarina, não mostraram uma tendência dos mesmos em desenvolver tumores (ARMSTRONG, RICHARD, 1974).

Comercialmente, a sacarina é vendida na forma de seu sal de sódio (mais comum) ou cálcio, visto que sua forma ácida ( $pK_a = 2,32$ ) é pouco solúvel em água. Outros sais foram sintetizados, como o de níquel, porém apenas os dois primeiros apresentaram um poder adoçante satisfatório (ARNOLD et al., 1983). Apresenta boa estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, sendo assim uma boa substituta ao açúcar nos mais diversos produtos (O'DONNELL, KEARSLEY, 2012). É mais comumente utilizada em conjunto com outros edulcorantes, de modo a reduzir um gosto amargo residual deixado se utilizada pura (O'MULLANE et al., 2014).

### *2.2.1.2 Ciclamato*

Outros compostos de sabor doce foram sintetizados após a descoberta da sacarina, porém sem aplicações no setor de alimentos. Apenas em 1937, durante trabalhos com reações de substituição em ácido sulfâmico realizados no laboratório do Prof. L. F. Audriech (Universidade de Illinois), um de seus alunos, M. Sveda, repousou um cigarro na bancada do laboratório. Quando o colocou na

boca, sentiu o sabor doce e associou à molécula de ciclohexilsulfamato que havia sido sintetizada no local (O'DONNELL, KEARSLEY, 2012; WALTERS, 1991). Os pesquisadores realizaram outro trabalho, em 1944, elucidando as propriedades desses ácidos substituídos, e incluíram um tópico especial para as propriedades adoçantes da molécula hoje conhecida como ciclamato, tanto na sua forma ácida como seu sal (SVEDA, AUDRIECH, 1944).

A liberação do uso do ciclamato veio em 1950, porém receosos de que um provável metabólito, a ciclohexilamina, poderia ser um possível indutor de câncer de bexiga devido à toxicidade da molécula, o *Food and Drugs Administration* (FDA) banuiu seu uso nos EUA no início dos anos 70, após alguns trabalhos realizados com ratos (CAROCHO et al., 2017; O'DONNELL, KEARSLEY, 2012; RICHARDSON, 1966). Estudos posteriores com humanos mostraram que poucos indivíduos são capazes de metabolizar o ciclamato, e que não foi observado o potencial carcinogênico apresentado em animais. Foi então revogada a suspensão pelo FDA nos EUA, e seu uso já é aprovado em mais de 50 países (PORFIRIO, 2004; RENWICK et al., 2004; WEIHRAUCH, DIEHL, 2004).

Este edulcorante é encontrado tanto na sua forma ácida ( $pK_a = 1,71$ ) como na forma de sal de sódio, sendo este último mais comum, uma vez que apresenta maior solubilidade em água (200 g/L) e tem-se menor efeito de acidez. De modo geral, apresenta boa estabilidade nas mais diversas condições de pH e temperatura, porém uma pequena parte pode se decompor em ciclohexilamina. Apresenta menos gosto residual que a sacarina, sendo mais próximo à sacarose, porém ainda deixa um leve gosto residual (*aftertaste*) amargo (O'DONNELL, KEARSLEY, 2012).

### 2.2.1.3 Aspartame

Descoberto em 1965 durante sínteses de peptídeos gástricos realizados por Schlatter, quando um pouco de solução caiu em sua mão e, ao lamber os dedos para passar a página de um livro, sentiu um sabor adocicado, o qual associou ao produto de sua síntese (WALTERS, 1991). Passou por diversos estudos e

apenas em 1981 foi finalmente aprovado pelo FDA (O'DONNELL, KEARSLEY, 2012).

Assim como para a sacarina e o ciclamato, pesquisas envolvendo roedores no intuito de se verificar uma possível atividade carcinogênica, principalmente na bexiga, tendo em vista o histórico anterior, foram realizadas. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que esse edulcorante não está relacionado ao aparecimento de tumores neste órgão (HAGIWARA et al., 1984). Uma revisão realizada por Kirkland e David (2015), levou os autores a concluir que o edulcorante não apresenta genotoxicidade, ou seja, não é capaz de causar mutações genéticas. Contudo, ainda não se tem nada conclusivo com relação a outros possíveis efeitos desta molécula no corpo humano. Estudos posteriores, também com ratos, mostraram alterações no comportamento dos animais quando foram administradas, nestes animais, doses diárias normais de aspartame (ASHOK et al., 2013). Em outros estudos, foram já também observados efeitos adversos como danos em nervos, nefrotoxicidade em fetos, diabetes tipo 2, entre outros, todos também em modelos animais (ratos) (FAGHERAZZI et al., 2013; MARTINS, REINALDO, 2007; OKASHA, 2016). Aspartame também já foi considerado um causador de dores de cabeça entre seus usuários, porém possíveis mecanismos biológicos não foram elucidados (LIPTON et al., 1989).

O que se sabe ao certo sobre as consequências da ingestão desse edulcorante está relacionado aos seus metabólitos. O aspartame é um metil éster formado por dois aminoácidos, o ácido aspártico e a fenilalanina. Uma pequena porcentagem da população não consegue metabolizar este último aminoácido, devido à uma condição genética denominada fenilcetonúria. Portanto, estes indivíduos não devem consumir produtos que contenham este adoçante, o que obrigou as empresas alimentícias a adicionarem um aviso no rótulo de alimentos quando esse estiver presente (CAROCHO et al., 2017; SHANKAR, et al., 2013). Outra preocupação está relacionada ao fato de que, em pHs muito baixos, como no estômago, a molécula sofre hidrólise liberando metanol. Este pode ser então convertido em formaldeído, o qual vem sendo associado a possível formação de

tumores. Contudo, nenhum estudo conseguiu comprovar este fato, e o que se tem até então são dados circunstanciais (WEIHRAUCH, DIEHL, 2004).

Mesmo sendo um dos edulcorantes mais controversos dentre os mais comuns no mercado, o aspartame é largamente utilizado devido ao seu elevado poder adoçante, sabor adocicado, sem sabor amargo/metálico residual, comum na maioria dos outros adoçantes. Apresenta maior estabilidade em sua forma sólida que em solução, uma vez que a presença de água pode colaborar para reações de hidrólise em pHs mais baixos e em temperaturas mais elevadas. Para fins alimentares, a melhor faixa de pH, de modo a se ter maior tempo de meia-vida para este edulcorante, está entre 3-5. Para os órgãos de vigilância sanitária, é considerado seguro para o ser humano, porém ainda não é muito aceito pelos consumidores devido à toda polêmica que ainda envolve seus efeitos no organismo. Por ser formado por aminoácidos, quando ingerido, contribui com umas poucas calorias (4 kcal/g) (CAROCHO et al., 2017; O'DONNELL, KEARSLEY, 2012).

#### *2.2.1.4 Acessulfame-K*

O acessulfame foi também descoberto por acidente, em 1967, pelos pesquisadores Claus e Jensen, e aprovado pelo FDA em 1988, apenas para uso em categorias alimentícias específicas, sendo aprovado para uso geral apenas em 2003 (O'DONNELL, KEARSLEY, 2012; YALAMANCHI, SRINATH, DOBS, 2016).

O NCI - EUA fez uma declaração em 2009 afirmando que o acessulfame-K não apresenta genotoxicidade. Mesmo este edulcorante sendo eliminado praticamente inalterado, algumas quebras podem ocorrer, tendo como um possível produto a acetoacetoamida, que é tóxica para o ser humano em altas concentrações. Contudo, as quantidades de acessulfame normalmente ingeridas são muito pequenas, o que faz tais efeitos serem negligenciáveis. Outros estudos toxicológicos foram realizados pelas principais agências de saúde do mundo como o FDA e o JECFA, havendo concordância de que esse edulcorante não traz riscos à saúde (KROGER et al., 2006; YALAMANCHI et al., 2016).

A forma comercial é o sal de potássio, o qual possui boa solubilidade em água e soluções alcoólicas e apresenta boa estabilidade em pHs comumente encontrados em alimentos e perdas significativas somente são notadas quando em temperaturas elevadas durante vários meses. Geralmente é encontrado misturado a outro edulcorante, uma vez que apresenta um forte gosto amargo residual. Apresenta elevado poder adoçante, e estas misturas proporcionam uma relação sinérgica entre doce e sabor, de forma a melhor atender o paladar do consumidor (O'DONNELL, KEARSLEY, 2012; SHANKAR et al., 2013).

#### *2.2.1.5 Sucralose*

A sucralose, considerada o mais potente edulcorante até então, é um dissacarídeo derivado da sacarose, em que se tem três grupos hidroxila desta seletivamente substituídos por átomos de cloro. Descoberta no final da década de 80, durante pesquisas realizadas por Hough e Khan (1989), na Queen Elizabeth College, University of London quando investigavam como a substituição de halogênios na molécula de sacarose influenciava em sua doçura. Foi aprovada para consumo em 1998 pelo FDA (KNIGHT, 1993; SHANKAR et al., 2013).

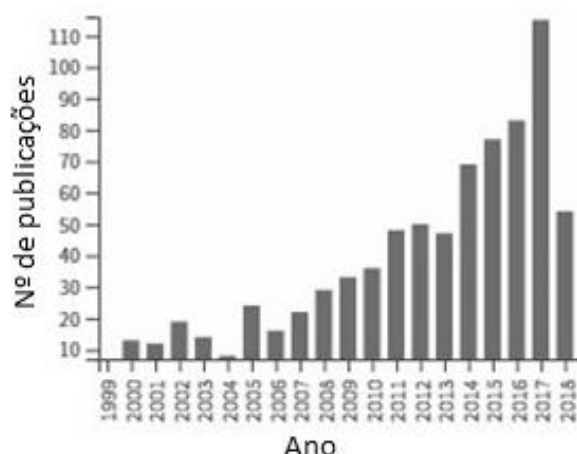
Estudos toxicológicos, tanto em animais como em humanos, não encontraram efeitos genotóxico e cancerígeno da molécula de sucralose, ou de nenhum possível metabólito, no organismo. Também não se associou nenhum outro dano colateral relacionado ao uso deste aditivo (BERRY et al., 2016; GROTZ, MUNRO, 2009).

Mesmo sendo derivada da sacarose, a sucralose não colabora com o aumento da taxa glicêmica no organismo, sendo cerca de 85% excretada intacta nas fezes, enquanto os outros 15% absorvidos sofrem pequenas reações no organismo, sendo eliminados, posteriormente, na urina. Não apresenta limitações quanto à solubilidade, além de ser bem estável, tanto na forma sólida quanto em solução, inclusive em valores de pH e temperatura extremos, uma vez que os átomos de cloro presentes estabilizam as ligações glicosídicas, diminuindo a protonação e reduzindo drasticamente possíveis reações de hidrólise. Assim, é considerada uma boa substituta ao açúcar comum, tendo

também em vista seu grande poder adoçante e a ausência de sabor residual desagradável (MAGNUSON et al., 2017; O'DONNELL, KEARSLEY, 2012).

### 2.2.2 Edulcorantes Naturais

A preferência por produtos naturais tem crescido bastante pelos consumidores, principalmente em função de que o alimento não-industrializado apresenta menos malefícios à saúde. Por isso, e tendo em vista o tabu que ainda rodeia os edulcorantes sintéticos, o uso de adoçantes naturais vem se popularizando nos últimos anos. Tal fato vem impulsionando também as pesquisas (Figura 1) envolvendo possíveis extratos com boa capacidade adoçante e sabor, compatíveis com as exigências do mercado, além de seus efeitos no organismo (BELLOIR et al., 2017; O'DONNELL, KEARSLEY, 2012).



**Figura 1** - Número de publicações por ano envolvendo o termo "natural sweeteners" nos últimos 20 anos. Fonte: Relatório gerado pela base de dados Web of Science (Acesso em 09/07/2018).

Diversas categorias de compostos com sabor doce já foram identificadas em plantas, sendo a maioria glicosídeos pertencentes aos terpenoides. Entretanto, os esteroides, os flavonoides e as proteínas também já foram encontrados (PAWAR et al., 2013). Proteínas com capacidade adoçante significativa, como a taumatina, monelina, pentadina e curculina, já foram isoladas de extratos vegetais, estudadas e caracterizadas, mas apenas a taumatina foi aprovada para uso comercial (PAWAR et al., 2013). Contudo, devido às dificuldades de

produção da planta da qual essa proteína é extraída, tem sido complicado atender à demanda mundial (CAROCHO, MORALES, FERREIRA, 2017).

Dentre os terpenoides, extratos das espécies *Siraitia grosvenorii* (Swingle) e *Stevia rebaudiana* (Bertoni) apresentaram um bom poder adoçante, e hoje são os principais edulcorantes naturais encontrados no mercado. A primeira, também conhecida como fruta dos monges, tem sua origem na China, sendo tradicionalmente utilizada como remédio caseiro para resfriados, dores de garganta e problemas intestinais. Os princípios adoçantes deste fruto começaram a ser estudados apenas na década de 1970, e seu consumo como um aditivo em alimentos ainda não é muito popular fora da Ásia oriental e EUA (FRY, 2012; ITKIN et al., 2016; KINGHORA et al., 1986).

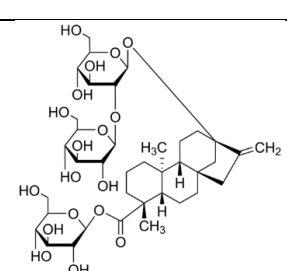
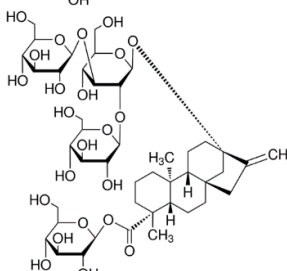
A estévia é originária da América do Sul, mais precisamente do Paraguai e do Brasil. Seu extrato é o principal edulcorante natural utilizado em alimentos nessa região, sendo também já difundido para outros países, os quais também já possuem plantações para a produção do mesmo, como no Canadá e em algumas partes da Ásia e da Europa. Este extrato apresenta em sua composição diversos terpenóides, responsáveis pelo sabor doce do produto, sendo que cerca de 10 já foram isolados e estudados, mas os mais abundantes são o esteviosídeo (STV) e o rebaudiosídeo A (RBD) (MONDACA et al., 2012; MONTORO et al., 2013). Suas moléculas e algumas outras informações estão representadas na Tabela 3. Destes, o RBD é o de maior interesse, uma vez que apresenta melhor sabor e maior propriedade adoçante. Trabalhos têm sido realizados no intuito de aumentar sua produção pela planta, tendo em vista que o STV ainda é majoritário e responsável por um sabor amargo desagradável (FRY, 2012).

Por vários séculos, as folhas de estévia foram utilizadas pelos nativos como uma espécie de adoçante, com o objetivo de reduzir o gosto amargo de algumas ervas medicinais. Também era usada como curativo, além de possuir propriedades medicinais (KUMAR, NARAYANAN, RAVI, 2015). A planta foi descoberta durante uma expedição no Paraguai, em 1887, por um botânico suíço chamado Moisés Santiago Bertoni, responsável por toda a caracterização morfofisiológica da nova espécie. Os estudos referentes à sua composição

química começaram logo após sua catalogação pelo cientista, nos primórdios do século XX (KINGHORA et al., 1986).

Estudos toxicológicos mostraram que os glicosídeos de esteviol não apresentam atividade carcinogênica e/ou genotoxicidade, sendo considerados seguros para o consumo (PÓL, HOHNOVÁ, HYOTYLAINEN, 2007; ZHANG et al., 2017). Apresentam boa estabilidade em meios com pHs baixos, como mostraram estudos envolvendo bebidas gaseificadas. Em temperaturas acima de 37 °C, estes sofreram uma pequena degradação após cerca de dois meses, porém mostraram-se estáveis quando em temperatura ambiente. São pouco solúveis em água, porém o elevado poder adoçante faz com que tal fato não seja um empecilho para seu uso em alimentos, uma vez que pouca quantidade é necessária para se atingir níveis aceitáveis de doçura (O'DONNELL, KEARSLEY, 2012).

**Tabela 3** - Estruturas e algumas informações dos principais extratos da *Stevia rebaudiana* (Bertoni), utilizados como edulcorantes naturais

Composto	Formula molecular	Estrutura	Massa molar (g/mol)
Esteviosídeo	$C_{38}H_{60}O_{18}$		804,87
Rebaudiosídeo A	$C_{44}H_{70}O_{23}$		967,01

Fonte: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (Acesso em 11/06/2017).

### 2.3 MÉTODOS DE ANÁLISE DE PRODUTOS COMERCIAIS

O crescente aumento no consumo de adoçantes de mesa impulsiona também as pesquisas focadas em diversos fatores envolvendo estes produtos. Como já discutido, trabalhos relacionados à possíveis efeitos tóxicos dessas moléculas

no organismo, ingestões diárias recomendadas, efeitos colaterais, dentre outros correlatos são de grande importância e relevância.

Não menos importante é também o estudo da qualidade desses produtos que se encontram nas prateleiras dos supermercados. Portanto, métodos de análises devem ser continuamente desenvolvidos e aprimorados, de modo a se conseguir analisar as mais variadas matrizes, sejam em alimentos, ou os próprios adoçantes de mesa, sendo possível obter resultados confiáveis e relevantes, contribuindo para o controle de qualidade e para a saúde do consumidor. Dentre os principais métodos, destacam-se a cromatografia líquida para identificação e quantificação de edulcorantes e a digestão ácida procedida de análise por plasma indutivamente acoplado para determinação elementar.

### **2.3.1 Determinação de edulcorantes em adoçantes de mesa e outras matrizes alimentícias**

Os adoçantes de mesa são definidos na Resolução (RDC) nº 271, de 22 de setembro de 2005 (ANVISA, 2005), emitida pela ANVISA, como:

“(...) produto formulado para conferir sabor doce aos alimentos e bebidas, constituído de edulcorante(s) previsto(s) em Regulamento Técnico específico.”  
(RDC N° 271, ANVISA, 2005).

A mesma Resolução também fornece informações relacionadas à rotulagem dos produtos que fazem uso de edulcorantes (ANVISA, 2005), as quais devem apresentar:

- a) a designação do produto (...);
- b) a informação "Contém edulcorante(s).....", seguida do(s) nome(s) do(s) edulcorante(s), próxima à designação do produto;
- c) a informação, em destaque e em negrito: "Diabéticos: contém.....g de ....." (sacarose, glicose e ou frutose, quando for o caso) nas medidas práticas usuais (gotas, colher de café, colher de chá, envelope, tabletes ou outras);
- d) a advertência, em destaque e em negrito: "Contém fenilalanina", para os adoçantes nos quais é utilizado aspartame; e
- e) o valor energético, expresso em quilocalorias, da medida prática usual do produto (gotas, colher de café, colher de chá, envelope, tabletes ou outras) e a equivalência de seu poder adoçante em relação ao do açúcar (sacarose). (RDC N° 271, ANVISA, 2005).

Existe também resolução específica para rotulagem de alimentos em geral, a RDC Nº 259 de 20 de setembro de 2002. Segundo esta,

“3.1. Os alimentos embalados não devem ser descritos ou apresentar rótulo que:

- a) utilize vocábulos, sinais, denominações, símbolos, emblemas, ilustrações ou outras representações gráficas que possam tornar a informação falsa, incorreta, insuficiente, ou que possa induzir o consumidor a equívoco, erro, confusão ou engano, em relação à verdadeira natureza, composição, procedência, tipo, qualidade, quantidade, validade, rendimento ou forma de uso do alimento;
- b) atribua efeitos ou propriedades que não possuam ou não possam ser demonstradas;
- c) destaque a presença ou ausência de componentes que sejam intrínsecos ou próprios de alimentos de igual natureza, exceto nos casos previstos em Regulamentos Técnicos específicos;
- d) ressalte, em certos tipos de alimentos processados, a presença de componentes que sejam adicionados como ingredientes em todos os alimentos com tecnologia de fabricação semelhante;
- e) ressalte qualidades que possam induzir a engano com relação a reais ou supostas propriedades terapêuticas que alguns componentes ou ingredientes tenham ou possam ter quando consumidos em quantidades diferentes daquelas que se encontram no alimento ou quando consumidos sob forma farmacêutica;
- f) indique que o alimento possui propriedades medicinais ou terapêuticas;
- g) aconselhe seu consumo como estimulante, para melhorar a saúde, para prevenir doenças ou com ação curativa.” (RDC Nº 259, ANVISA, 2002)

Assim, tendo em vista os dispostos nas resoluções e portarias mencionadas, além da IDA proposta pela JECFA para cada edulcorante, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos eficientes na determinação destes aditivos nos mais diversos alimentos e bebidas. Além disso, com a popularização de produtos de estévia, cujo extrato apresenta preço elevado, existe a possibilidade de mistura, sem a devida informação, de edulcorantes artificiais, de forma a minimizar os custos. De fato, em trabalho recente realizado por Vargas e colaboradores (2016), amostras de adoçantes bolivianos e alemães, segundo os rótulos, continham apenas edulcorantes naturais, entretanto, estavam adulteradas com edulcorantes artificiais de preço menor, como sacarina e ciclamato. Tal fato mostra a importância de se fazer uma análise também de

produtos brasileiros, uma vez que adulterações podem ser um risco à saúde do consumidor. Também pode-se notar a pouca informação contida nos rótulos dos produtos, no qual muitos dizem serem feitos com produtos naturais ou com misturas de adoçantes naturais e sintéticos, porém a proporção entre eles não é informada e pode estar em desacordo com o preço aplicado ao produto. Tais ações constituem crime de falsificação, corrupção, adulteração ou alteração de substância ou produto alimentício previsto em Constituição Federal pela Lei 9.677 de 2/7/1998, artigo 272 inciso 1º A e artigo 275 (invólucro ou recipiente com falsa indicação) da mesma Lei (BRASIL, 1998).

### *2.3.1.1 Métodos para determinação de edulcorantes*

Em se tratando de preparo de amostras, algumas matrizes, como os adoçantes de mesa, são relativamente simples, e, portanto, geralmente são apenas diluídas em água deionizada. Para amostras mais complexas, metodologias baseadas em extração em fase sólida (SPE) são comumente utilizadas. Estes preparos são os mais utilizados, porém, a depender da técnica instrumental, outros procedimentos podem ser realizados, como derivatizações (ZYGLER, ANDRZEJ, NAMIESNIK, 2009)

Dentre as técnicas de análise para a identificação de edulcorantes, algumas tem se destacado, como por exemplo a utilização de sistemas de injeção em fluxo (FIA) acopladas a técnicas espectrofotométricas de detecção, como foi realizado por Fatibello-Filho e colaboradores (1999) para a determinação de ASP em adoçantes de mesa. Método semelhante foi utilizado por García-Jimenez e colaboradores (2006), na determinação não só de ASP, mas também de ACS em amostras de adoçantes. Métodos que envolvem essa técnica apresentaram bons resultados apenas para determinação de até dois edulcorantes simultaneamente, utilizando reações seletivas aos específicos analitos desejados para posterior análise (ZYGLER, ANDRZEJ, NAMIESNIK, 2009).

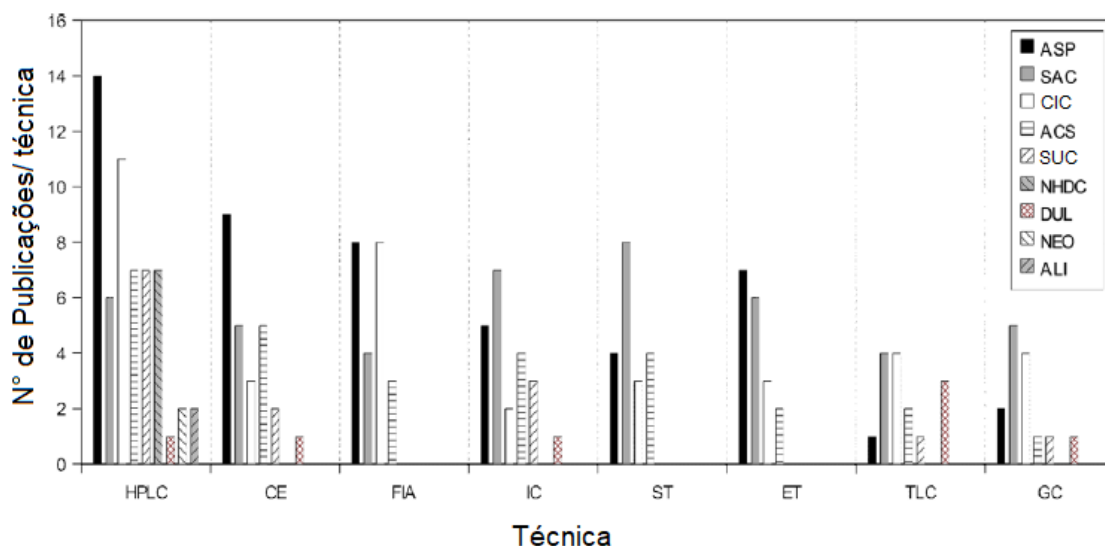
A espectroscopia Raman com transformada de Fourier foi utilizada por Mazurek e Szostak (2011) para a quantificação de ASP em adoçantes comerciais. A mesma técnica foi utilizada por Duarte e colaboradores (2017) na determinação

de ASP, CIC, SAC e ACS em adoçantes de mesa em pó, utilizando métodos quimiométricos no tratamento dos dados.

Em um artigo de revisão elaborado por Zygler, Andrzej e Namiesnik, (2009), foram relatadas ainda técnicas de voltametria, potenciometria e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para determinação de alguns edulcorantes em matrizes como produtos dietéticos, bebidas e nos próprios adoçantes de mesa. Contudo, tais técnicas são mais utilizadas quando o intuito é a determinação simultânea de poucos analitos. Segundo os autores, as técnicas mais utilizadas na determinação, separação e quantificação de vários edulcorantes ao mesmo tempo são a eletroforese capilar (CE) e a cromatografia.

Stojkovic, Mai e Hauser (2013) separaram e quantificaram quatro edulcorantes artificiais, ASP, SAC, CIC e ACS, em amostras de alimentos, fazendo o uso da CE. Yang e colaboradores (2015) separaram e quantificaram ACS, CIC e SAC em diversas bebidas também por CE, utilizando técnicas de pré-concentração online. Edulcorantes naturais também já foram analisados e quantificados em alimentos e bebidas por CE, como nos trabalhos de Pavlicek e Tuma (2017), nos quais determinaram STV e RBD nessas amostras.

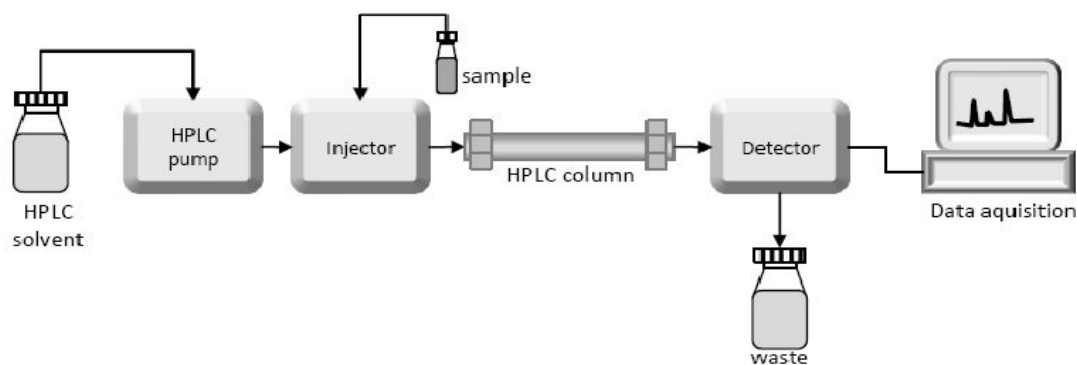
Apesar dos bons resultados obtidos nos trabalhos de determinação de edulcorantes envolvendo eletroforese capilar, técnicas de cromatografia ainda são as mais largamente utilizadas em análises de alimentos em geral. A Figura 2, adaptada de Zygler, Andrzej e Namiesnik (2009), mostra o quanto a tendência no uso de separações cromatográficas de edulcorantes, principalmente por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) tem se mantido superior a outras técnicas de análise, o que pode ser justificado pela grande variedade de colunas de separação aliada aos diversos tipos de detectores disponíveis. (ZYGLER, ANDRZEJ, NAMIESNIK, 2009).



**Figura 2** - Relação entre o número de publicações e a técnica utilizada para análise de diversos edulcorantes. HPLC = cromatografia líquida de alta eficiência; CE = eletroforese capilar; FIA = análise por injeção em fluxo; IC = cromatografia iônica; ST = técnicas espectroscópicas; ET = técnicas eletroanalíticas; TLC = cromatografia por camada delgada; GC = cromatografia gasosa. Fonte: Adaptado de Zyglar, Andrzej e Namiesnik (2009).

#### 2.3.1.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência consiste de uma fase estacionária sólida e uma fase móvel líquida, cuja separação se dá através de diferentes mecanismos, os quais se baseiam nos diferentes tipos de interação entre analitos/ sólido e analitos/ solvente. Em cromatografia de fase normal, a coluna apresenta caráter polar, geralmente feita de sílica ou alumina, e a fase móvel mais apolar, de modo que analitos mais apolares são eluídos primeiro, já que apresentam pouca afinidade com a fase estacionária. Para fase reversa, tem-se o oposto, com colunas mais apolares e solventes mais polares, emergindo primeiramente da coluna os compostos mais polares (MEYER, 1994; SNYDER, KIKLAND, 1979). Na Figura 3 está demonstrado um esquema básico de funcionamento de um cromatógrafo líquido.



**Figura 3** - Etapas esquematizadas em uma técnica de HPLC. *HPLC solvent*: solvente; *HPLC pump*: bomba; *Injector*: injetor; *Sample*: amostra; *HPLC column*: coluna; *Detector*: detector; *Waste*: resíduos; *Data acquisition*: processador de dados. Disponível em: <http://intekgroup.com.co/wp-content/uploads/2017/05/Sistema-HPLC.png> (Acesso em 11/12/2018).

O solvente contido em recipiente apropriado é levado ao sistema por um conjunto de bombas. A fase móvel chega ao injetor, onde a amostra é inserida, e a arrasta para a coluna, onde irá ocorrer a separação dos analitos com base nas diferentes forças de interação entre fase móvel/ analito e analito/ fase estacionária. O eluato (o que sai da coluna) chega então ao detector, que leva as informações dos compostos ao sistema de aquisição de dados, que irá gerar o cromatograma (SNYDER, KIRKLAND, 1979).

Uma das etapas no desenvolvimento de um método cromatográfico consiste na otimização das condições de separação. Para isso, deve-se selecionar fase móvel e coluna, levando em conta as características dos analitos, de modo a se obter uma boa separação dos picos. Na seleção da fase móvel deve-se levar em consideração a força dos solventes, tendo em vista que solventes mais fracos aumentam a retenção e solventes mais fortes diminuem a retenção dos analitos. Considerando que em cromatografia de fase reversa um dos solventes é água (ou solução aquosa tamponada), a força da fase móvel está relacionada à porcentagem de solvente orgânico e sua polaridade, de modo que, quanto maior for a fração de solvente orgânico, maior será a interação da mesma com a fase estacionária, e maior será sua força (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006; SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1997).

Em relação à fase estacionária, colunas a base de sílica com fase ligada são as mais comuns em HPLC-RP. Estas são geralmente preparadas a partir de reações entre os grupos silanol ( $\equiv\text{Si-OH}$ ) da sílica com agentes sililantes, normalmente um organoclorossilano ou organoalcóxissilano, formando uma ligação siloxano ( $\equiv\text{Si-O}\equiv\text{SiR}'_2\text{R}$ ) (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006; SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1997).

Alguns exemplos de grupos funcionais utilizados em sílicas quimicamente modificadas são o triacontil (C30), docosil (C24), octadecil (C18), octil (C8), dentre outros (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

Dentre os detectores, um dos mais utilizados é aquele por absorção no ultravioleta (UV), tendo em vista a grande variedade de compostos que absorvem na região do UV. Apresenta uma boa sensibilidade, além de ser um detector de uso não tão complexo. Além deste, métodos de detecção por fluorescência também são muito utilizados (MEYER, 1994). Com relação aos edulcorantes, diversos trabalhos já utilizaram estas técnicas para a identificação e quantificação em diversas matrizes.

Di Pietra e colaboradores (1990) utilizaram uma coluna Hypersil C18 (10  $\mu\text{m}$ , 250 x 4 mm) para separar SAC e ASP a partir de cromatografia líquida utilizando uma fase móvel composta por metanol, tetrahydrofurano (THF) e tampão fosfato de trietilamônio (TEA) 0,08 mol/L, pH 3,0. O detector utilizado foi ultravioleta (UV), e suas matrizes foram alimentos dietéticos. Demiralay, Özkan e Guzel-Seydim (2006) determinaram ACS, ASP e SAC, além de outros componentes, em refrigerantes de cola e bebidas instantâneas em pó, utilizando RP-HPLC-UV/DAD<sup>2</sup>, uma coluna YMC-ODS Pack AM (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4 mm) e acetonitrila (ACN)-tampão acetato de amônio como fase móvel, em pH 4,0. Glicosídeos de esteviol foram analisados por Bartholomees e colaboradores (2016) em diversos alimentos via RP-HPLC com detecção por fluorescência. Após uma etapa de derivatização, as amostras foram injetadas em uma coluna Alltima C18 (250 x

---

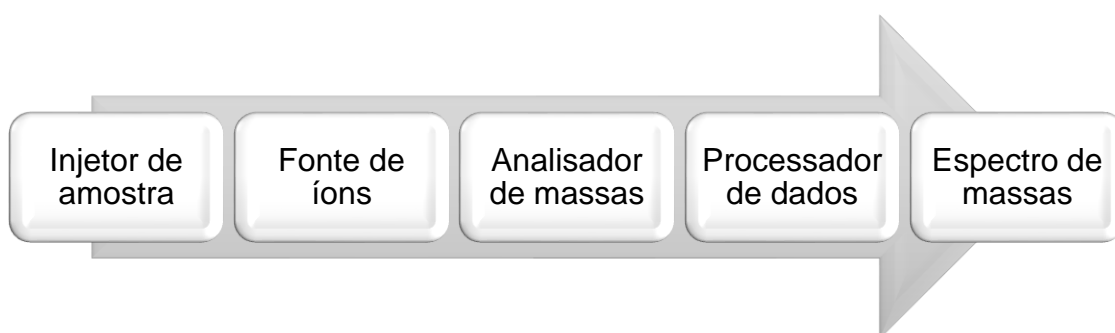
<sup>2</sup> DAD = *Diode array detector* (detector por arranjo de diodos).

4.6 mm ID, 5 µm) e eluídas utilizando uma fase móvel composta por ACN e água, em gradiente.

As técnicas citadas se mostraram eficientes na determinação dos analitos em questão. Contudo, alguns edulcorantes, como o CIC e a SUC, não possuem grupos cromóforos em suas moléculas, e, portanto, não podem ser analisados por detectores de UV sem antes passarem por um processo de derivatização, tornando o método mais laborioso. Um trabalho realizado por Wasik e colaboradores (2007) utilizou detecção do tipo *light scattering*, a qual se baseia no grau de espalhamento de luz causado pelo analito, obtendo êxito na determinação de todos os edulcorantes, porém com elevados limites de detecção e quantificação (da ordem de ppm), além de uma resposta não linear às concentrações dos analitos. A análise simultânea de diversos edulcorantes, incluindo estes que não são detectados por UV, com boa sensibilidade e linearidade satisfatória para os analitos foi possível com o acoplamento da cromatografia líquida (LC) à espectrometria de massas (MS). (ZYGLER, ANDRZEJ, NAMIESNIK, 2009).

#### 2.3.1.1.2 Espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida

Um espectrômetro de massas consiste basicamente de um injetor de amostras, uma fonte de ionização, uma vez que o analisador detecta apenas espécies carregadas, um analisador de massas e um processador de dados (GROSS, 2017). Um esquema é mostrado na Figura 4.

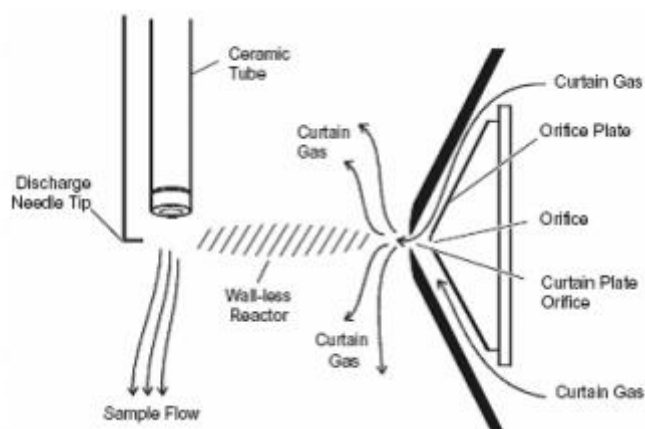


**Figura 4** - Esquema de um espectrômetro de massas Fonte: Elaborado pelo autor

O método de injeção de amostra depende de seu estado físico. Amostras gasosas advindas de um cromatógrafo a gás, por exemplo, podem ser facilmente injetadas em um MS e ionizadas (HENDERSON, McINDOE, 2005).

Diversos métodos de ionização podem ser aplicados a um espectrômetro de massas. A ionização por elétrons (EI) é uma das mais comuns, a qual pode fornecer dados tanto qualitativos quanto quantitativos. Contudo, necessita que os analitos sejam voláteis, e que já estejam na forma gasosa quando injetados no MS, e, portanto, macromoléculas, analitos com altos pontos de ebulição, biomoléculas, não são passíveis de tal técnica de ionização. Como estas características geralmente são comuns às moléculas analisadas por HPLC, a EI não é aplicável em técnicas de LC-MS. Para tal, técnicas de ionização à pressão ambiente, as quais promovem a dessorção do analito de soluções e sólidos, já foram desenvolvidas, como a dessorção à *laser* (LD), ionização por *electrospray* (ESI) e *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI), todas aplicáveis à LC. Dentre as metodologias de ionização existentes, a mais popular para métodos cromatográficos envolvendo compostos não voláteis é a ionização à pressão ambiente por *electrospray* (ESI) (GROSS, 2017; SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1997).

A ESI consiste basicamente na geração de um campo elétrico, o qual produz microgotas eletricamente carregadas, e na evaporação de solventes voláteis (GROSS, 2017). A Figura 5 esquematiza uma fonte de ESI utilizada em um instrumento da AB SCIEX® modelo 5500.



**Figura 5** - Esquema de uma fonte de ESI de um instrumento da AB SCIEX® modelo 5500. Fonte: Manual do Usuário AB SCIEX (AB SCIEX, 2011).

O mecanismo consiste em um fluxo contínuo de solvente contendo o analito por meio de um capilar carregado, representado na Figura 5 por um 'tubo de cerâmica' (*ceramic tube*), com um potencial elétrico em torno de 2-5 kV, gerando assim o *electrospray*. Este fluxo (*sample flow*) emerge então para uma câmara à pressão atmosférica, produzindo um fino *spray* com pequenas gotas eletricamente carregadas, devido à presença de um campo elétrico, processo denominado nebulização. Um fluxo contrário de gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) aquecido (*curtain gas*) evapora o solvente contido nas gotas aumentando a densidade de cargas até que as forças de repulsão superem a tensão superficial. A gota é então fragmentada, num processo denominado explosão Coulombica, produzindo gotas ainda menores, que passam pelo mesmo processo até que apenas os íons livres estejam presentes. Estes então são direcionados para os orifícios dos cones (*courtain plate orifice* e *orifice plate*), os quais funcionam como uma interface entre o ambiente de alta pressão (pressão ambiente) na fonte e o vácuo presente dentro do analisador de massas. A voltagem aplicada nestes cones acelera os analitos em relação às moléculas de gás neutro, ocorrendo colisões e possíveis fragmentações. Um sistema de lentes focaliza este feixe de íons produzidos até o analisador de massas (HENDERSON, McINDOE, 2005).

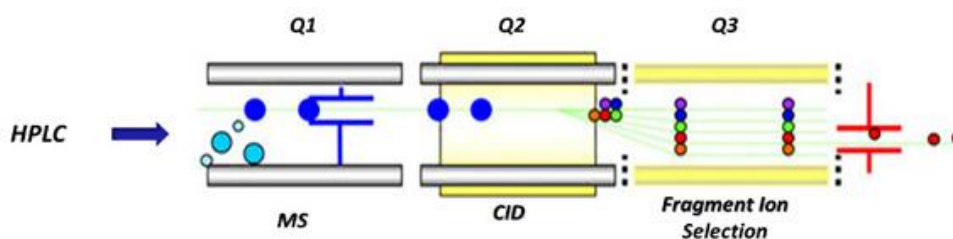
Em se tratando de analisadores de massa, os mais encontrados são os de setor magnético, quadrupolos lineares, quadrupolos *ion trap* e tempo de voo (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006). Alguns, como os de setor magnético, vem caindo em desuso devido ao seu elevado custo e tamanho, tendo em vista a existência de analisadores mais modernos. Um analisador por tempo de voo (TOF) baseia-se nas diferentes velocidades adquiridas pelos íons quando estes são submetidos à um campo elétrico. Uma vez que a velocidade é inversamente proporcional à raiz quadrada da massa, analitos com maior relação m/z irão demorar mais para atingir o detector que os analitos com menores m/z, ocorrendo assim a separação dos mesmos. Já em um analisador do tipo *ion trap*, íons injetados em um eletrodo na forma de um anel são presos em uma órbita tridimensional estável devido à presença de uma combinação de voltagens. A aplicação de uma frequência de ressonância permite a expulsão de uma relação m/z específica, gerando assim o espectro de massas. Um quadrupolo consiste

na disposição paralela de quatro barras cilíndricas, nas quais são aplicadas voltagens de mesmo sinal em barras opostas. Se um íon positivo adentra o quadrupolo, este tende a se aproximar das barras de sinal negativo. Caso esta barra mude de sinal antes do íon a atingir, este tende a ser repelido. Esta troca de sinal entre as barras do quadrupolo faz com que, a depender do módulo do potencial aplicado, íons de razão  $m/z$  específica entrem em uma trajetória estável e cheguem ao detector, enquanto os outros íons são desviados (HENDERSON, McINDOE, 2005).

O acoplamento da cromatografia, seja gasosa (GC-MS) ou líquida (LC-MS), à espectrometria de massas, permite tanto análises qualitativas como quantitativas. A obtenção de espectros de massas em modo *full scan* permite a obtenção de impressões digitais de amostras, mostrando os picos característicos de cada componente das mesmas. Estas análises qualitativas podem ser feitas por injeção direta em um instrumento de MS ou por GC-MS. Análises *target* são realizadas num modo conhecido como *selected ion monitoring* (SIM), o qual permite a seleção de relações  $m/z$ , podendo assim ser feita a análise apenas das moléculas de interesse. Este modo é utilizado para quantificações de analitos em amostras complexas, permitindo assim a obtenção de cromatogramas mais limpos e livres de interferentes (GROSS, 2017; HENDERSON, McINDOE, 2005).

Um sistema conhecido como triplo quadrupolo (QqQ) permite que o instrumento identifique íons de mesma massa em uma solução, caso estes gerem fragmentos diferentes após uma etapa de quebra. No primeiro quadrupolo, ocorre a separação dos íons pais, ou íons precursores, cuja relação  $m/z$  geralmente equivale a  $[M \pm H^+]$ , o chamado íon molecular, que corresponde à massa molar do analito mais ou menos um próton, a depender do modo de ionização (positivo ou negativo). Selecionados os íons pais, estes seguem para um segundo quadrupolo, preenchido com um gás inerte, onde, devido às colisões, os analitos irão se fragmentar de acordo com padrões específicos, gerando os íons filho, ou íons produto, característicos de cada molécula. Estes então irão ser separados em um terceiro quadrupolo, que irá selecionar o

fragmento advindo de cada íon precursor. Um esquema está representado na Figura 6 (HENDERSON, McINDOE, 2005).



**Figura 6** - Representação de uma configuração QqQ. Disponível em [http://congress.wooky.it/web/eventi/sin2012/diapo/video/1602\\_sinfigure\[1\].jpg](http://congress.wooky.it/web/eventi/sin2012/diapo/video/1602_sinfigure[1].jpg) (Acesso em 15/12/2018).

Este método de análise é conhecido como modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), e é passível de ser realizada também em outros tipos de analisador de massas além do quadrupolo (TOF, *ion trap*, etc.). Consegue elevar ainda mais o poder da espectrometria de massas, uma vez que elimina ainda mais interferentes que o modo SIM, sem a necessidade de se ter que trabalhar, por exemplo, em métodos de preparo de amostras mais eficientes e laboriosos, aumentando a seletividade e a sensibilidade do método (GROSS, 2017; HENDERSON, McINDOE, 2005).

Empresas têm desenvolvido equipamentos capazes de melhorar ainda mais a sensibilidade e seletividade da técnica. A ABSciex® possui um sistema de triplo quadrupolo o qual inclui também um sistema de *ion trap* (AB Sciex 5500 QTrap®). Este é capaz de aprisionar o íon de razão  $m/z$  específico, expulsando os demais, reduzindo, por exemplo, possíveis efeitos de matriz e melhorando a seletividade do espectrômetro de massas (AB SCIEX, 2019).

Em se tratando de análise de edulcorantes, uma revisão na literatura mostra o quanto estas técnicas envolvendo espectrometria de massas vêm se mostrando eficientes nas determinações. Koyama e colaboradores (2005) determinaram nove edulcorantes, dentre eles ACS, SAC, CIC, ASP, SUC, STV e RBD, em diversas matrizes de alimentos, a partir da hifenação das técnicas de HPLC e ESI-MS, utilizando o modo SIM, realizando a separação com uma coluna Zorbax Eclipse XDO-C18 (150 x 2,1 mm) e eluição com acetato de dibutilamônio e ACN-

Água (8:2). Yang e Chen (2009) também utilizaram a mesma técnica, determinando SAC, CIC, ASP, SUC, STV e outros como alitame e neotame em bebidas, frutas enlatadas e bolos. Realizaram a separação a partir de uma coluna Spherogel C18 (5 µm, 250 x 4,5 mm) e a fase móvel era composta por trietilamônio, metanol e ACN. Ambas as metodologias obtiveram limites de detecção (LD) na ordem de mg/kg.

Ordóñez e colaboradores realizaram determinações de edulcorantes artificiais em diversas matrizes, como água (ORDÓÑEZ et al., 2012), esgoto (ORDÓÑEZ et al., 2013) e bebidas (ORDÓÑEZ et al., 2015). A separação cromatográfica foi feita em uma coluna Luna C18 Phenomenex (100 X 2 mm, 3 µm), utilizando água e metanol acrescidos de 5mM de acetato de amônio para a ionização dos analitos, como fase móvel, em gradiente, para as matrizes de esgoto e água. Foi usada uma coluna Shodex ET-RP1 (150 x 3 mm, 4 µm) e a fase móvel composta por água acrescida de 5mM de acetato de amônio como fase aquosa e etanol como fase orgânica, em gradiente, para as determinações em bebidas. A detecção foi realizada em MS-ESI-QqQ, com ionização negativa, no modo MRM, em todas as matrizes estudadas.

Chang e Yeh (2014) separaram e determinaram 10 edulcorantes em alimentos, dentre eles um natural (STV). A separação foi realizada utilizando uma coluna Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl (150 x 4,6 mm, 5 µm), água e metanol acrescidos de 10 mM de acetato de amônio para a ionização dos analitos, com fase móvel, em gradiente. A detecção também foi realizada em MS-ESI-QqQ, no modo MRM, ionização negativa. Nestes casos, os limites de detecção ficaram na ordem de µg/kg (ppb), mostrando o quanto o modo MRM pode ser efetivo na detecção de níveis ainda mais baixos de edulcorantes, em diferentes amostras.

Diversas matrizes, desde amostras ambientais a produtos comerciais, já tiveram suas composições de edulcorantes estudadas. Contudo, trabalhos envolvendo produtos brasileiros, principalmente adoçantes de mesa, se mostraram escassos na literatura. Alguns produtos foram avaliados pelo INMETRO em 2006 em diversos pontos, como proporção de edulcorantes, contaminantes inorgânicos, rotulagem, etc., porém sem metodologia detalhada, sem publicação em revista científica, apenas nota divulgada à imprensa na época. Faz-se então necessário

um trabalho mais sistemático e atual de modo a avaliar a qualidade destes produtos, com divulgação em meio acadêmico das metodologias utilizadas, realizando-se também discussões mais técnicas sobre o tema.

### ***2.3.2 Análise elementar em adoçantes de mesa***

A Portaria n° 38, de 13 de janeiro 1998 da ANVISA (ANVISA, 1998) estabelece que os adoçantes de mesa não devem ultrapassar os níveis de componentes inorgânicos aceitáveis segundo o Decreto n° 55.871 de 26 de março de 1965. Os limites para metais contaminantes estão listados na Tabela 4. Portanto, o desenvolvimento de métodos de análise elementar destes produtos faz-se necessário.

Pouco se tem na literatura com relação a análise de metais em adoçantes de mesa. Os primeiros trabalhos foram realizados em 2004 por Porfirio, em que foram determinados macroelementos, aqueles necessários em doses iguais ou superiores a 100 mg/dia (Ca, P, S, Na, K, Cl, Mg), e microelementos em adoçantes de mesa por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), comparando-se diferentes métodos de preparo de amostra, por via seca (resíduo de cinzas), úmida (dissolução à frio e extração por micro-ondas) e injeção direta (sem tratamento prévio).

**Tabela 4** - Limites máximos de tolerância determinados pelo Decreto nº 55.871 de 26 de março de 1965 para contaminantes inorgânicos em alimentos em geral

Contaminantes inorgânicos	Limite máximo de tolerância (LMT)/ ppm
Antimônio	2,00
Arsênio	1,00
Cádmio	1,00
Cobre	30,0
Cromo	0,10
Estanho	250,0
Mercúrio	0,01
Níquel	5,00
Selênio	0,05
Zinco	50,0
Chumbo	0,80

Fonte: Brasil (1965).

Posteriormente, em 2006, de Sousa e colaboradores determinaram espécies inorgânicas em amostras de adoçantes líquidos compostas por esteviosídeo e misturas de ciclamato-sacarina, sem nenhum preparo de amostra. Os analitos foram determinados por ICP-OES. Mais tarde, em 2007 (de SOUSA et al., 2007), o grupo utilizou digestão ácida ( $\text{HNO}_3(\text{conc.})$  + peróxido de hidrogênio) em chapa aquecedora para a determinação de compostos inorgânicos em adoçantes líquidos à base de aspartame. Estas foram feitas por ICP-OES para analitos mais concentrados e por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) em casos de analitos em nível traço. Estes autores realizaram também a determinação de selênio por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) em amostras compostas por glicosídeos de esteviol, sacarina-ciclamato e aspartame (de SOUSA et al., 2009). Sousa e colaboradores ainda realizaram mais algumas determinações em amostras sólidas, também constituídas de glicosídeos de esteviol, sacarina-ciclamato e aspartame, por ICP-OES (SOUSA, BACCAN, CADORE, 2011).

### 2.3.2.1 Preparo de amostra: Digestão ácida assistida por micro-ondas

As técnicas mais comumente utilizadas para análise elementar envolvem emissão e absorção atômica. Estas demandam, na maioria dos casos, um preparo da amostra cuidadoso, de modo a deixá-la em condições mais

adequadas (em solução), separando, purificando, isolando o(s) analito(s), tornando-o(s) mais disponível(is) e melhorando a determinação do(s) mesmo(s) (BIZZI et al., 2017).

Uma vez que os edulcorantes são compostos orgânicos e que as concentrações de metais presentes, em sua maioria, estão em níveis traço, faz-se necessário garantir que estes íons estejam livres em solução, condição mais adequada para análise. Para isso, uma metodologia comum é a utilização de misturas de ácidos oxidantes, podendo ser utilizados individualmente ou em conjunto, com peróxido de hidrogênio, processo denominado dissolução ou digestão (KRUG, 2010).

Os ácidos mais comumente utilizados são o nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), o sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), o clorídrico ( $\text{HCl}$ ), o fluorídrico ( $\text{HF}$ ) e o perclórico ( $\text{HClO}_4$ ), sendo estes dois últimos preferencialmente evitados, devido à maior periculosidade. O  $\text{HNO}_3$  e o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  podem agir como agente oxidante sem a presença de outro ácido (HOENIG, de KERSABIEC, 1996). Contudo, processos de digestão envolvendo apenas ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio são extremamente lentos, sendo esse mais utilizado em determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl. O ácido nítrico apresenta a desvantagem de possuir um baixo ponto de ebulição ( $120\text{ }^\circ\text{C}$ ), limitando sua eficiência oxidativa em pressão atmosférica, mas sua fácil purificação e remoção da solução após a digestão torna-o mais versátil para esse procedimento (HOENIG, de KERSABIEC, 1996; KRUG, 2010). De modo a aumentar a eficiência do ácido nítrico nos processos de decomposição de amostras, podem ser utilizados sistemas fechados, de alta pressão, já que maiores temperaturas são atingidas e sua capacidade de decompor a matéria orgânica é aumentada, uma vez que a taxa de reação aumenta com a temperatura (KRUG, 2010).

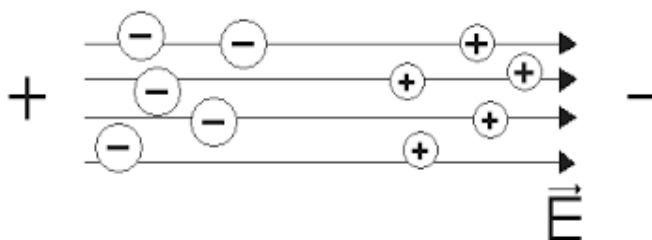
Assim, no intuito de melhorar a eficiência dos processos de digestão, diminuindo possíveis interferências espectrais e não-espectrais nas técnicas envolvendo ICP, o uso de radiação micro-ondas tem se mostrado promissor, tendo em vista que a técnica permite o uso de ácidos diluídos em recipientes fechados, atingindo ainda altas pressões e temperaturas (BIZZI et al., 2017).

### 2.3.2.1.1 Radiação micro-ondas no preparo de amostras: fundamentos teóricos

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas, ou seja, uma propagação de campos elétricos e magnéticos, numa faixa de frequência de 300 a 3000 MHz (HALLIDAY, RESNICK, 2016).

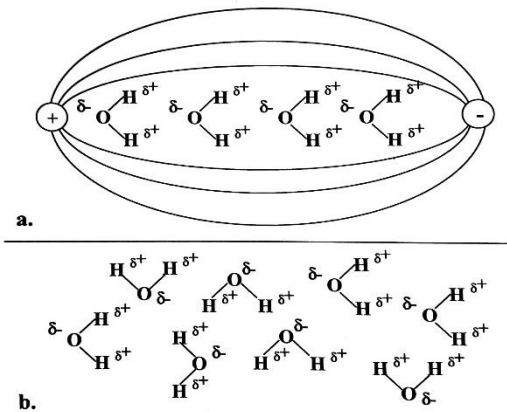
O aquecimento por micro-ondas se dá basicamente a partir de dois fenômenos: a migração iônica, relacionada à interação da radiação com íons em solução, e a rotação de dipolos, resultante da interação das ondas com o solvente, quando este apresenta moléculas com dipolos permanentes ou induzidos (KRUG, 2010).

Quando os íons interagem com o campo elétrico da radiação micro-ondas, um fluxo de corrente é gerado, sofrendo resistência com fluxos de íons contrários, gerando calor e aquecendo o meio (Figura 7) (KRUG, 2010)



**Figura 7** - Figura representativa de uma migração de íons quando incididos por um campo elétrico Fonte: Adaptado de KRUG (2010).

A interação com o solvente se dá devido às cargas parciais geradas pelo dipolo presente nas moléculas. Na presença de um campo elétrico de radiação eletromagnética, as moléculas são alinhadas devido à interação com as cargas negativas e positivas geradas pelo campo em que estão submetidas. Quando retornam à desordem, calor é gerado, contribuindo para o aquecimento do sistema (Figura 8) (KRUG, 2010).

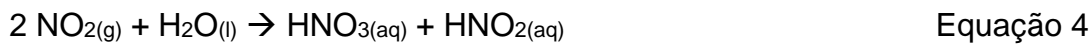
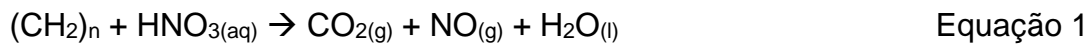


**Figura 8** - Modelo esquemático da rotação de dipolo, mostrando (a) o alinhamento das moléculas na presença de um campo eletromagnético (b) a desordem exotermicamente reestabelecida na ausência desse. Fonte: Adaptado de KRUG (2010).

#### 2.3.2.1.2 O emprego de ácidos diluídos no processo de digestão

Diversas interferências já foram relatadas em relação à presença de carbono dissolvido na amostra, quando analisadas por técnicas de ICP, devido à formação de adutos de carbono com certos metais quando estes atingem o plasma. Portanto, é de suma importância a remoção desse carbono dissolvido, o qual se encontra na forma de matéria orgânica, fazendo do processo de digestão ainda mais essencial para este tipo de técnica de análise (BIZZl et al., 2017).

Devido ao seu fácil manuseio e os bons resultados obtidos na decomposição da matéria orgânica, o ácido nítrico vem sendo o principal agente oxidante utilizado em processos de digestão. Estudos ainda mostraram que, além da alta pressão e temperatura atingidos em recipientes fechados sob ação de micro-ondas, a presença de gás oxigênio na fase gasosa dentro do recipiente de digestão aumenta ainda mais a eficiência do ácido, uma vez que este é regenerado em uma cadeia de reações esquematizada a seguir, pelas Equações 1-5. Este ciclo se procede enquanto houver matéria orgânica no meio, produzindo NO, e oxigênio na fase gasosa (BIZZl et al, 2010).



Fonte: Adaptado de BIZZI et al. (2010).

O ácido nítrico, ao decompor a matéria orgânica, produz óxido nitroso que, ao reagir com o oxigênio oriundo da decomposição do peróxido de hidrogênio, produz óxido nítrico. Este então reage com a água presente no meio, restituindo o ácido nítrico, que continua a reagir com a matéria orgânica, dando continuidade ao ciclo de reações.

Trabalhos realizados por Dugenest e colaboradores (1998) e Zhou e colaboradores (1996) mostraram melhores resultados da utilização de ácido nítrico diluído em digestão assistida por micro-ondas. Comparado ao uso do ácido concentrado,  $\text{HNO}_3$  diluído gerou menos resíduos, produziu menores desvios entre replicatas e não necessita de altos fatores de diluição previamente à análise, além de evitar possíveis danos às partes dos equipamentos (GONZALES et al., 2006). Araújo e colaboradores (2002) mostraram que o uso de ácido concentrado gerou digeridos mais complexos, indicando que reações de oxidação mais aleatórias ocorrem neste caso.

Outro fator que corrobora o uso de ácidos diluídos é a boa capacidade de absorção de radiação pela água, resultando em um melhor aquecimento do sistema (KRUG, 2010).

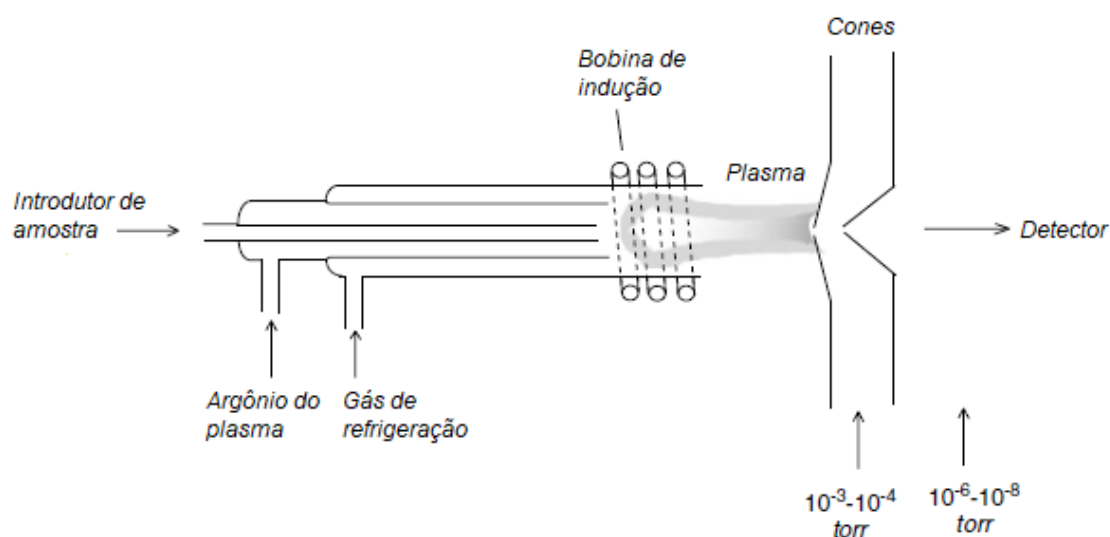
### 2.3.2.2 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado: ICP-MS

As técnicas de espectrometria atômica são as mais utilizadas quando se tem como objetivo a análise elementar (BIZZI et al., 2017). Dentre elas, a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) fornece boa sensibilidade além de permitir análise multielementar. Porém, para concentrações ultra traço, podem ocorrer muitas interferências espectrais. Para tais níveis, a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) é a técnica mais adequada, devido à sua alta sensibilidade

e rapidez na determinação de diversos analitos simultaneamente. Entretanto, a principal desvantagem desta técnica está relacionada ao alto custo de análise e manutenção (NAGESWARA, TALLURI, 2007).

### 2.3.2.2.1 Fonte de íons: Plasma Indutivamente Acoplado (ICP)

Na técnica de ICP-MS, o plasma (Figura 9) funciona como a fonte de íons. É capaz de atingir temperaturas de cerca de 10.000 K nas regiões mais próximas da bobina, obtendo êxito na quebra de ligações químicas, independentemente de sua natureza. Além disso, a alta densidade de íons presentes favorece colisões, melhorando a ionização dos elementos, e melhorando a sensibilidade (AMMANN, 2007).



**Figura 9** - Esquema de um gerador de plasma. Fonte: Adaptado de AMMANN (2007).

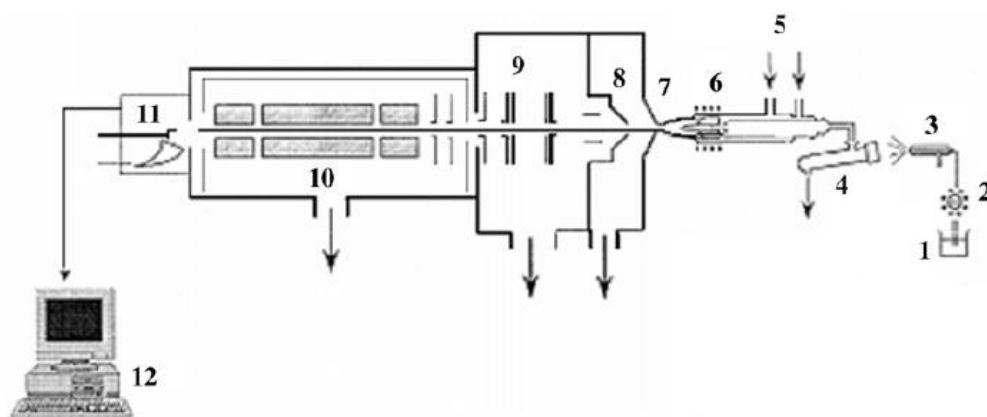
A produção do plasma se dá pela introdução de argônio ultrapuro pela entrada de gás. Uma faísca ioniza o gás, e os elétrons são acelerados pela bobina de indução. Estes então colidem com os átomos, transferindo energia para todo o gás, mantendo a temperatura do plasma entre 6.000-10.000 K. Um fluxo de argônio externo resfria as paredes do tubo e centraliza o plasma radialmente (HARRIS, 2005).

A forma mais comum de introdução de amostra em um ICP é a partir de um nebulizador, o qual converte a solução aquosa aspirada em pequenas gotículas, as quais são transportadas até o plasma, onde as moléculas têm suas ligações

rompidas e os átomos são ionizados, para serem então levados ao analisador, um espectrômetro de massas (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

#### 2.3.2.2.2 Analisador: Espectrômetro de massas atômico (MS)

A espectrometria de massas é uma técnica que se baseia na relação massa/carga ( $m/z$ ) dos analitos, separando assim os íons de interesse (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009). Um esquema de um ICP-MS é mostrado na Figura 10.



**Figura 10** - Esquema representativo de um ICP-MS, ilustrando suas partes principais: (1) amostra em solução; (2) bomba; (3) nebulizador; (4) câmara de spray; (5) entrada de Ar para o plasma e refrigeração; (6) bobinas de indução/tocha; (7) cone de amostragem; (8) skimmer; (9) lentes focalizadoras; (10) analisador de massas tipo quadrupolo; (11) detector tipo multiplicador de elétrons; (12) coletor de dados. Fonte: Adaptado de NAGESWARA, TALLURI, (2007).

Após a amostra passar pelo processo de nebulização, atingir a região do plasma e ter os átomos ionizados, estes chegam ao cone de amostra, onde o gás sofre uma expansão e, conseqüentemente, um resfriamento, e ao *skimmer*, que direciona os íons até a interface do espectrômetro de massa. Lentes focalizam esse feixe de íons até o analisador de massas, sendo mais comum o do tipo quadrupolo, onde estes íons serão separados pela sua relação  $m/z$ . Em seguida, um detector, tipicamente um multiplicador de elétrons, amplifica o sinal recebido, que é lançado para o coletor de dados, fornecendo assim a resposta analítica (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009; NAGESWARA, TALLURI, 2007).

O acoplamento do ICP com o MS fez desse instrumento de análise um dos mais sensíveis e eficazes na determinação de elementos em níveis ultra traço. Contudo, ainda não é uma técnica perfeita, apresentando também algumas limitações. Além do alto custo de uso e manutenção, problemas como de interferências isobáricas podem ocorrer durante a análise, em que espécies poliatômicas podem se formar, apresentando uma mesma razão  $m/z$  da espécie de interesse. Alguns métodos já foram desenvolvidos para tentar reduzir estas interferências, como por exemplo a inclusão de uma célula de reação/ colisão (ROSEN, HIEFTJE, 2007).

As células de colisão funcionam baseando-se no princípio de que após as colisões com moléculas de gás inerte, a energia cinética de íons atômicos diminui menos que a energia dos íons poliatômicos com a mesma massa. Uma barreira de potencial suficientemente alta impede que íons mais lentos cheguem ao detector, separando os analitos e diminuindo as interferências. Atualmente, o gás hélio é o mais utilizado nestas células. Já nas células de reação, o analito reage com certo gás, geralmente  $H_2$ , de modo a se obter um produto de massa diferente, sendo este então analisado. Desse modo, interferentes de mesma massa serão excluídos no segundo quadrupolo do analisador (YAMADA, 2015).

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve como objetivo geral a determinação de edulcorantes e constituintes inorgânicos em adoçantes de mesa, verificando possíveis contaminações com elementos tóxicos e discrepâncias existentes nos rótulos destes produtos.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenvolver e validar um método cromatográfico para quantificação de edulcorantes artificiais e naturais em adoçantes de mesa;
- Verificar se existem irregularidades na rotulagem dos produtos, quanto à composição informada pelas mesmas;
- Comparar as proporções de cada edulcorante nos produtos compostos por misturas;
- Validar um método de preparo de amostras eficiente para a determinação elementar em adoçantes de mesa por plasma indutivamente acoplado à espectrometria de massas (ICP-MS);
- Quantificar constituintes inorgânicos em adoçantes de mesa, e verificar a adequação das amostras analisadas à legislação

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste trabalho consistem de adoçantes de mesa tanto líquidos como sólidos, de composições variadas, contendo edulcorantes artificiais e naturais. Estas foram obtidas em diversos estabelecimentos, como supermercados, restaurantes, lanchonetes e cafeterias, tanto no Brasil como em outros países, totalizando 50 amostras. Na Tabela 5 estão relacionadas as amostras, os códigos atribuídos, a composição (de acordo com o rótulo) e país de origem (fabricação).

**Tabela 5** - Relação de amostras líquidas (nL) e sólidas (nS) de adoçantes de mesa utilizadas neste trabalho, os respectivos conteúdos em edulcorantes e demais componentes de acordo com o rótulo e país de procedência

<b>Código</b>	<b>Composição</b>	<b>Fabricação</b>
<b>1L*</b>	Glicosídeos de esteviol; NaBz; Metilparabeno; HCit	Brasil
<b>2L*</b>	CIC; SAC; SUC; Sorbitol; HBz	Brasil
<b>3L*</b>	CIC; SAC; Glicosídeos de esteviol; HBz; Metilparabeno; Sorbitol	Brasil
<b>4L*</b>	CIC; SAC; Glicosídeos de esteviol; Sorbitol; NaBz; KSor; HCit	Brasil
<b>5L*</b>	CIC; SAC; ACS; Glicosídeos de esteviol; NaBz; Metilparabeno; HCit	Brasil
<b>6L*</b>	SAC; CIC; Sorbitol; Metilparabeno; HBz	Brasil
<b>7L*</b>	CIC; SAC; ACS; Sorbitol; NaBz; Metilparabeno; HCit??	Brasil
<b>8L*</b>	SUC; ACS; Metilparabeno	Brasil
<b>9L*</b>	Glicosídeos de esteviol; Sorbato; HCit	Brasil
10L	CIC; SAC; Metilparabeno	Brasil
11L	Glicosídeos de esteviol	Brasil
12L	ASP; CIC; NaCl; Sorbitol; Xantana; Propilenoglicol; Sorbato de Sódio; Metilparabeno	Brasil
13L	ASP; Sorbitol; HCit; NaBz; Na3Cit	Brasil
14L	ASP; ACS; NaBz; Metilparabeno; Xantana; HCit	Brasil
15L	ASP; Sorbitol; Propilenoglicol; Maltodextrina; NaBz	Brasil
<b>1S*</b>	CIC; SAC; ASP; ACS; SiO <sub>2</sub> ; Dextrose	Brasil
2S	CIC; ASP; SAC; SiO <sub>2</sub> ; Lactose	Brasil
3S	ASP; Lactose; SiO <sub>2</sub>	Brasil
<b>4S*</b>	ASP; Lactose; SiO <sub>2</sub>	Brasil
<b>5S*</b>	SUC; ACS; Lactose; SiO <sub>2</sub>	Brasil
<b>6S*</b>	Glicosídeos de esteviol; NaHCO <sub>3</sub> ; Mg; Isomalte; HTar	Alemanha
7S	CIC; SAC; NaHCO <sub>3</sub> ; NaCit; Lactose	Alemanha
8S	CIC; SAC; NaCit; NaHCO <sub>3</sub> ; Lactose	Alemanha
<b>9S*</b>	ACS; ASP; Dextrose; Maltodextrina; SiO <sub>2</sub>	Inglaterra
10S	CIC; SAC; NaHCO <sub>3</sub> ; NaCit	Suíça

**Tabela 6** - Relação de amostras líquidas (nL) e sólidas (nS) de adoçantes de mesa utilizadas neste trabalho, os respectivos conteúdos em edulcorantes e demais componentes de acordo com o rótulo e país de procedência

11S	CIC; ACS; Sacarose	Itália
<b>12S*</b>	SAC; ACS; Dextrose; Frutose	Itália
<b>13S*</b>	CIC; SAC; Dextrose	Itália
<b>14S*</b>	CIC; ACS; Sacarose	Itália
15S	SAC; Eritritol	Itália
16S	CIC; SAC; Dextrose	Itália
<b>17S*</b>	CIC; ACS; Sacarose	Itália
18S	SAC; CIC; Dextrose	Itália
19S	ASP	Portugal
20S	ASP; Lactose; NaHCO <sub>3</sub> ; Leucina;	Portugal
21S	ASP; ACS	Portugal
<b>22S*</b>	ASP; Dextrose	Portugal
23S	CIC; SAC; Celulose; Carboximetilcelulose; Dextrose; Leucina; NaCit	Portugal
24S	ASP; Lactose; SiO <sub>2</sub>	Brasil
25S	SUC; ACS; Lactose; Maltodextrina; SiO <sub>2</sub>	Brasil
26S	ASP; ACS; Lactose; Maltodextrina; SiO <sub>2</sub>	Brasil
27S	SUC; ACS; Lactose; SiO <sub>2</sub>	Brasil
28S	CIC; SAC; Sacarose; SiO <sub>2</sub>	Brasil
<b>29S*</b>	SUC	Peru
30S	CIC; ASP; Lactose; SiO <sub>2</sub>	Brasil
31S	CIC; SAC; ASP; ACS	Brasil
32S	Glicosídeos de esteviol; Lactose; SiO <sub>2</sub>	Brasil
<b>33S*</b>	Glicosídeos de esteviol; Lactose; SiO <sub>2</sub>	Brasil
<b>34S*</b>	CIC; ASP; SAC; Dextrose; SiO <sub>2</sub>	Brasil
35S	Glicosídeos de esteviol; Lactose; SiO <sub>2</sub>	Brasil

1 NaBz = benzoato de sódio; HCit = ácido cítrico; HBz = ácido benzoico; NaCit = Citrato de sódio; HTar = ácido tartárico.  
2 Amostras utilizadas para as análises inorgânicas estão identificadas com asterisco (\*) e em negrito.

## 4.2 DETERMINAÇÃO DE EDULCORANTES EM ADOÇANTES DE MESA

### 4.2.1 Instrumentação e Reagentes

Padrões analíticos de sacarina sódica, ciclamato de sódio, aspartame, sucralose ( $\geq 98\%$ ), acessulfame-K, esteviosídeo ( $\geq 95\%$ ) e rebaudiosídeo A ( $\geq 90\%$ ) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA). As diluições foram realizadas com água ultrapura ( $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ , Millipore, Bedford, MA, EUA).

A separação dos edulcorantes foi realizada em cromatógrafo à líquido Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). A coluna utilizada foi Luna 3u C18 100 A (150 x 2,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA),

protegida por um sistema de pré-coluna de cartucho C18 4 x 2 mm (Phenomenex, Torrance,, CA, EUA). A temperatura do forno da coluna foi ajustada para 60 °C, e o volume de injeção foi de 10 µL. A fase móvel consistiu de um gradiente composto por água (A) e metanol (J.T. Baker, México) (B) acrescidos de 5 mmol L<sup>-1</sup> de acetato de amônio (Merck, Darmstad, Alemanha). A vazão foi de 0,3 mL min<sup>-1</sup> e o gradiente de eluição utilizado está esquematizado na Tabela 6. O método utilizado foi baseado nos trabalhos de Ordoñez e colaboradores (2012; 2013; 2015)

A detecção foi realizada em espectrômetro de massas ESI-QqQ (Applied Biosystems ABSciex QTrap 5500, Foster City, CA, EUA) utilizando o modo de ionização negativo e MRM. A fonte foi colocada à uma temperatura de 450 °C e a voltagem do *ion-spray* foi de 4 kV. As transições de MRM, além de outros parâmetros do instrumento para cada analito estão descritos na Tabela 7. Tais parâmetros foram determinados automaticamente pelo instrumento a partir de injeção direta no espectrômetro de massas de soluções padrão dos analitos. Os dados foram adquiridos pelo software Analyst®, v. 1.4.2.

**Tabela 7** - Gradiente utilizado na separação cromatográfica de edulcorantes em adoçantes de mesa

Tempo/ min	%A	%B
0	95	5
1	90	10
3	50	50
4	50	50
4,06	30	70
6	5	95
8	5	95
10	95	5
15	95	5

**Tabela 8** - Transições de MRM e parâmetros instrumentais de análise utilizadas no MS-ESI-QqQ. A primeira transição corresponde ao par de quantificação e a segunda de confirmação, para cada analito

Analito	Transição MRM		DT/ mseg	DP/ V	CE/ V	CXP/ V
SAC	182	42	150	-95	-66	-21
	182	62				
CIC	178	80	150	-90	-36	-11
	178	96				
ASP	293	201	150	-85	-18	-7
	293	146				
SUC	455	395	150	-50	-14	-15
	457	397				
ACS	162	82	150	-45	-20	-5
	162	78				
STV	641	479	150	-245	-58	-15
	641	317				
RBD	966	804	150	-195	-40	-33
	966	642				

DT = *Dwell Time*; DP = *Declustering Potencial*; CE = *Collision Energy*; CXP = *Collision Cell Exit Potential*. ACS = *Acessulfame-K*; SAC = *Sacarina*; CIC = *Ciclamato*; ASP = *Aspartame*; SUC = *Sucralose*; STV = *Esteviosídeo*; RBD = *Rebaudiosídeo*.

#### 4.2.2 Preparo das amostras

Para as amostras sólidas foram pesados 10 mg em tubos de polietileno de 50,0 mL. As amostras líquidas tiveram alíquotas de 10 µL transferidas para tubos de polietileno de 50,0 mL, cujas massas também foram registradas. Todas as amostras foram preparadas em triplicatas independentes e então dissolvidas/diluídas em 50,0 mL de água ultrapura.

Para as análises cromatográficas, diferentes fatores de diluição foram utilizados, de acordo com a concentração dos analitos nos adoçantes. Os teores em % (massa/massa) foram determinados por interpolação em curvas analíticas para cada analito seguida pela multiplicação do valor encontrado pelos respectivos fatores de diluição e divisão pela massa pesada de cada amostra.

### 4.2.3 Validação do método cromatográfico

A validação do método foi realizada com base na Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos (DOC-CGCRE-008, julho/ 2018) elaborada pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2018).

Os LD e LQ foram determinados a partir da injeção de 10 brancos analíticos (contendo apenas o solvente utilizado, no caso, água ultrapura) e calculados a partir das Equações 6 e 7, respectivamente.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{b} \quad (\text{Equação 6})$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{b} \quad (\text{Equação 7})$$

Nas equações,  $b$  é o coeficiente angular das curvas analíticas para cada analito e  $s$  ( $n=10$ ) o desvio padrão obtido para os brancos. Para a determinação dos limites do método, utilizou-se as Equações 8 e 9, utilizando para isto o maior fator de diluição utilizado (400 vezes).

$$LD_{\text{metodo}} = \frac{[(LD \times f_{\text{diluição}}) \times V_1]}{m_{\text{amostra}}} \quad (\text{Equação 8})$$

$$LQ_{\text{metodo}} = \frac{[(LQ \times f_{\text{diluição}}) \times V_1]}{m_{\text{amostra}}} \quad (\text{Equação 9})$$

,onde  $f_{\text{diluição}}$  é o fator de diluição,  $V_1$  é o volume final da primeira diluição e  $m_{\text{amostra}}$  é a massa de amostra pesada.

Determinou-se a faixa linear de cada analito. Para tal, preparou-se uma curva de calibração que compreendeu a faixa de 5-1.000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e fez-se a verificação visual da faixa linear para cada analito.

A faixa de trabalho foi escolhida dentro da faixa linear determinada anteriormente, e a avaliação da linearidade foi feita. Foram preparadas curvas analíticas na faixa de trabalho de cada analito, em triplicata, em níveis igualmente espaçados entre si (Tabela 8). A verificação de possíveis *outliers* foi feita de acordo com o teste dos resíduos padronizados de Jackknife. A

normalidade dos resíduos foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner e a homoscedasticidade verificada pelo teste de Brown-Forsythe. Por último o modelo foi construído a partir do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) e teve sua significância e ajuste avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, a partir de testes-F (INMETRO, 2018).

**Tabela 9** – Curvas analíticas utilizadas para cada edulcorante

Edulcorante	C Padrão ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )						
	P1 N1	P2	P3	P4 N2	P5	P6	P7 N3
Sacarina	<b>20</b>	50	80	<b>110</b>	140	170	<b>200</b>
Ciclamato	<b>20</b>	50	80	<b>110</b>	140	170	<b>200</b>
Aspartame	<b>20</b>	50	80	<b>110</b>	140	170	<b>200</b>
Sucralose	<b>60</b>	100	140	<b>180</b>	220	260	<b>300</b>
Acessulfame	<b>80</b>	100	120	<b>140</b>	160	180	<b>200</b>
Esteviosídeo	<b>40</b>	100	160	<b>220</b>	280	340	<b>400</b>
Rebaudiosídeo	<b>40</b>	100	160	<b>220</b>	280	340	<b>400</b>

Três níveis diferentes usados nos estudos de precisão e veracidade: nível baixo (N1), nível médio (N2) e nível alto (N3).

Os estudos de precisão (repetitividade) e veracidade (em termos da recuperação) foram realizados a partir da fortificação de uma amostra aleatória em três níveis diferentes, nível baixo (N1), nível médio (N2) e nível alto (N3), dentro da curva de calibração de cada analito, os quais estão destacados na Tabela 8. As análises foram feitas em seis replicatas para cada nível, e a precisão foi avaliada pelo cálculo do DPR (%) (Equação 10) e a recuperação foi calculada pela Equação 11.

$$\%(DPR) = \frac{s}{C_{\text{média}}} \times 100 \quad (\text{Equação 10})$$

$$\%Recuperação = \left( \frac{C_{\text{total}} - C_{\text{média}}}{C_{\text{fortificada}}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 11})$$

sendo  $s$  o desvio padrão ( $n=6$ ),  $C_{\text{média}}$  a concentração média da amostra,  $C_{\text{total}}$  a concentração fortificada mais a presente na amostra,  $C_{\text{fortificada}}$  a concentração do analito adicionada.

## 4.3 QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS EM ADOÇANTES DE MESA

### 4.3.1 Instrumentação e reagentes

Uma solução padrão multielementar ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) contendo Al, As, Ba, Be, Cd, Ca, Cs, Cr, Co, Cu, Ga, Fe, Pb, Li, Mg, Mn, Ni, K, Rb, Se, Ag, Na, Sr, Tl, U, V e Zn (Scientific Elemental, Omaha, NE, EUA) foi utilizada para o preparo da curva analítica e para a fortificação das amostras nos estudos de adição e recuperação. Para o procedimento de digestão ácida, ácido nítrico 65% (m/v) destilado e peróxido de hidrogênio 30% (v/v) foram adquiridos da Merck, (Darmstadt, Alemanha). Para a otimização do ICP-MS, solução *tuning* contendo  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ce, Co, Li, Mg, Tl, e Y em matriz de ácido nítrico 2% (Agilent Technologies, EUA) foi usada.

Todas as vidrarias e tubos de polietileno utilizados foram deixados em banho de ácido nítrico (Vetec, RJ) 10% (v/v) durante pelo menos 24 horas e posteriormente enxaguados com água ultrapura ( $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ , Millipore, Bedford, MA, EUA). Água ultrapura foi também utilizada para o preparo de todas as soluções durante a análise. Para pesagem das amostras uma balança analítica (Shimadzu, AUW220D, Kyoto, Japão) foi utilizada.

O ácido nítrico foi destilado utilizando um sistema de destilação Milestone (Sorisole, Itália). A digestão ácida foi realizada em forno micro-ondas modelo ETHOS 1 da Milestone (Sorisole, Itália), com rotor para 24 frascos de média pressão (PRO-24, 30 bar, ETHOS). Uma centrífuga (QUIMIS, modelo 0222E24, Diadema, SP, Brasil) foi utilizada na centrifugação das amostras. As análises foram realizadas em um ICP-MS Agilent 7700 (Agilent Technologies, Japão), equipado com célula de colisão. Os parâmetros utilizados e os isótopos analisados estão descritos na Tabela 9. Os analitos susceptíveis a interferências poliatômicas foram determinados no modo He (célula de colisão) e os demais no modo *no gas*.

**Tabela 10** - Condições instrumentais de análise do ICP-MS

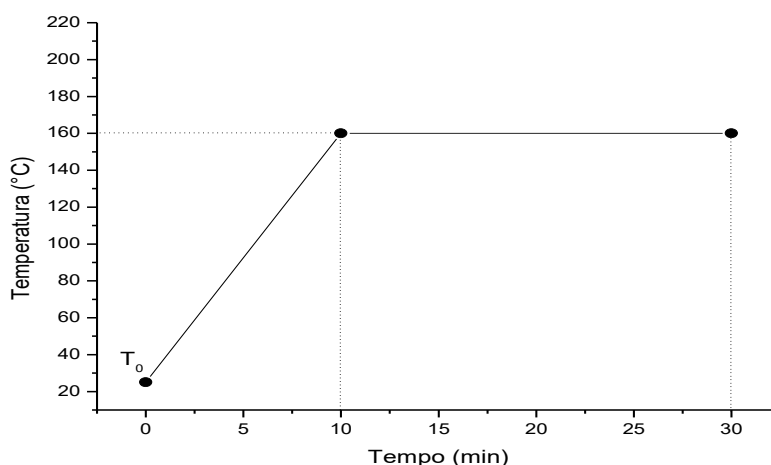
Parâmetro	Condição instrumental
Potência RF <sup>a</sup>	1550 V
Fluxo do gás de arraste ( <i>Carrier gas</i> )	1,09 L min <sup>-1</sup> ( <i>no gas</i> ); 1,20 L min <sup>-1</sup> ( <i>He mode</i> )
RF da célula de colisão	190 V ( <i>no gas</i> ); 200 V ( <i>He mode</i> )
Fluxo de He	4,7 mL L <sup>-1</sup>
Isótopos	
Modo de análise	<p>“He-mode”                   <sup>9</sup>Be, <sup>24</sup>Mg, <sup>27</sup>Al, <sup>44</sup>Ca, <sup>51</sup>V, <sup>52</sup>Cr, <sup>55</sup>Mn, <sup>56</sup>Fe, <sup>59</sup>Co, <sup>60</sup>Ni, <sup>63</sup>Cu, <sup>66</sup>Zn, <sup>75</sup>As, <sup>82</sup>Se, <sup>85</sup>Rb, <sup>88</sup>Sr, <sup>107</sup>Ag, <sup>133</sup>Cs, <sup>137</sup>Ba, <sup>204</sup>Pb</p> <p>“No gas-mode”                   <sup>7</sup>Li, <sup>111</sup>Cd, <sup>238</sup>U</p>

<sup>a</sup>RF = Radiofrequência.

#### 4.3.2 Preparo das amostras

Algumas amostras foram selecionadas para a determinação elementar, de acordo com a quantidade disponível. As amostras utilizadas estão destacadas em negrito e com asterisco (\*) na Tabela 5.

Os adoçantes (300 mg) foram pesados diretamente em tubos de Teflon® próprios para digestão ácida assistida por micro-ondas à média pressão. As amostras sólidas em forma de comprimidos foram, previamente, maceradas em pistilo de ágata e transferidas para recipientes fechados. Foram adicionados aos tubos 2,00 mL de HNO<sub>3</sub> destilado concentrado, 4,00 mL de água ultrapura e 1,00 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, os quais foram, em seguida, fechados e colocados no forno de micro-ondas. O programa de aquecimento utilizado está apresentado na Figura 11. Os volumes e programa de aquecimento foram selecionados com base em trabalhos na literatura (BIZZI et al., 2017; NÓBREGA et al., 2012), e adaptados para a matriz em estudo.



**Figura 11** - Programa de aquecimento utilizado no forno micro-ondas para do preparo de amostras precedente à análise por ICP-MS

A potência máxima do forno foi de 1.000 W. Após o aquecimento por 30 min, os frascos permaneceram dentro do forno micro-ondas por mais 30 min para resfriamento. Em seguida, os frascos foram abertos e a solução resultante foi transferida para frascos de polietileno de 50,0 mL e seus volumes foram completados para 15,0 mL. Para reduzir a concentração ácida e remover qualquer partícula em suspensão, alíquotas de 1,5 mL das amostras foram adicionadas em microtubos de polietileno e os volumes completados com água ultrapura para 2,0 mL. Estes foram então centrifugados a 16.128 g por 5 min e levados para análise em ICP-MS. As amostras foram analisadas em triplicatas independentes.

#### **4.3.3 Validação**

Assim como o método anterior para a determinação dos edulcorantes, este método foi também validado de acordo com o DOC-CGCRE-008, julho/ 2018 elaborado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2018).

Para a determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), 10 brancos analíticos (contendo apenas solvente – água) foram submetidos ao processo de digestão ácida assistida por micro-ondas e analisados por ICP-MS. A média da resposta para cada elemento foi calculada, assim como o(s) respectivo(s) desvio(s) padrão, e os limites da técnica calculados pelas

Equações 6 (LD) e 7 (LQ). Os limites de detecção e quantificação do método foram calculados a partir das Equações 8 (LD) e 9 (LQ).

A linearidade foi avaliada a partir de curvas de calibração preparadas em 8 níveis de concentração (0-1-5-10-15-30-50-80  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em triplicata. A existência de *outliers* foi verificada a partir do teste de resíduos padronizados Jackknife e a normalidade dos mesmos foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner. A homoscedasticidade foi verificada pelo teste de Brown-Forsythe, e a significância e ajuste do modelo, o qual foi construído pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários, foram examinadas pela Análise de Variância (ANOVA), a partir de testes-F de acordo com os graus de liberdade após a retirada de *outliers* (INMETRO, 2018). Uma vez que as amostras apresentavam composições diferentes, o efeito de matriz foi avaliado para três amostras consideradas mais complexas utilizando os resultados da adição e recuperação.

A precisão (repetitividade) foi determinada pelo cálculo do desvio padrão relativo (%DPR) (Equação 10) de amostras fortificadas, em triplicata (1S, 33S e 9L). As mesmas amostras fortificadas foram utilizadas no estudo de recuperação, cujo resultado foi calculado pela Equação 11.

A fortificação foi realizada adicionando-se 60  $\mu\text{L}$  do padrão multielementar de 10  $\text{mg L}^{-1}$  às amostras antes do processo de digestão, fornecendo uma concentração adicionada final, após todas as diluições, de 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cada elemento.

#### **4.4 TRATAMENTO DOS DADOS**

Para o tratamento dos dados, foram utilizados os softwares Microsoft Office Excel® (Office 365, 2018) e Origin® 8.

Para a estimativa das doses diárias recomendadas para cada adoçante, com base nas IDAs dos edulcorantes, calculou-se a massa (mg) de edulcorante presente por sachê/ gota. Considerou-se para isso a quantidade de adoçante informada nos sachês e, para as amostras líquidas, calculou-se a densidade das mesmas (foi registrada a massa de 10  $\mu\text{L}$  para todas as amostras), e converteu-se o volume equivalente a uma gota (informação contida nas embalagens) em

massa. Os teores (%m/m) foram multiplicados pelos valores encontrados anteriormente, e a massa de cada edulcorante foi determinada em um sachê (sólidos)/ uma gota (líquidos).

Amostras cuja quantidade de cada edulcorante estava presente no rótulo tiveram tais valores comparados com os determinados experimentalmente utilizando o teste-t de Student.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DETERMINAÇÃO DE EDULCORANTES EM ADOÇANTES DE MESA

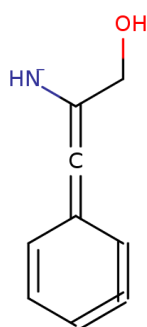
#### 5.1.1 *Detecção por espectrometria de massas: Modo MRM*

Para a separação e detecção dos edulcorantes estudados, foi utilizado o acoplamento da técnica HPLC com a espectrometria de massas, possibilitando assim a quantificação de analitos como o ciclamato e acesulfame, os quais não são detectados por UV sem antes passarem por procedimentos de derivatização. Além disso, os analisadores de massa do tipo triplo quadrupolo aumentam a seletividade da técnica, possibilitando a análise em modo MRM, em que se tem um íon precursor, ou íon pai, sendo fragmentado, gerando íons característicos de cada molécula, permitindo o monitoramento de dois pares iônicos, um para quantificação, aquele com maior intensidade de sinal, e outro para confirmação, selecionado dentre os outros mais intensos.

Para se determinar as transições a serem utilizadas para cada amostra, realizou-se a injeção direta de uma solução  $250 \text{ ug L}^{-1}$  no espectrômetro de massas, e obtiveram-se as transições MRM apresentadas na Tabela 8. O íon precursor em todas as transições para os edulcorantes artificiais consistiu-se do íon molecular  $[M-H]^-$ , com exceção da sucralose, para a qual observou-se um aduto com ânion acetato ( $m/z = 455$ ) de intensidade relativamente alta. Assim, a transição 455/395, correspondente à perda de ácido acético, foi utilizada para quantificação, e a transição 497/397, sendo  $m/z = 497$  referente à um isotópologo da sucralose contendo  $^{37}\text{Cl}$ , utilizado para a confirmação (ORDOÑEZ et al., 2013).

Para a sacarina, utilizou-se a transição 182/42, a qual corresponde à formação do ânion cianato ( $\text{NCO}^-$ ), para a quantificação. A transição 182/62, utilizada para confirmação, foi descrita em outros trabalhos na determinação de sacarina, mas não se tem informações exatas sobre qual seria a fragmentação da molécula (ARBELAEZ et al., 2015). Porém, um banco de dados europeu online, MassBank (<https://massbank.eu>), sugere um possível fragmento de fórmula  $[\text{NOS}]^-$ .

As transições utilizadas para o ciclamato, 178/80 para quantificação e 178/96 de confirmação, são referentes à formação dos radicais sulfito  $[\text{SO}_3]^-$  e amidosulfonato  $[\text{NH}_2\text{SO}_3]^-$ , respectivamente (ARBELAEZ et al., 2015). A transição de quantificação para o aspartame, 293/201, se trata do fragmento resultante da perda de um grupo metoxicarbonil ( $\text{CH}_3\text{OCO}$ ,  $m/z = 59$ ), um grupo amina ( $\text{NH}_2$ ,  $m/z = 16$ ) e um grupo hidroxila ( $\text{OH}$ ,  $m/z = 17$ ) (ARBELAEZ et al., 2015). Já a transição de confirmação, 293/146, se refere ao fragmento mostrado na Figura 12.

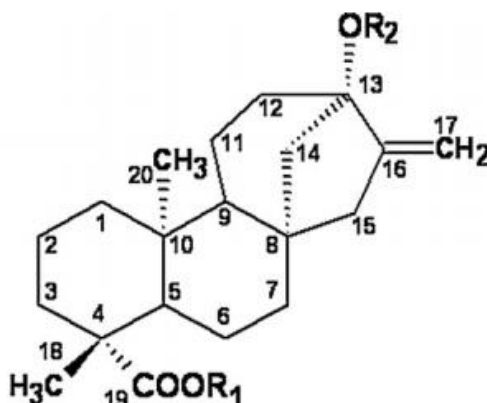


**Figura 12** - Fragmento de  $m/z = 146$  utilizado na transição de confirmação do aspartame. Retirado de [https://www.drugbank.ca/spectra/ms\\_ms/268524](https://www.drugbank.ca/spectra/ms_ms/268524) (Acesso em 04/01/2019).

A quantificação da molécula de acessulfame foi feita a partir da transição 162/82, gerada pela perda de trióxido de enxofre  $[\text{SO}_3]$  ( $m/z = 80$ ) pelo íon molecular (ARBELAEZ et al., 2015), e sua confirmação foi possível a partir do fragmento 162/78, cujo provável fragmento possui fórmula  $[\text{NO}_2\text{S}]^-$ ,  $m/z = 78$  (MassBank).

Em se tratando dos edulcorantes naturais extraídos da estévia, dados da literatura mostraram que estas moléculas apresentam certa facilidade em perder fragmentos de glicose, formando íons  $[\text{M-Glicose-H}]^-$ ,  $[\text{M-Glicose-Glicose-H}]^-$ , e assim até formar a molécula de esteviol, em que os grupos R na Figura 13 são hidrogênio (GARDANA, SCAGLIANTI, SIMONETTI, 2010). A molécula de esteviosídeo consiste da Figura 13 com o grupo R1 substituído por uma glicose, e o grupo R2 por duas moléculas de glicose. Em um espectro de massas, verificou-se que o pico do íon molecular  $[\text{M-H}]^-$  mostrava pouca intensidade, enquanto o pico  $[\text{M-Glicose-H}]^-$ ,  $m/z = 641$ , apresentava-se como o mais intenso, sendo este o utilizado como íon precursor. As transições de quantificação,

641/479, e de confirmação, 641/317, referem-se à perda de uma e das duas moléculas de glicose em R2, respectivamente.

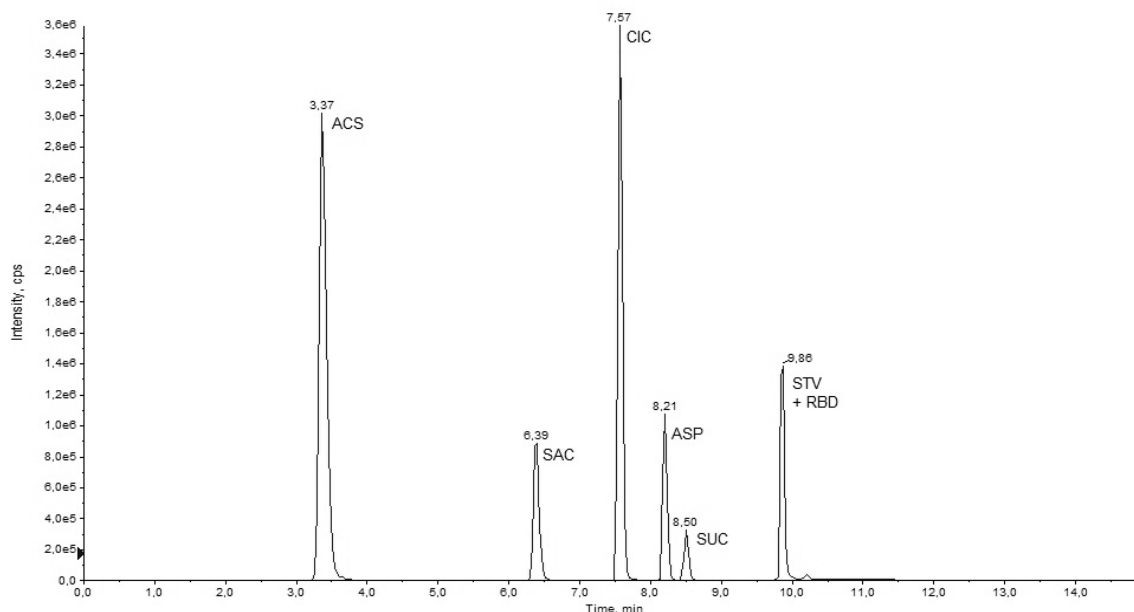


**Figura 13** - Estrutura comum aos glicosídeos de esteviol. A depender dos grupos R1 e R2, tem-se um glicosídeo diferente (Fonte: Adaptado de GARDANA, SCAGLIANTI, SIMONETTI, 2010).

O rebaudiosídeo-A consiste da molécula de esteviosídeo com um grupo glicose adicional em R2. Para este analito, utilizou-se o íon molecular  $m/z = 966$  como íon precursor. As transições, assim como para o esteviosídeo, consistem em perdas de moléculas de glicose. Para a quantificação, o par 966/804, consiste da perda de um fragmento de glicose, e para a confirmação, 966/642, dois fragmentos de glicose (GARDANA, SCAGLIANTI, SIMONETTI, 2010).

Após a otimização das fragmentações e das condições cromatográficas, foi injetado em HPLC uma solução padrão contendo todos os analitos na concentração de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ , obtendo-se o cromatograma mostrado na Figura 14.

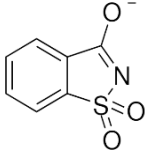
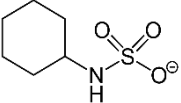
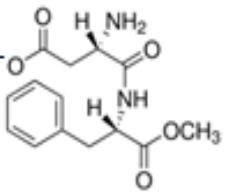
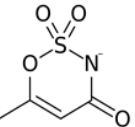
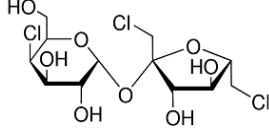
As Tabelas 10 e 11 sumarizam as informações relacionadas às transições utilizadas na espectrometria de massas. Apresenta também as estruturas dos compostos e suas respectivas massas molares.



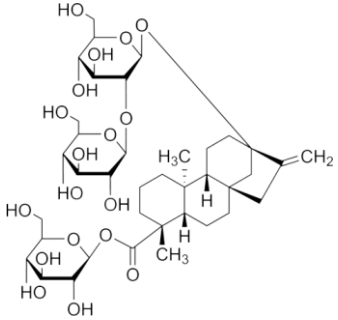
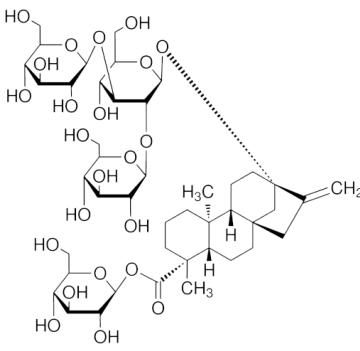
**Figura 14** - Cromatograma de uma solução padrão de edulcorantes obtido a partir de técnica de HPLC-ESI-MS/MS. ACS = Acesulfame-K; SAC = Sacarina; CIC = Ciclamato; ASP = Aspartame; SUC = Sucralose; STV = Esteviosídeo; RBD = Rebaudiosídeo

Apesar da co-eluição do STV e RBD, foi possível a separação dos picos a partir do modo MRM utilizado, uma vez que as transições para estes edulcorantes são diferentes. Trabalhos envolvendo a separação de glicosídeos de esteviol, mesmo utilizando maiores tempos de corrida e solventes mais fortes (MONTORO et al., 2013) ou instrumentos como UHPLC (GARDANA, SCAGLIANTI, SIMONETTI, 2010), obtiveram também alguns picos com baixa resolução cromatográfica.

**Tabela 11** - Transições utilizadas na espectrometria de massas para os edulcorantes artificiais. Para cada analito, a primeira transição corresponde à transição de quantificação e a segunda a transição de confirmação.

Composto	Massa [M - H] <sup>-</sup> (g/mol)	Estrutura [M - H] <sup>-</sup>	Transições	
Sacarina	182		182	42
			182	62
Ciclamato	178		178	80
			178	96
Aspartame	293		293	201
			293	146
Acessulfame	162		162	82
			162	78
Sucralose	395		465	395
			467	397

**Tabela 12** - Transições utilizadas na espectrometria de massas para os edulcorantes naturais. Para cada analito, a primeira transição corresponde à transição de quantificação e a segunda a transição de confirmação.

Composto	Massa molar (g/mol)	Estrutura	Transições	
Esteviosídeo	805		641	479
			641	317
Rebaudiosídeo A	967		966	804
			966	642

### 5.1.2 Validação do método

Os resultados obtidos para a validação do método cromatográfico utilizado na determinação de edulcorantes em adoçantes de mesa estão sumarizados nas Tabelas 12, 13 e 14.

**Tabela 13** - Conclusões obtidas a partir da análise de variância (ANOVA) feita para os modelos propostos para os edulcorantes

Edulcorante	ANOVA							
	Significância da Regressão				Ajuste do Modelo			
	F <sub>calc</sub>	F <sub>crit</sub>	α	Resultado	F <sub>calc</sub>	F <sub>crit</sub>	α	Resultado
Sacarina	4615,88	4,54	0,05	Significativa	3,295	3,326	0,05	Ajustado
Ciclamato	19143,62	4,49	0,05	Significativa	1,887	3,204	0,05	Ajustado
Aspartame	23038,69	4,54	0,05	Significativa	0,519	3,326	0,05	Ajustado
Sucralose	4676,34	4,49	0,05	Significativa	2,085	3,204	0,05	Ajustado
Acessulfame	4697,39	4,54	0,05	Significativa	1,380	3,326	0,05	Ajustado
Esteviosídeo	1881,86	4,41	0,05	Significativa	1,871	3,025	0,05	Ajustado
Rebaudiosídeo	1795,64	4,49	0,05	Significativa	0,618	3,204	0,05	Ajustado

**Tabela 14** - Resultados obtidos para linearidade e limites de detecção e quantificação avaliadas durante validação de método cromatográfico para análise de edulcorantes em adoçantes de mesa.

Edulcorante	Linearidade	R <sup>2</sup>	LD		LQ	
			µg L <sup>-1</sup>	%(m/m)	µg L <sup>-1</sup>	%(m/m)
Sacarina	y = 28274x + 164.696	0,9968	0,016	0,003	0,049	0,010
Ciclamato	y = 93115x - 288.055	0,9992	0,006	0,001	0,019	0,004
Aspartame	y = 4267x - 763	0,9994	0,125	0,025	0,378	0,076
Sucralose	y = 9784x - 156.393	0,9966	0,058	0,012	0,176	0,035
Acessulfame	y = 77621x + 2.887.989	0,9968	0,014	0,003	0,041	0,008
Esteviosídeo	y = 8879x - 130.300	0,9905	0,584	0,117	1,771	0,354
Rebaudiosídeo	y = 6794x - 63.038	0,9912	0,725	0,145	2,197	0,439

<sup>a</sup>LD e LQ nas unidades µg L<sup>-1</sup> e %(m/m) representam os limites na solução de injeção (instrumento) e na amostra (método), respectivamente.

**Tabela 15** - Resultados obtidos para repetitividade e veracidade, a partir do DPR e recuperação, respectivamente, durante validação de método cromatográfico para análise de edulcorantes em adoçantes de mesa

Edulcorante	DPR (%)			Recuperação (%)		
	N1	N2	N3	N1	N2	N3
Sacarina	6,74	4,78	2,53	83,5 ± 5,6	101,4 ± 4,8	103,3 ± 2,6
Ciclamato	2,59	2,01	2,33	116,1 ± 3,0	100,7 ± 2,0	98,5 ± 2,3
Aspartame	1,91	1,64	1,96	124,6 ± 2,4	112,4 ± 1,8	112,4 ± 2,2
Sucralose	1,53	1,80	1,80	129,9 ± 2,0	108,5 ± 2,0	106,9 ± 1,9
Acessulfame	3,13	2,58	3,59	108,9 ± 3,4	112,8 ± 2,9	113,8 ± 4,1
Esteviosídeo	6,95	4,78	2,00	90,2 ± 6,3	84,9 ± 4,1	89,4 ± 1,8
Rebaudiosídeo	3,06	4,22	4,47	104,7 ± 3,2	86,0 ± 3,6	91,8 ± 4,1

Em relação à avaliação das premissas da calibração pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), a análise dos resíduos da regressão permitiu confirmar a normalidade e homocedasticidade para todos os analitos. A ANOVA avaliou a significância e ajuste do modelo linear para os edulcorantes, fornecendo resultados satisfatórios para todos os edulcorantes em estudo. O coeficiente de determinação também foi calculado, e valores de  $R^2 > 0,99$  foram obtidos para todos os analitos.

Os limites de detecção e quantificação calculados a partir do desvio padrão dos brancos forneceram valores na ordem de ppt (partes por trilhão), mostrando uma boa sensibilidade do instrumento para as moléculas de interesse. Mesmo os edulcorantes sendo os princípios ativos e, portanto, estarem presentes em concentrações mais elevadas nas amostras, os limites para o método também foram calculados, no intuito de se avaliar possíveis adulterações e/ ou contaminações cruzadas durante o processo de produção.

Devido à inexistência de amostras brancas (isentas dos analitos) e de material de referência certificado, a avaliação da precisão e veracidade foi realizada utilizando uma amostra aleatória (7L) que foi fortificada em 3 níveis (Tabela 9). Os resultados obtidos para a precisão (%DPR) foram satisfatórios, com DPR < 7% para todos os analitos e em todos os níveis analisados. De acordo com o recomendado pelo guia de validação do INMETRO, para analitos determinados na ordem de 100 ppb, o DPR deve ser inferior a 15%, confirmando a precisão

adequada do método utilizado. Já na avaliação da veracidade, as porcentagens de recuperação variaram de 83,5 a 129,9% (nível baixo), de 84,9 a 112,8% (nível médio) e de 89 a 112,4% (nível alto). De acordo com o disposto pelo INMETRO (2018), considera-se aceitável recuperações entre 80-110% para analitos na ordem de 100 ppb e entre 60-115% para analitos na ordem de 10 ppb, Assim, verifica-se que, no geral, a veracidade do método é adequada, com exceção de dois analitos, sucralose e aspartame, os quais apresentaram valores um pouco acima dos limites dispostos pelo INMETRO no nível mais baixo das respectivas curvas analíticas, provavelmente resultado da menor sensibilidade, como pode ser verificado pelas equações das curvas de calibração, concomitante à baixa concentração utilizada.

### **5.1.3 Determinação dos teores de edulcorantes em adoçantes de mesa**

Os resultados obtidos referentes às análises cromatográficas estão apresentados nas Tabelas 15 e 16. Devido a vários problemas envolvendo o equipamento utilizado neste trabalho, algumas amostras não puderam ter todos ou algum edulcorante quantificado a tempo, uma vez que várias diluições deveriam ter sido analisadas no intuito de se ter os analitos dentro da faixa de trabalho linear selecionada. Portanto, algumas amostras tiveram apenas análise qualitativa do cromatograma obtido em primeira diluição, sendo assim possível apenas a identificação dos edulcorantes presentes nas mesmas.

De forma geral, nota-se uma pequena concentração dos edulcorantes nas amostras analisadas, consequência do alto poder adoçante destas moléculas. Além disso, observa-se uma grande variação na concentração (em %m/m), dos edulcorantes nas amostras analisadas. Este aspecto será discutido com mais detalhes no próximo tópico.

Tendo em vista as IDAs (Tabela 1) determinadas pelo JECFA e as quantidades de edulcorante por sachê (sólidos) e por gota (líquidos), construiu-se a Tabela 17, em que se determina a quantidade de cada adoçante aceitável por dia, para um indivíduo de 70kg (IBGE, 2009). Em casos de mistura de edulcorantes, foi considerado aquele em maior quantidade e com menor IDA para os cálculos da dose diária.

**Tabela 16** - Teores de edulcorantes em amostras líquidas de adoçantes de mesa

Amostra	Teor % (m/m)						
	SAC	CIC	ASP	SUC	ACS	STV	RBD
1L	<b>D*</b>	<b>0,04586 ± 0,00323*</b>	ND	ND	<b>D*</b>	7,795 ± 0,351	5,618 ± 0,187
2L	2,870 ± 0,040	2,636 ± 0,037	ND	0,2065 ± 0,0022	ND	ND	ND
3L	4,230 ± 0,195	3,878 ± 0,067	ND	ND	ND	0,6073 ± 0,0104	0,8411 ± 0,0329
4L	7,777 ± 0,127	5,196 ± 0,068	ND	ND	ND	0,3926 ± 0,0033	0,4323 ± 0,0033
5L	2,354 ± 0,134	4,489 ± 0,162	ND	ND	2,246 ± 0,018	0,7489 ± 0,0275	0,9066 ± 0,0329
6L	11,50 ± 1,32	7,200 ± 0,370	ND	ND	<b>D*</b>	ND	ND
7L	6,494 ± 0,277	2,110 ± 0,056	ND	ND	D	ND	ND
8L	ND	ND	ND	2,115 ± 0,066	1,704 ± 0,120	ND	ND
9L	ND	ND	ND	ND	<b>D*</b>	2,430 ± 0,041	5,820 ± 0,105
10L	D	10,07 ± 0,29	ND	ND	ND	ND	ND
11L	ND	ND	ND	ND	ND	0,8836 ± 0,0442	1,039 ± 0,054
12L	ND	0,5019 ± 0,0082	2,839 ± 0,102	ND	ND	ND	ND
13L	ND	ND	11,28 ± 0,02	ND	ND	ND	ND
14L	ND	ND	1,594 ± 0,157	ND	1,217 ± 0,103	ND	ND
15L	ND	ND	14,22 ± 0,39	ND	ND	ND	ND

\* Em negrito, edulcorante identificado mas não indicado no rótulo. ND = Não detectado; D = detectado, porém não quantificado. ACS = ACESSULFAME-K; SAC = Sacarina; CIC = Ciclamato; ASP = Aspartame; SUC = Sucralose; STV = Esteviosídeo; RBD = Rebaudiosídeo.

**Tabela 17 - Teores de edulcorantes em amostras sólidas de adoçantes de mesa**

Amostra	Teor % (m/m)						
	SAC	CIC	ASP	SUC	ACS	STV	RBD
1S	D	D	D	ND	D	ND	ND
2S	D	0,3056 ± 0,0120	0,5760 ± 0,0563	ND	ND	ND	ND
3S	ND	ND	0,58 ± 0,06	ND	ND	ND	ND
4S	ND	ND	1,829 ± 0,334	ND	ND	ND	ND
5S	ND	ND	ND	0,2264 ± 0,0703	2,808 ± 0,147	ND	ND
6S	ND	ND	ND	ND	ND	11,83 ± 1,24	12,77 ± 1,08
7S	6,978 ± 0,315	67,41 ± 1,51	ND	ND	ND	ND	ND
8S	10,60 ± 0,18	71,06 ± 2,70	ND	ND	ND	ND	ND
9S	ND	ND	0,4197 ± 0,0728	ND	D	ND	ND
10S	9,250 ± 0,339	D	ND	ND	ND	ND	ND
11S	ND	0,08948 ± 0,00066	ND	ND	D	ND	ND
12S	1,343 ± 0,241	ND	ND	ND	1,201 ± 0,040	ND	ND
13S	1,052 ± 0,085	3,728 ± 0,168	ND	ND	ND	ND	ND
14S	ND	0,1722 ± 0,0154	ND	ND	D	ND	ND
15S	0,3713 ± 0,0559	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16S	5,586 ± 0,960	1,377 ± 0,128	ND	ND	ND	ND	ND
17S	ND	D	ND	ND	D	ND	ND
18S	0,7791 ± 0,0826	4,017 ± 0,224	ND	ND	ND	ND	ND
19S	ND	ND	0,5577 ± 0,0962	ND	ND	ND	ND
20S	ND	ND	3,315 ± 0,282	ND	ND	ND	ND
21S	ND	ND	D	ND	D	ND	ND
22S	ND	ND	1,775 ± 0,010	ND	ND	ND	ND
23S	5,471 ± 0,398	D	ND	ND	ND	ND	ND
24S	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND
25S	ND	ND	ND	1,061 ± 0,196	0,3184 ± 0,0796	ND	ND
26S	ND	ND	1,334 ± 0,117	ND	0,6512 ± 0,0716	ND	ND
27S	ND	ND	ND	0,5253 ± 0,0683	D	ND	ND
28S	0,3148 ± 0,0408	0,5181 ± 0,0109	ND	ND	ND	ND	ND
29S	ND	ND	ND	1,010 ± 0,111	ND	ND	ND
30S	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND
31S	D	D	0,1805 ± 0,0617	ND	D	ND	ND
32S	ND	ND	ND	ND	D	0,9029 ± 0,0124	3,815 ± 0,078
33S	ND	ND	ND	ND	ND	1,886 ± 0,539	1,663 ± 0,477
34S	D	D	0,7138 ± 0,0271	ND	ND	ND	ND
35S	ND	ND	ND	ND	ND	2,445 ± 0,290	1,284 ± 0,107

ND = Não detectado; D = detectado, porém não quantificado. ACS = ACESSULFAME-K; SAC = Sacarina; CIC = Ciclamato; ASP = Aspartame; SUC = Sucralose; STV = Esteviosídeo; RBD = Rebaudiosídeo

**Tabela 18** - Doses diárias para cada amostra com base nas IDAs estabelecidos pelo JECFA, considerando um indivíduo de 70kg. Para as amostras líquidas, tem-se número de gotas e para as sólidas, número de sachês/ comprimidos

Amostra	Quant.	Amostra	Quant.	Amostra	Quant.	Amostra	Quant.	Amostra	Quant.
1L	40	11L	396	<b>6S</b>	19	16S	8	26S	202
2L	366	12L	3042	<b>7S</b>	20	17S	-	27S	330
3L	249	13L	422	<b>8S</b>	18	18S	24	28S	247
4L	129	14L	1506	9S	833	19S	500	29S	104
5L	379	15L	571	<b>10S</b>	62	<b>20S</b>	1297	30S	-
6L	84	1S	310	11S	1069	<b>21S</b>	-	31S	1944
7L	104	2S	603	12S	26	22S	157	32S	10
8L	979	3S	306	13S	21	<b>23S</b>	94	33S	10
9L	66	4S	47	14S	453	24S	-	34S	493
10L	146	5S	19	15S	118	25S	165	35S	13

Amostras em que não foi possível a quantificação de nenhum dos edulcorantes presentes não tiveram sua dose diária determinada.

Amostras em negrito são comercializadas na forma de comprimido; em itálico, as 100% naturais

Para amostras líquidas, quantidades expressas em gotas, para sólidas em sachê (pó) ou comprimidos

Conforme indicado na Tabela 17, seria necessário um elevado consumo de adoçantes para se atingir a IDA dos edulcorantes que os compõe. A amostra 16S apresentou uma quantidade significativa de sacarina (cerca de 45 mg por sachê de 800 mg), o que refletiu em uma dose diária relativamente baixa, uma vez que a sacarina é o edulcorante sintético com menor IDA. As amostras 32S e 33S também apresentaram baixas doses diárias, consequência da quantidade de glicosídeos de esteviol presente, uma vez que estes apresentam baixos valores de IDA. Vale salientar que, normalmente, pessoas que fazem uso de adoçantes de mesa também consomem alimentos e bebidas contendo essas substâncias e estes também contribuirão para a IDA.

Um diferencial de alguns adoçantes de outros países, como os da Alemanha e da Suíça, é a apresentação do produto em forma de comprimido. Uma consequência disso é a maior pureza em relação aos edulcorantes, os quais são os componentes majoritários, ao contrário daqueles comercializados em pó, os quais possuem, por exemplo SiO<sub>2</sub>, ausente nos comprimidos. Como exemplo, tem-se as amostras 7S e 8S, cujas composições totais de edulcorantes correspondem a cerca de 74% e 81%, respectivamente, do produto final, enquanto que nas demais esta porcentagem total não ultrapassa os 15%. Consequência disso é a baixa dose

diária encontrada, já que as concentrações desses edulcorantes estão elevadas nessas amostras.

De acordo com as embalagens, para as amostras líquidas tem-se que, em média, 4 gotas (o volume descrito pelos fabricantes varia entre 0,10 e 0,25 mL) equivalem a uma colher de chá de açúcar em doçura e que, para as sólidas, um sachê normalmente é preparado de forma a corresponder a um poder adoçante de cerca de duas colheres de chá de açúcar. Foi possível observar uma grande variação na concentração (% m/m) dos edulcorantes entre as diferentes amostras. Assim, no intuito de facilitar a comparação, calculou-se a quantidade (mg) de edulcorante por porção recomendada pelo fabricante e uma estimativa do poder adoçante calculada a partir da Equação 12. Os resultados estão descritos nas Tabelas 18 e 19.

$$P. \text{adoçante} = (Q_{SAC} \times 0,270) + (Q_{CIC} \times 0,055) + (Q_{ASP} \times 0,200) + (Q_{SUC} \times 0,600) + (Q_{ACS} \times 0,175) + (Q_{STV} \times 0,300) + (Q_{RBD} \times 0,300) \quad \text{Equação 12}$$

Na Eq. 12,  $Q_{XXX}$  é a quantidade em mg do edulcorante por porção (sachê ou 4-5 gotas) do adoçante de mesa.

**Tabela 19** - Teor de edulcorantes nas doses recomendadas pelos fabricantes das amostras líquidas de adoçantes de mesa e o respectivo poder adoçante

Amostra	mg/dose							Poder Adoçante*
	SAC	CIC	ASP	SUC	ACS	STV	RBD	
1L	D*	0,119	ND	ND	D*	20,1	14,5	-
2L	4,78	4,40	ND	0,349	ND	ND	ND	1,74
3L	7,04	6,46	ND	ND	ND	1,02	1,40	2,98
4L	8,14	5,45	ND	ND	ND	0,409	0,451	2,76
5L	3,70	7,07	ND	ND	3,54	1,18	1,43	2,79
6L	16,7	10,4	ND	ND	D*	ND	ND	-
7L	13,4	4,36	ND	ND	D	ND	ND	-
8L	ND	ND	ND	3,43	2,75	ND	ND	2,54
9L	ND	ND	ND	ND	D*	4,99	11,95	-
10L	D	21,2	ND	ND	ND	ND	ND	-
11L	ND	ND	ND	ND	ND	1,29	1,53	0,848
12L	ND	0,810	4,60	ND	ND	ND	ND	0,965
13L	ND	ND	33,2	ND	ND	ND	ND	6,64
14L	ND	ND	3,49	ND	2,68	ND	ND	1,17
15L	ND	ND	24,5	ND	ND	ND	ND	4,90

\* Poder adoçante calculado apenas para as amostras que tiveram todos os edulcorantes quantificados. ACS = Acessulfame-K; SAC = Sacarina; CIC = Ciclamato; ASP = Aspartame; SUC = Sucralose; STV = Esteviosídeo; RBD = Rebaudiosídeo.

**Tabela 20** - Quantidade de edulcorantes por dose recomendada pelos fabricantes e poder adoçante de amostras sólidas de adoçantes de mesa

Amostra	mg/dose							Poder adoçante*
	SAC	CIC	ASP	SUC	ACS	STV	RBD	
1S	D	D	D	ND	D	ND	ND	-
2S	D	2,48	4,64	ND	ND	ND	ND	-
3S	ND	ND	4,64	ND	ND	ND	ND	0,928
4S	ND	ND	9,15	ND	ND	ND	ND	1,83
5S	ND	ND	ND	1,84	22,5	ND	ND	5,04
6S	ND	ND	ND	ND	ND	7,10	7,66	4,43
7S	3,49	33,7	ND	ND	ND	ND	ND	2,80
8S	10,6	71,1	ND	ND	ND	ND	ND	6,77
9S	ND	ND	3,36	ND	D	ND	ND	-
10S	9,25	D	ND	ND	ND	ND	ND	-
11S	ND	0,72	ND	ND	D	ND	ND	-
12S	13,4	ND	ND	ND	12,0	ND	ND	5,72
13S	10,5	37,3	ND	ND	ND	ND	ND	4,89
14S	ND	1,7	ND	ND	D	ND	ND	-
15S	2,96	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,799
16S	44,7	11,0	ND	ND	ND	ND	ND	12,7
17S	ND	D	ND	ND	D	ND	ND	-
18S	6,24	32,2	ND	ND	ND	ND	ND	3,45
19S	ND	ND	5,6	ND	ND	ND	ND	1,12
20S	ND	ND	4,32	ND	ND	ND	ND	0,863
21S	ND	ND	D	ND	D	ND	ND	-
22S	ND	ND	17,8	ND	ND	ND	ND	3,56
23S	3,72	D	ND	ND	ND	ND	ND	-
24S	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	-
25S	ND	ND	ND	6,36	1,92	ND	ND	4,15
26S	ND	ND	10,6	ND	5,20	ND	ND	3,04
27S	ND	ND	ND	3,18	D	ND	ND	-
28S	1,86	3,12	ND	ND	ND	ND	ND	0,674
29S	ND	ND	ND	10,1	ND	ND	ND	6,06
30S	ND	<b>ND</b>	D	ND	ND	ND	ND	-
31S	D	D	1,44	ND	D	ND	ND	-
32S	ND	ND	ND	ND	D	5,40	22,9	-
33S	ND	ND	ND	ND	ND	15,1	13,3	8,52
34S	D	D	5,68	ND	ND	ND	ND	-
35S	ND	ND	ND	ND	ND	14,7	7,68	6,71

\* Poder adoçante calculado apenas para as amostras que tiveram todos os edulcorantes quantificados. ACS = Acessulfame-K; SAC = Sacarina; CIC = Ciclamato; ASP = Aspartame; SUC = Sucralose; STV = Esteviosídeo; RBD = Rebaudiosídeo.

Nota-se que, mesmo com a padronização dos valores, tem-se uma grande variação da estimativa do poder adoçante para as amostras. Considerando que, em geral, as doses equivaleriam aproximadamente à mesma doçura, de uma ou duas colheres de chá de açúcar, esperavam-se valores próximos de poder adoçante estimado. Essa grande variação observada indica que as proporções de edulcorantes utilizadas nas amostras podem não estar fornecendo o poder adoçante informado no rótulo.

Com relação à legislação, não se tem norma específica em que se trata sobre a questão da equivalência adoçante, apenas afirma que esta deve estar contida na embalagem do produto. Contudo, uma vez que não se tem informações, em produtos brasileiros, sobre a quantidade de cada edulcorante presente no adoçante, não é possível se ter uma verificação rápida da veracidade deste fato.

#### **5.1.4 Rótulos e Composição**

A RDC nº 271 de 22 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005) é a resolução em vigor que regula os adoçantes de mesa. Um dos pontos tratados nesta resolução é a questão dos rótulos dos produtos, os quais devem conter as informações essenciais ao consumidor, como o nome do produto, marca, validade, e também a composição de edulcorantes, se há adição de açúcares como sacarose e frutose e as respectivas quantidades adicionadas, aviso a fenilcetonúricos quanto à presença de fenilalanina e a equivalência em poder adoçante a certa quantidade de sacarose.

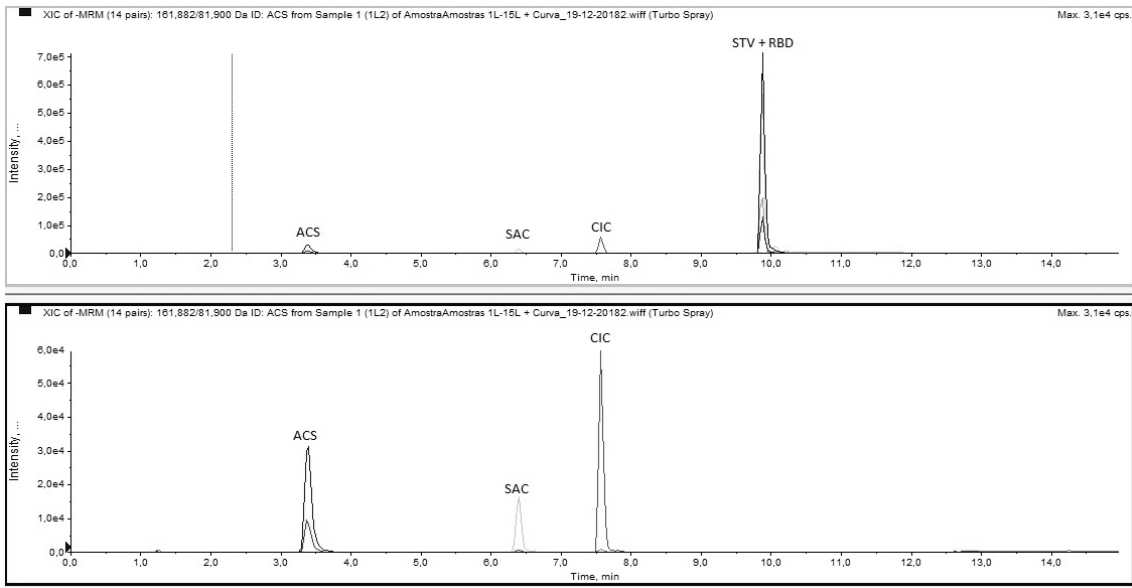
De maneira geral, todas as amostras utilizadas neste trabalho apresentavam rotulagem de acordo com a legislação, em se tratando da maioria dos pontos destacados acima. Contudo, as amostras 1L, 6L, 9L, 30S e 32S apresentaram discrepâncias quanto à composição informada nas respectivas embalagens e as de fato presentes no produto. Destas, três (1L, 9L e 32S) se diziam ser “100% Stevia”, ou seja, das sete amostras nesta categoria utilizadas neste trabalho, 43% apresentaram irregularidades.

A amostra 1L se apresenta como sendo constituída apenas por glicosídeos de esteviol. Contudo, nota-se pelo cromatograma (Figura 15) que nesta também estão

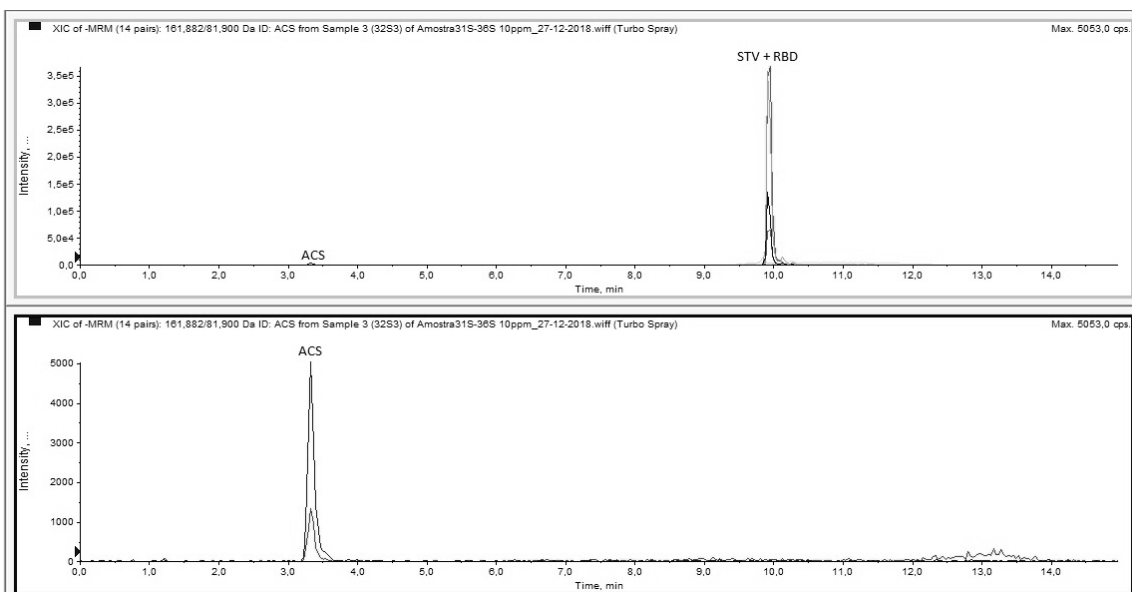
contidos três edulcorantes artificiais, SAC, CIC e ACS. O mesmo ocorre para a amostra 32S, a qual também se anuncia como contendo apenas edulcorantes naturais, porém a presença de ACS foi detectada pela análise cromatográfica (Figura 16). A presença de ACS sem a devida informação foi também detectada nas amostras 7L (SAC e CIC) e 9L (Glicosídeos de esteviol) (Figuras 17 e 18).

As divergências encontradas entre a composição indicada no rótulo desses produtos e as composições reais podem caracterizar crime de adulteração, previsto pela Lei 9.677 de 2/7/1998, uma vez que esses edulcorantes artificiais são mais baratos e possuem elevado sabor adoçante, reduzindo a quantidade de extrato natural necessário, o qual apresenta um custo de produção mais elevado, responsável pelo maior preço de mercado. Assim, além de poder prejudicar a saúde do consumidor, a adição destes edulcorantes artificiais, sem qualquer aviso na embalagem, pode estar barateando a produção de um produto, o qual é vendido à preço maior do que o seu real valor. Outros lotes das mesmas marcas devem ser analisados para se avaliar se esse fato é recorrente.

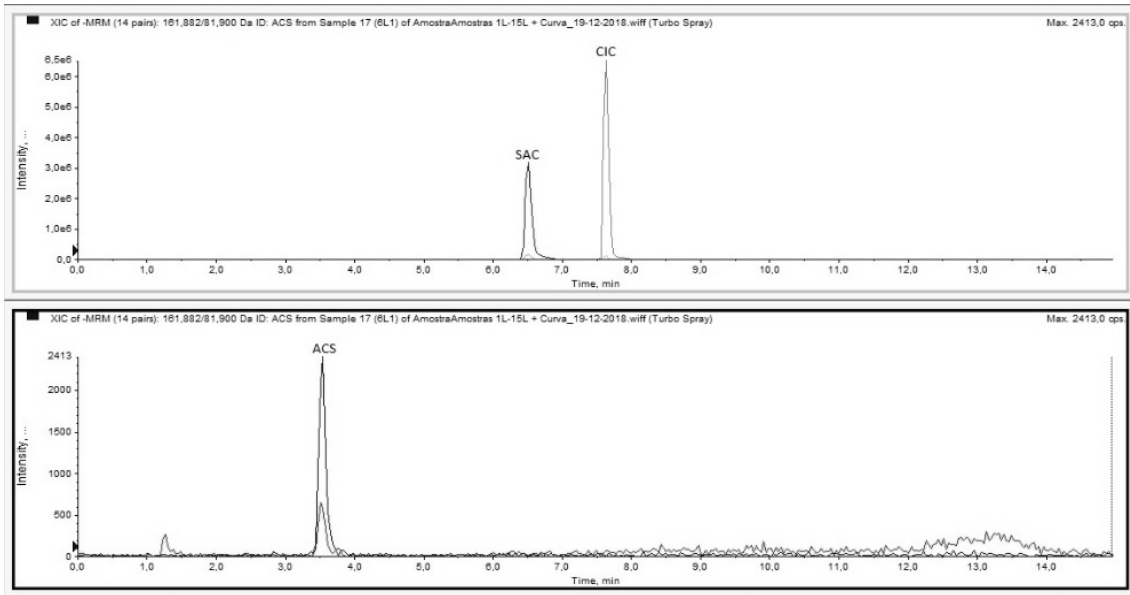
A amostra 30S informava a presença de CIC e ASP em sua composição, porém o primeiro não foi detectado nas análises cromatográficas, como se pode observar na Figura 19. Mesmo percebendo a presença de pequenos picos no cromatograma referente à transição do CIC, a não coeluição das transições de quantificação e confirmação permite inferir que tais picos não são referentes ao analito. Além disso, os tempos de retenção dos picos não coincidem com o tempo de retenção registrado para uma solução padrão de CIC, reforçando a ideia de que este edulcorante pode não estar presente no adoçante. Como mencionado anteriormente, outros lotes das mesmas marcas devem ser analisados para se avaliar se esse fato é recorrente.



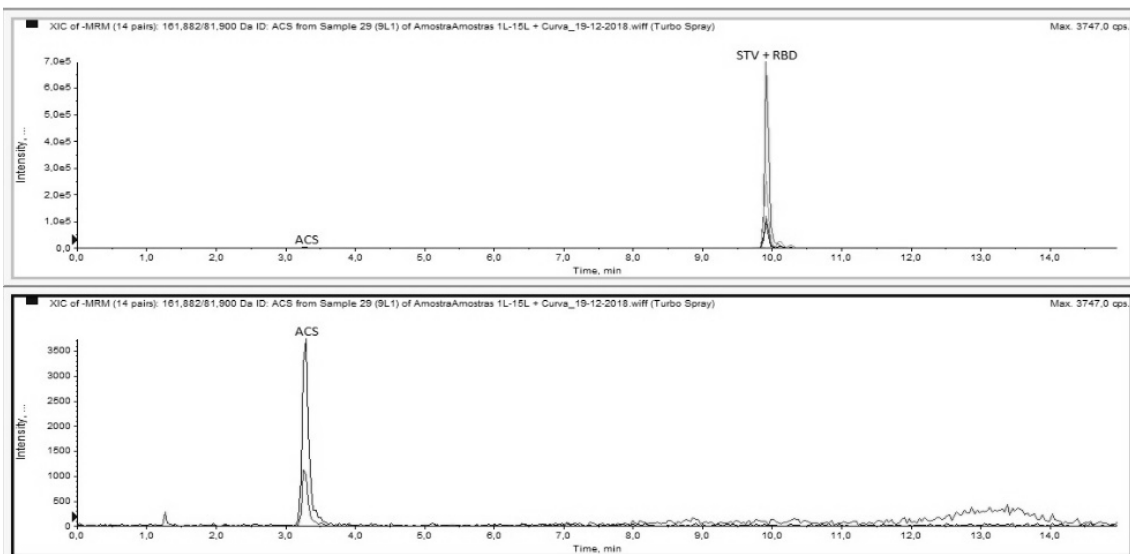
**Figura 15** - Cromatograma obtido para a amostra 1L e a seleção referente aos edulcorantes ACS, SAC e CIC. ACS = Acessulfame-K; SAC = Sacarina; CIC = ciclamato



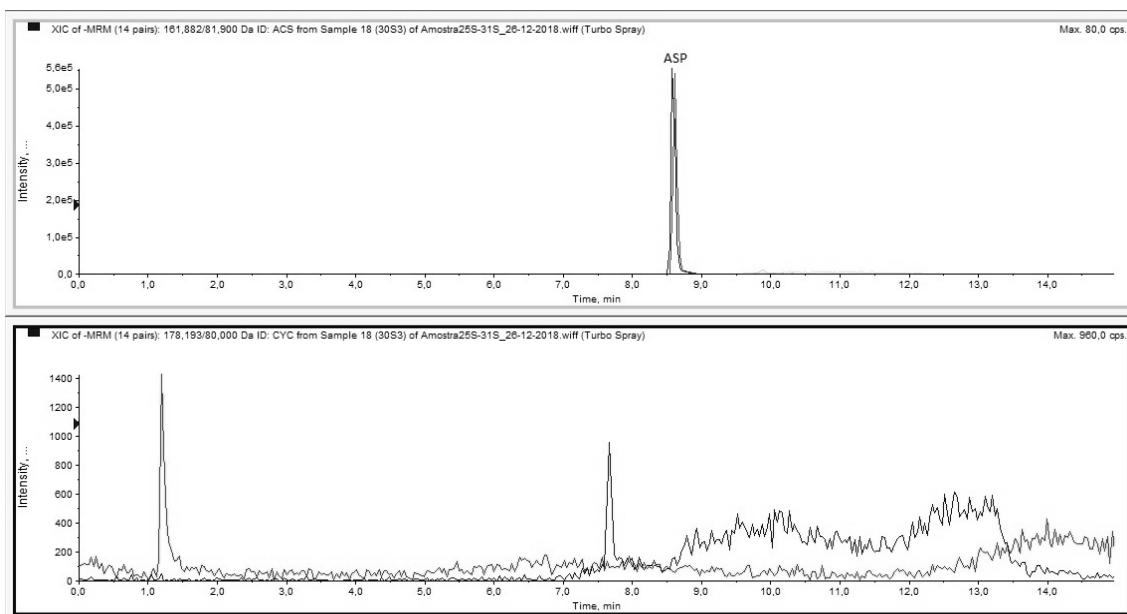
**Figura 16** - Cromatograma obtido para a amostra 32S e a seleção referente ao edulcorante ACS. ACS = Acessulfame-K



**Figura 17** - Cromatograma obtido para a amostra 6L e a seleção referente ao edulcorante ACS. ACS = Acessulfame-K



**Figura 18** - Cromatograma obtido para a amostra 9L e a seleção referente ao edulcorante ACS. ACS = Acessulfame-K



**Figura 19** - Cromatograma obtido para a amostra 30S, em que se nota a presença do aspartame (ASP), porém não se nota a presença de ciclamato (CIC) quando se analisa o cromatograma referente à sua transição MRM.

Um outro ponto passível de discussão está relacionado às proporções em amostras contendo misturas de edulcorantes, principalmente naquelas em que glicosídeos de esteviol estão envolvidos. Dentro desta característica estão as amostras 3L, 4L e 5L, as quais informam conter extrato de *Stevia rebaudiana* Bertoni, juntamente com alguns outros edulcorantes artificiais.

Como é possível verificar a partir da Figura 20, a porcentagem de glicosídeos de esteviol nas amostras não ultrapassa 2%. Tendo em vista o poder adoçante destes edulcorantes frente aos edulcorantes sintéticos utilizados nas misturas (Tabela 1), nota-se que o poder adoçante do produto final possui pouca contribuição de STV e RBD. Utilizando os valores calculados a partir da Equação 12 e mostrados na Tabela 17, calculou-se que a contribuição aproximada dos glicosídeos nas amostras 3L, 4L e 5L no poder adoçante final é de cerca de 25%, 9% e 28%, respectivamente.

De acordo com o Código de Defesa do Consumidor (Lei Nº 8.078, de 11 de setembro de 1990), em seus artigos 31 e 37,

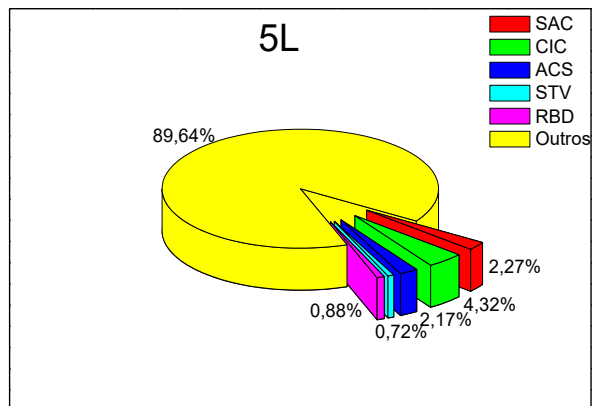
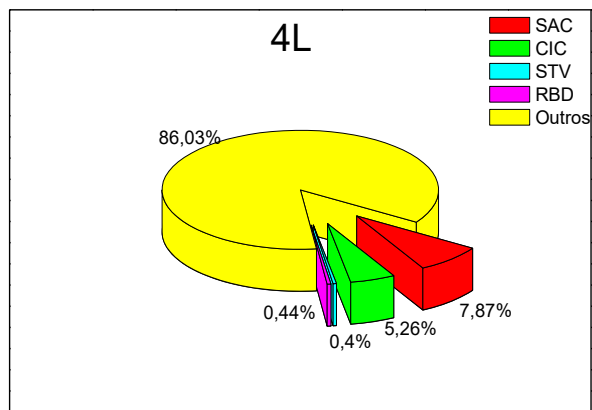
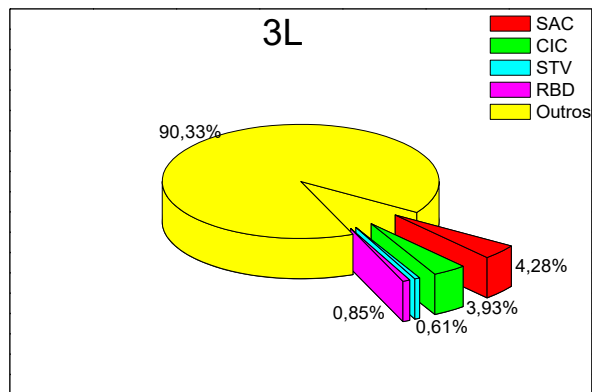
“Art. 31. A oferta e apresentação de produtos ou serviços devem assegurar informações corretas,

claras, precisas, ostensivas e em língua portuguesa sobre suas características, qualidades, quantidade, composição, preço, garantia, prazos de validade e origem, entre outros dados, bem como sobre os riscos que apresentam à saúde e segurança dos consumidores.”

“Art. 37. É proibida toda publicidade enganosa ou abusiva.

§ 1º É enganosa qualquer modalidade de informação ou comunicação de caráter publicitário, inteira ou parcialmente falsa, ou, por qualquer outro modo, mesmo por omissão, capaz de induzir em erro o consumidor a respeito da natureza, características, qualidade, quantidade, propriedades, origem, preço e quaisquer outros dados sobre produtos e serviços.”

A utilização de recursos visuais nas embalagens das amostras em questão no intuito de chamar a atenção do consumidor para o fato de que estes tratam-se de um produto natural é clara. A amostra 3L utiliza-se de um fundo verde, com imagens de folhas. A amostra 5L, além da embalagem em tons esverdeados com destaque ao nome “Stevia”, recursos também identificados na amostra 4L, adota o nome da linha como “Green” (do inglês, “verde”). Tais características induzem o consumidor a acreditar em um produto mais natural apesar de ainda se ter a presença de princípios ativos sintéticos, porém as quantidades em moléculas naturais são mínimas quando comparadas às artificiais. Além disso, os valores percentuais calculados referentes à contribuição no poder adoçante dos edulcorantes naturais mostraram que, de fato, para duas delas, a contribuição não chega a 30% (3L e 5L), mesmo com toda a propaganda de ser um produto natural. A amostra 4L não apresenta uma contribuição de nem 10% de glicosídeos de esteviol no poder adoçante final, consequência da presença de menos de 1% de estévia, enquanto edulcorantes artificiais correspondem a cerca de 14% da composição global, ou seja, aproximadamente 15 vezes maior que a quantidade de produto natural. Assim, tais amostras podem estar infringindo os artigos do Código do Consumidor citados acima, além de irem contra aos termos da Resolução específica para o produto e para rotulagens de alimentos em geral, citadas anteriormente.



**Figura 20** - Representação em gráfico de pizza das amostras 3L, 4L e 5L, na qual se compara as proporções de edulcorantes naturais e artificiais, pela composição global do adoçante.

Diferentemente dos produtos brasileiros, uma característica observada em embalagens de produtos de outros países é a informação da quantidade de cada edulcorante no adoçante. As amostras 7S e 8S (Alemanha), 10S (Suíça), 19S, 20S, 22S e 23S (Portugal) e 29S (Peru) são exemplos de amostras com tal característica, e estão listadas, juntamente com a composição informada e a determinada experimentalmente, na Tabela 20. O teste-t bilateral ( $H_0: \bar{x} = \mu_0$ ) foi aplicado para as amostras cujos teores foram determinados, no intuito de se comparar as médias obtidas.

**Tabela 21** - Composição informada no rótulo (INF) e a determinada experimentalmente (EXP) das amostras em questão. Nenhuma destas apresentou os edulcorantes ACS, STV e RBD em sua respectiva composição

Amostra		SAC		CIC		ASP		SUC	
		INF	EXP	INF	EXP	INF	EXP	INF	EXP
7S	Comp. 58 mg	6,90 %	6,98%	68,97%	67,41%	x	-	x	-
8S	Comp. 59 mg	6,78 %	10,60%	67,80%	71,06%	x	-	x	-
10S	Comp. 61 mg	9,80 %	9,25%	39,34 %	D	x	-	x	-
19S	Sachê 1000 mg	x	-	x	-	3,6 %	0,56%	x	-
20S	Comp. 65 mg	x	-	x	-	27,69 %	3,32%	x	-
22S	Sachê 1000 mg	x	-	x	-	3,60 %	1,78%	x	-
23S	Comp. 68 mg	5,9 %	4,86%	58,8 %	D	x	-	x	-
29S	Sachê 1000 mg	x	-	x	-	x	-	1,3 %	1,01%

1 = Quantidade informada; 2 = Quantidade encontrada; Comp. = comprimido; As porcentagens estão expressas em % m/m; SAC = Sacarina; CIC = Ciclamato; ASP = Aspartame; SUC = Sucralose.

Analisando os p-valores obtidos para um nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), percebe-se que, para a amostra 7S, os valores encontrados estão condizentes com o que foi informado em seu rótulo, uma vez que p-valor  $> 0,05$  para ambos os edulcorantes que a compõe. Para a amostra 8S, o valor encontrado para a sacarina é notavelmente diferente do especificado, o que se comprova pelo p-valor  $< 0,05$ . Partindo para um teste-t unilateral à direita ( $H_0: \bar{x} \leq \mu_0$  e  $H_1: \bar{x} > \mu_0$ ), obtém-se um p-valor =  $3,84E-4$ , ou seja, o valor determinado é significativamente maior que o valor informado a um nível de significância de 5%, indicando uma possível adição extra de edulcorante ao adoçante. Em relação ao ciclamato, o valor determinado concorda com o informado no produto. A quantidade informada de sacarina na amostra 10S também foi confirmada pela

análise cromatográfica para  $\alpha = 0,05$ , contudo, por motivos já explanados anteriormente, a quantidade de ciclamato não foi possível de ser determinada.

As amostras 19S, 20S e 22S, todas contendo apenas ASP e originárias do mesmo país (Portugal), apresentaram uma quantidade do edulcorante muito inferior ao que foi mostrado pelo produto. Uma vez que as replicatas eram independentes e os DPR calculados foram razoáveis, possivelmente pode se tratar de um ato proposital dos fabricantes ou, como discutido anteriormente, consequência da instabilidade do aspartame em solução (O'DONNELL, KEARSLEY, 2012).

Assim como para a amostra 10S, o edulcorante ciclamato não pôde ser quantificado para a amostra 23S. Em relação à quantidade de sacarina nessa amostra, a um nível de significância de 5%, a média determinada não coincide com a informada pelo fabricante. Contudo, considerando  $\alpha = 0,01$ , a média experimental apresenta-se estatisticamente igual ao valor indicado. O mesmo ocorre para a amostra 29S, cujo p-valor apresenta-se bem próximo de 0,05, porém ainda é menor, necessitando-se utilizar um nível de significância de 1% para que este seja considerado equivalente ao valor dado.

Mesmo não se tratando de materiais de referência certificados, o fato de se ter obtido valores estatisticamente iguais àqueles informados nos rótulos corrobora com a eficiência e confiabilidade do método desenvolvido. Casos em que as concentrações não foram semelhantes necessitam de mais estudos, no intuito de se identificar qual o real problema envolvido naquele resultado discrepante.

Faz-se agora necessária a análise de outras matrizes alimentícias, uma vez que produtos os quais vendem a ideia de que apresentam redução na quantidade de açúcar, compensam tal redução com edulcorantes, sem deixar claro na embalagem a presença desses aditivos. Tendo em vista que muitas pessoas preferem não consumir, ou até mesmo possuem algum tipo de alergia ou intolerância à algumas dessas moléculas, a especificação quanto à presença dos mesmos e até da quantidade de cada um deveria estar mais claro nas embalagens. Tudo isso mostra a necessidade de se ter métodos validados e eficientes, para os mais diversos alimentos e bebidas.

## 5.2 ANÁLISE DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS EM ADOÇANTES DE MESA

### 5.2.1 Validação

Os testes-F realizados pela ANOVA se encontram na Tabela 21 e os resultados obtidos para a validação do método de determinação de alguns constituintes inorgânicos em adoçantes de mesa estão resumidos nas Tabelas 22 e 23.

Os analitos foram selecionados com base em artigos anteriores de determinação da composição inorgânica de adoçantes (de SOUSA et al., 2006; de SOUSA et al., 2007; de SOUSA et al., 2009), levando em consideração também suas relevâncias, principalmente em relação à toxicidade, e possíveis problemas de contaminação durante o preparo da amostra, como ocorreu com Fe e Mg.

**Tabela 22** - Conclusões relacionadas à linearidade dos modelos construídos para os analitos a partir do MMQO, após Análise de Variância (ANOVA)

Metal	ANOVA							
	Significância da Regressão				Ajuste do Modelo			
	F <sub>calc</sub>	F <sub>crit</sub>	$\alpha$	Resultado	F <sub>calc</sub>	F <sub>crit</sub>	$\alpha$	Resultado
Li	57083,55	4,45	0,05	Significativa	3,077	3,094	0,05	Ajustado
Al	37577,88	4,32	0,05	Significativa	2,036	2,790	0,05	Ajustado
Cr	45370,89	4,67	0,05	Significativa	5,641	6,422	0,01 <sup>a</sup>	Ajustado
Mn	46392,25	4,67	0,05	Significativa	4,696	6,422	0,01 <sup>a</sup>	Ajustado
Co	187332,71	4,45	0,05	Significativa	1,429	3,094	0,05	Ajustado
Ni	30461,50	4,30	0,05	Significativa	1,177	2,741	0,05	Ajustado
Cu	30446,64	4,30	0,05	Significativa	3,231	4,201	0,01 <sup>a</sup>	Ajustado
Zn	60813,85	4,45	0,05	Significativa	2,472	3,094	0,05	Ajustado
As	65767,17	4,38	0,05	Significativa	2,263	2,915	0,05	Ajustado
Se	80654,89	4,45	0,05	Significativa	1,865	3,094	0,05	Ajustado
Rb	69813,75	4,38	0,05	Significativa	2,313	2,915	0,05	Ajustado
Sr	61515,57	4,41	0,05	Significativa	3,298	4,820	0,01 <sup>a</sup>	Ajustado
Cd	21768,43	4,75	0,05	Significativa	6,441	7,006	0,01 <sup>a</sup>	Ajustado
Pb	23820,19	4,41	0,05	Significativa	3,292	4,820	0,01 <sup>a</sup>	Ajustado

<sup>a</sup>A hipótese nula em um nível de significância de 0,05 foi rejeitada, portanto utilizou-se um nível de significância de 0,01.

**Tabela 23** - Equação das curvas de calibração com os respectivos coeficientes de determinação, seguidos dos LDs e LQs para os elementos analisados

Metal	Equação linear	R <sup>2</sup>	LD <sup>a</sup>		LQ <sup>a</sup>	
			µg L <sup>-1</sup>	µg kg <sup>-1</sup>	µg L <sup>-1</sup>	µg kg <sup>-1</sup>
Li	y = 32910,0x + 15089,0	0,9997	0,07	4,40	0,20	13,32
Al	y = 625,23x + 1597,1	0,9994	5,96	397,02	18,05	1203,08
Cr	y = 30891x + 7221,5	0,9997	0,28	18,71	0,85	56,71
Mn	y = 17889x + 6504,4	0,9997	0,26	17,39	0,79	52,68
Co	y = 52232,94x + 6145,9	0,9999	0,0045	0,30	0,014	0,91
Ni	y = 13896,72x + 7029,3	0,9998	0,29	19,28	0,88	58,42
Cu	y = 37669,90x + 16077,0	0,9997	0,66	43,97	2,00	133,26
Zn	y = 4910,8x + 10428	0,9997	2,29	152,66	6,94	462,61
As	y = 3325x + 889,87	0,9997	0,0079	0,53	0,024	1,59
Se	y = 140,68x + 66,0	0,9998	0,13	8,48	0,39	25,70
Rb	y = 18506x + 4742,5	0,9997	0,017	1,17	0,053	3,53
Sr	y = 24894x + 9094,6	0,9997	0,041	2,75	0,13	8,34
Cd	y = 17100x + 9558,7	0,9994	0,012	0,77	0,035	2,32
Pb	y = 2519,3x + 1575,9	0,9992	0,21	13,87	0,63	42,02

<sup>a</sup>LD e LQ nas unidades µg L<sup>-1</sup> e µg kg<sup>-1</sup> representam os limites na solução de injeção (limite instrumental) e na amostra (limite do método), respectivamente.

**Tabela 24** - Resultados das figuras de mérito para estudo da repetitividade e veracidade, na validação de metodologia de análise de componentes inorgânicos em adoçantes de mesa por ICP-MS

Metal	DPR (%)			Recuperação (%)			Recuperação (%) Branco Analítico
	1S	33S	9L	1S	33S	9L	
Li	2,93	4,63	1,72	99,4 ± 3,2	112,9 ± 6,4	96,3 ± 0,3	97,0 ± 1,5
Al	10,58	15,46	1,43	102,9 ± 50,3	127,7 ± 44,8	69,0 ± 52,0	113,3 ± 28,0
Cr	1,99	3,74	1,01	106,8 ± 2,9	119,9 ± 5,7	108,3 ± 2,9	98,3 ± 0,87
Mn	2,83	3,50	1,05	105,9 ± 4,4	121,8 ± 5,2	109,2 ± 2,0	99,4 ± 1,1
Co	2,54	3,27	1,45	110,2 ± 3,4	125,0 ± 5,7	114,6 ± 3,0	102,7 ± 1,0
Ni	1,28	4,66	0,92	105,6 ± 3,9	123,5 ± 8,7	112,9 ± 2,1	100,0 ± 1,1
Cu	1,71	8,58	2,69	97,8 ± 4,8	125,0 ± 12,9	106,4 ± 1,6	96,7 ± 0,8
Zn	11,10	20,06	5,28	109,3 ± 6,7	146,1 ± 35,6	115,3 ± 8,2	87,7 ± 17,8
As	2,87	5,01	2,45	125,8 ± 3,4	132,8 ± 8,6	119,3 ± 4,4	100,5 ± 0,4
Se	4,00	4,96	2,77	142,6 ± 5,0	142,8 ± 9,4	127,1 ± 5,2	102,3 ± 0,1
Rb	2,51	4,36	0,05	106,6 ± 3,5	119,6 ± 7,0	108,4 ± 1,5	98,6 ± 0,4
Sr	3,96	3,30	0,45	105,7 ± 5,0	115,8 ± 5,7	108,4 ± 4,7	95,2 ± 0,9
Cd	2,21	4,97	1,38	103,0 ± 2,9	111,8 ± 7,1	100,00 ± 0,5	99,4 ± 2,8
Pb	1,64	3,69	0,48	101,2 ± 2,4	120,5 ± 5,8	106,5 ± 0,9	109,8 ± 13,8

Os testes de normalidade e homocedasticidade dos resíduos foram satisfatórios para todos os elementos estudados. A análise conjunta dos valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e das conclusões obtidas a partir dos testes-F realizados pela ANOVA permite inferir que os analitos apresentaram, em geral, linearidade de resposta adequada. Contudo, algumas discordâncias foram observadas para alguns metais, como Cr, Mn e Cd, os quais forneceram bons valores de  $R^2$ , porém a hipótese de que não há falta de ajuste ( $H_0$ ) foi rejeitada pelo teste-F, a um nível de significância de 5% na faixa de 0 a 80  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Para esses elementos a faixa linear foi reduzida de 0 a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e o nível de 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  foi removido. Nessa faixa de concentrações não houve desvio de linearidade a um nível de 1% de significância.

Os limites de detecção e quantificação para todos os metais ficaram abaixo dos limites máximos permitidos pela ANVISA para contaminantes inorgânicos em alimentos em geral, indicando que o método é eficaz para detecção de possíveis contaminantes. Apenas para o Al foram encontrados limites mais elevados que os demais, o que pode ser justificado por possíveis contaminações nos frascos de digestão, gerando desvios de brancos maiores, além da menor sensibilidade do equipamento para esse analito, o que pode ser inferido ao se notar o baixo coeficiente angular da curva analítica.

Devido à inexistência de material de referência certificado para adoçantes de mesa, os estudos de precisão e veracidade foram realizados com amostras fortificadas, como recomenda o INMETRO (2018). Tem-se um número variado de amostras com diferentes proporções e composições, portanto procurou-se utilizar aquelas que apresentavam composição mais complexa e que estavam em maior quantidade. Os estudos de precisão foram realizados em termos de repetitividade, calculando-se o desvio padrão relativo (%DPR), que variou de 0,05 a 20,1%. Esses resultados foram satisfatórios nas três matrizes estudadas, ficando dentro dos limites aceitáveis estabelecidos pelo INMETRO (2018) (para analitos com concentração da ordem de 10 ppb, cujo DPR não deve ultrapassar 21%). Pelos resultados, pode-se verificar também que, de forma geral, as amostras líquidas apresentaram menores DPR que as amostras sólidas. Isso provavelmente se deve à menor homogeneidade das amostras sólidas, visto que

elas foram pesadas da forma como são comercializadas, sem nenhum tratamento prévio.

Com relação à veracidade, avaliada em termos de recuperação (%), verifica-se que de forma geral as amostras sólidas apresentaram valores um pouco mais elevados (97,8 a 146%) que as amostras líquidas (69,0 a 127%). Acredita-se que isso pode ter sido causado pelo maior teor de sólidos dissolvidos nos digeridos das amostras sólidas. Como pode ser visto na Tabela 5 (página 55) os adoçantes de mesa sólidos tem uma série de outros componentes que são de difícil decomposição, resultando em um digerido um pouco mais viscoso, o que interfere no processo de nebulização e conseqüentemente resulta em erros sistemáticos (SOUSA, BACCAN, CADORE, 2011). O erro sistemático observado foi maior para a amostra 33S, composto por glicosídeos de esteviol, lactose e dióxido de silício. Para as amostras 1S e 9L os resultados se mostraram razoáveis, sendo que a maioria dos elementos está dentro da faixa recomendada pelo INMETRO (2018), entre 60-115% para analitos na ordem de 10 ppb.

Para verificar se os altos valores de recuperação eram devido à matriz, determinou-se também as recuperações em digeridos do branco analítico (sem matriz) que variaram de 87,7 a 113% (Tabela 23), demonstrando que as altas recuperações obtidas para as amostras avaliadas (principalmente a 33S) foram resultantes do efeito de matriz.

Para minimizar os erros sistemáticos, poderia se tentar compatibilizar o meio da curva de calibração com o das amostras. Como os adoçantes de mesa tem composição variada, não seria viável preparar uma única matriz simulada para a curva de calibração. A alternativa seria então realizar a análise pelo método da adição de padrão, que seria bastante trabalhoso e consumiria muito argônio. Diante disso, optou-se por analisar todas as amostras contra a curva analítica e caso alguma apresentasse concentrações dos contaminantes acima dos valores estabelecidos pela legislação, estas seriam analisadas pelo método da adição de padrão.

### **5.2.2 Constituintes inorgânicos nas amostras de adoçantes de mesa**

Os resultados obtidos para as amostras analisadas são apresentados na Tabela 24. Como se pode verificar, poucos dos constituintes inorgânicos pesquisados foram detectados nas amostras analisadas. Alguns outros, como Fe, Mg e Ca, apresentaram problemas durante a validação e análises, e, portanto, não foram considerados neste trabalho. Dentre os determinados, apenas Li, Al, Cr, Mn, Cu, Rb e Sr foram encontrados em algumas amostras (Tabela 24), o que corrobora com trabalhos anteriores, como de Sousa e colaboradores (2011), em que Co e Cu, por exemplo, são detectados em níveis abaixo do LQ. O mesmo acontece em outro trabalho do grupo, (SOUSA et al., 2007), em que poucos elementos foram detectados nas amostras de adoçantes analisadas.

Duas amostras sólidas, 4S e 6S, apresentaram teores de Cr estatisticamente iguais ou superiores à  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ , que é o limite determinado pela legislação brasileira (Tabela 4), indicando possível contaminação do produto. Contudo, esse valor deverá ser confirmado pelo método da adição de padrão, devido aos erros sistemáticos observados durante a validação. Al, Sr e Rb foram quantificados em várias amostras, entretanto não são elementos controlados pela legislação brasileira.

Nota-se elevada concentração de Al, superiores a  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ , em algumas amostras, possivelmente alguma contaminação durante a produção, em caso de utilização de utensílios de alumínio, por exemplo. Mesmo não sendo um metal com limitações estabelecidas pela ANVISA, exposições prolongadas a esse elemento podem trazer diversos riscos à saúde, como doenças gastrointestinais e neurodegenerativas (FILIPPINI et al., 2019).

Teores de Sr e Rb foram detectados em quase todas as amostras, líquidas e sólidas, contudo não se tem relatos da presença destes elementos em adoçantes de mesa na literatura.

Uma possível explicação para a presença de Sr é a dissolução natural de seus minerais,  $\text{SrSO}_4$  (celestita) e  $\text{SrCO}_3$  (estroncianita) em fontes de água utilizadas

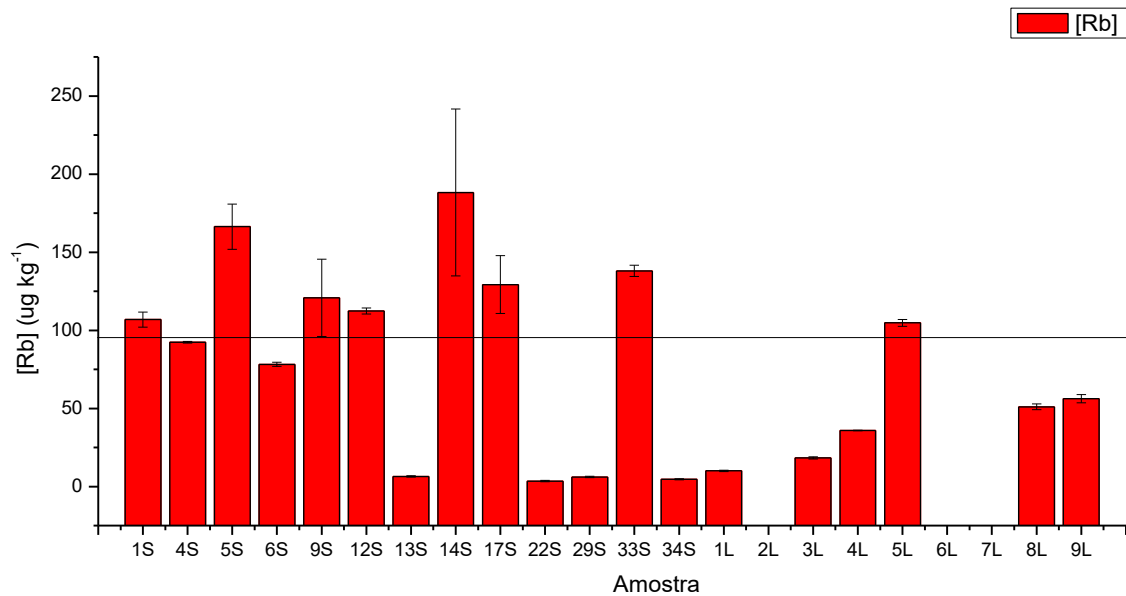
para consumo, podendo assim ter sido este elemento incorporado ao produto final durante sua produção (O'DONNEL et al., 2016; ZHANG et al., 2018).

Com relação ao Rb, alguns autores relataram sua presença em amostras de arroz e em algumas plantas, porém seus efeitos no organismo humano ainda estão sendo estudados (ZHU, NAKANO, SHIKAMORI, 2018). Competição com íons  $K^+$ , devido à elevada semelhança deste com o  $Rb^+$ , também já foram relatados em alguns trabalhos, podendo, dessa maneira, este metal ter sido incorporado nos adoçantes, durante o processo de produção, em que reagentes contaminados com este íon podem ter sido utilizados (VINICHUK et al., 2010). Pode-se inclusive notar uma maior concentração de Rb em amostras contendo ACS, cujo sal de potássio é a forma utilizada como adoçante (Figura 21).

**Tabela 25** - Concentrações de elementos inorgânicos em algumas amostras sólidas e líquidas de adoçantes de mesa

Amostra	Concentração/ $\mu\text{g kg}^{-1}$						
	Li	Al	Cr	Mn	Cu	Rb	Sr
1S	ND	1417 $\pm$ 45	<LQ	301,4 $\pm$ 57,9	ND	106,9 $\pm$ 4,8	91,84 $\pm$ 7,83
4S	ND	2412 $\pm$ 29	143,0 $\pm$ 2,9	<LQ	ND	92,34 $\pm$ 0,57	98,41 $\pm$ 2,04
5S	ND	<LQ	<LQ	ND	ND	166,4 $\pm$ 14,5	<LQ
6S	ND	3688 $\pm$ 149	94,33 $\pm$ 6,27	381,8 $\pm$ 9,0	ND	78,20 $\pm$ 1,29	331,8 $\pm$ 8,6
9S	ND	2731 $\pm$ 232	<LQ	ND	ND	120,9 $\pm$ 24,7	18,80 $\pm$ 0,87
12S	ND	<LQ	ND	ND	ND	112,4 $\pm$ 1,9	<LQ
13S	ND	<LQ	ND	ND	ND	6,490 $\pm$ 0,390	10,00 $\pm$ 3,22
14S	ND	-	<LQ	<LQ	ND	188,2 $\pm$ 53,4	15,77 $\pm$ 0,63
17S	ND	-	<LQ	<LQ	ND	129,3 $\pm$ 18,6	24,90 $\pm$ 6,17
22S	ND	<LQ	ND	<LQ	ND	3,480 $\pm$ 0,400	12,58 $\pm$ 3,44
29S	ND	<LQ	<LQ	<LQ	ND	6,100 $\pm$ 0,460	43,73 $\pm$ 0,59
33S	ND	1709 $\pm$ 98	<LQ	ND	ND	138,0 $\pm$ 3,6	<LQ
34S	ND	3834 $\pm$ 199	<LQ	<LQ	ND	4,630 $\pm$ 0,400	16,79 $\pm$ 2,62
1L	ND	<LQ	<LQ	<LQ	ND	10,01 $\pm$ 0,51	41,53 $\pm$ 2,71
2L	ND	<LQ	<LQ	ND	ND	<LQ	1076 $\pm$ 30
3L	ND	<LQ	ND	<LQ	ND	18,35 $\pm$ 0,77	1167 $\pm$ 5
4L	ND	<LQ	ND	131,5 $\pm$ 5,3	ND	35,85 $\pm$ 0,12	40,65 $\pm$ 4,53
5L	17,85 $\pm$ 1,01	<LQ	ND	<LQ	ND	104,8 $\pm$ 2,2	38,16 $\pm$ 1,69
6L	<LQ	<LQ	ND	ND	ND	<LQ	705,9 $\pm$ 2,5
7L	<LQ	<LQ	ND	<LQ	ND	ND	<LOQ
8L	<LQ	<LQ	ND	ND	ND	51,02 $\pm$ 1,82	ND
9L	ND	-	<LQ	<LQ	140,0 $\pm$ 16,5	56,27 $\pm$ 2,65	51,67 $\pm$ 4,65

ND = Não detectado; LQ = Limite de quantificação; Amostras indicadas com '-' apresentaram concentrações acima da curva de calibração)



**Figura 21** - Concentração de Rb nas amostras de adoçantes de mesa analisadas.

As maiores concentrações, aquelas superiores à linha horizontal traçada, correspondem às maiores concentrações de Rb e também representam amostras com ACS em sua composição, com exceção da 33S, um adoçante natural, cuja presença de Rb pode estar relacionada à sua presença na *Stevia rebaudiana*.

## 6 CONCLUSÃO

Métodos para quantificação de edulcorantes e constituintes inorgânicos foram validados e aplicados em amostras de adoçantes de mesa sólidos e líquidos de diferentes marcas.

Com relação aos edulcorantes, as análises qualitativas possibilitaram a identificação de analitos os quais não estavam especificados no rótulo de algumas marcas, o que pode ser qualificado como crime de adulteração. Essa análise também permitiu identificar um produto no qual informava a presença de um edulcorante, porém a análise cromatográfica não identificou a molécula correspondente. Tais observações mostram a necessidade de se manter uma fiscalização constante destes produtos, tendo em vista o aumento no consumo desses produtos.

Em relação à quantificação, o método se mostrou eficiente e com boa sensibilidade aos analitos, fornecendo resultados precisos e condizentes com as quantidades informadas em algumas amostras, de acordo com as comparações estatísticas realizadas. Desse modo, o método permitiu avaliar as proporções entre edulcorantes artificiais e naturais presentes em misturas, mostrando que as quantidades de edulcorantes sintéticos correspondem à composição majoritária em edulcorantes, mesmo que, ao se deparar com as embalagens destes produtos, passam uma imagem de um produto mais natural.

Considerando os valores de IDA estabelecidos pela JECFA para edulcorantes, foram determinadas as doses diárias máximas dos adoçantes em questão de acordo com suas respectivas composições, sem que as IDAs dos edulcorantes fossem atingidas. Esta análise mostrou que são necessários grandes quantidades de adoçante para se atingir níveis de edulcorante considerados prejudiciais à saúde. A comparação com algumas amostras de outros países permitiu notar que o produto, em forma de comprimido, pode ser mais eficiente, uma vez que menores quantidades de dispersantes são utilizados e, assim, menores quantidades de adoçante são necessárias para se atingir o dulçor desejado. Verificou-se também uma grande variação na composição e no poder

adoçante de diferentes marcas, ainda que todas utilizem o mesmo parâmetro para estabelecer a equivalência ao uso do açúcar.

Em se tratando das análises de constituintes inorgânicos, apesar dos problemas durante a validação do método para alguns elementos, a digestão ácida em micro-ondas utilizada se mostrou eficiente e, aliada à técnica de ICP-MS possibilitou, a quantificação de alguns constituintes inorgânicos em adoçantes de mesa, apresentando uma boa precisão e baixos limites de detecção e quantificação. Concentrações significativas de Al (entre 1,0-4,0 mg kg<sup>-1</sup>), Rb e Sr foram encontradas em algumas amostras, indicando que pode estar havendo uma contaminação durante a produção e armazenamento dos adoçantes. Dentre os elementos considerados tóxicos, duas amostras apresentaram níveis de Cr considerados prejudiciais à saúde, pela Legislação brasileira, necessitando estas de maiores estudos para ter certeza de que existe de fato uma contaminação. Com relação aos demais componentes inorgânicos, poucos foram encontrados em quantidade significativa.

## REFERÊNCIAS

AB SCIEX® (2019). Disponível em: <https://sciex.com/technology/qtrap-technology> (Acesso em: 26/02/2019)

Araújo, G. C. L., M. H. Gonzalez, A. G. Ferreira, A. R. A. Nogueira and J. A. Nóbrega (2002). "Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials." Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy **57**(12): 2121-2132.

Arbelaez, P., F. Borrull, E. Pocurull and R. M. Marce (2015). "Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1393**: 106-114.

Armstrong, B. and R. Doll (1974). "Bladder cancer mortality in England and Wales in relation to cigarette smoking and saccharin consumption." British Journal of Preventive & Social Medicine **28**(4): 233-240.

Arnold, D. L., D. Krewski and I. C. Munro (1983). "Saccharin: A toxicological and historical perspective." Toxicology **27**(3): 179-256.

Ashok, I., R. Sheeladevi and D. Wankhar (2014). "Effect of long-term aspartame (artificial sweetener) on anxiety, locomotor activity and emotionality behavior in Wistar Albino rats." Biomedicine & Preventive Nutrition **4**(1): 39-43.

Audrieth, L. F. and M. Sveda (1944). "PREPARATION AND PROPERTIES OF SOME N-SUBSTITUTED SULFAMIC ACIDS." The Journal of Organic Chemistry **09**(1): 89-101.

Bartholomees, U., T. Struyf, O. Lauwers, S. Ceunen and J. M. C. Geuns (2016). "Validation of an HPLC method for direct measurement of steviol equivalents in foods." Food Chemistry **190**: 270-275.

Belloir, C., F. Neiers and L. Briand (2017). "Sweeteners and sweetness enhancers." Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care **20**(4): 279-285.

Berry, C., D. Brusick, S. M. Cohen, J. F. Hardisty, V. L. Grotz and G. M. Williams (2016). "Sucralose Non-Carcinogenicity: A Review of the Scientific and Regulatory Rationale." Nutrition and Cancer **68**(8): 1247-1261.

Bizzi, C. A., E. Marlon De Moraes Flores, R. Sogari Picoloto, J. Smanioto Barin and J. Araújo Nóbrega (2010). "Microwave-assisted digestion in closed vessels: Effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid." Analytical Methods **2**(6): 734-738.

Bizzi, C. A., M. F. Pedrotti, J. S. Silva, J. S. Barin, J. A. Nóbrega and E. M. M. Flores (2017). "Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **32**(8): 1448-1466.

BRASIL (1965) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação-Decretos. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/decretos/50040\\_61.htm](http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/decretos/50040_61.htm) (Acesso em 08/05/18)

Bueno, M. B., D. M. L. Marchioni, C. L. G. César and R. M. Fisberg (2012). "Added sugars: consumption and associated factors among adults and the elderly. São Paulo, Brazil." Revista Brasileira de Epidemiologia **15**: 256-264.

Carocho, M., P. Morales and I. Ferreira (2017). "Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come." Food and Chemical Toxicology **107**(Pt A): 302-317.

Chang, C. S. and T. S. Yeh (2014). "Detection of 10 sweeteners in various foods by liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Journal of Food and Drug Analysis **22**(3): 318-328.

Cohen, S. M. (1986). "Saccharin: past, present, and future." Journal of the American Dietetic Association **86**(7): 929-931.

Cohen, S. M., T. A. Anderson, L. M. de Oliveira and L. L. Arnold (1998). "Tumorigenicity of Sodium Ascorbate in Male Rats." Cancer Research **58**(12): 2557-2561.

Collins, C. H., G. L. Braga and P. S. Bonato (2006). Fundamentos de Cromatografia. Campinas, SP, Editora da UNICAMP.

Das, A. and R. Chakraborty (2016). "Sweeteners: Classification, Sensory and Health Effects." Encyclopedia of Food and Health 234-240.

de Sousa, R. A., A. S. Ribeiro, M. A. Vieira, A. J. Curtius, N. Baccan and S. Cadore (2007). "Determination of trace elements in liquid aspartame sweeteners by ICP OES and ICP-MS following acid digestion." Microchimica Acta **159**(3): 241-246.

De Sousa, R. A., M. C. Santos, N. Baccan and S. Cadore (2009). "Determination of selenium in liquid dietetic sweeteners by GF AAS." Food Analytical Methods **3**(1): 31-35.

De Sousa, R. A., N. Baccan and S. Cadore (2006). "Analysis of Liquid Stevioside and Cyclamate-Saccharin Dietetic Sweeteners by ICP OES without sample treatment." Journal of the Brazilian Chemical Society **17**: 16.

Decreto nº. 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº. 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº. 691, de 13 de março de 1962. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 abr. 1965.

Demiralay, E., G. Özkan and Z. Guzel-Seydim (2006). "Isocratic Separation of Some Food Additives by Reversed Phase Liquid Chromatography." Chromatographia **63**(1-2): 91-96.

Di Pietra, A. M., V. Cavrini, D. Bonazzi and L. Benfenati (1990). "HPLC analysis of aspartame and saccharin in pharmaceutical and dietary formulations." Chromatographia **30**(3-4): 215-219.

Donaldson, M., J. H. Goodchild and J. B. Epstein (2015). "Sugar content, cariogenicity, and dental concerns with commonly used medications." The Journal of the American Dental Association **146**(2): 129-133.

Duarte, L. M., D. Paschoal, C. M. S. Izumi, M. D. Dolzan, V. R. Alves, G. A. Micke, H. F. Dos Santos and M. A. L. de Oliveira (2017). "Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in powder tabletop sweeteners by FT-Raman spectroscopy associated with the multivariate calibration: PLS, iPLS and siPLS models were compared." Food Research International **99**(Pt 1): 106-114.

Dugenest, S., M. Ollé, A. Ribes and M. F. Grenier-Loustalot (1998). "Chemical characterization of municipal solid waste incineration residue: Dissolution of elements with a microwave-dilute acids digestion technique compared to conventional methods." Analysis **26**(7): 256-260.

Edwards, C. H., M. Rossi, C. P. Corpe, P. J. Butterworth and P. R. Ellis (2016). "The role of sugars and sweeteners in food, diet and health: Alternatives for the future." Trends in Food Science & Technology **56**: 158-166.

Erejuwa, O. O., S. A. Sulaiman and M. S. Ab Wahab (2012). "Honey: A Novel Antioxidant." Molecules **17**(4): 4400-4423.

Fagherazzi, G., A. Vilier, D. Saes Sartorelli, M. Lajous, B. Balkau and F. Clavel-Chapelon (2013). "Consumption of artificially and sugar-sweetened beverages and incident type 2 diabetes in the Etude Epidemiologique aupres des femmes de la Mutuelle Generale de l'Education Nationale-European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort." The American Journal of Clinical Nutrition **97**(3): 517-523.

Fatibello-Filho, O., L. H. Marcolino-Junior and A. V. Pereira (1999). "Solid-phase reactor with copper(II) phosphate for flow-injection spectrophotometric determination of aspartame in tabletop sweeteners." Analytica Chimica Acta **384**(2): 167-174.

Filho, J. C., A. O. Santini, A. L. M. Nasser, H. R. Pezza, J. Eduardo de Oliveira, C. B. Melios and L. Pezza (2003). "Potentiometric determination of saccharin in commercial artificial sweeteners using a silver electrode." Food Chemistry **83**(2): 297-301.

Filippini, T., S. Tancredi, C. Malagoli, S. Cilloni, M. Malavolti, F. Violi, L. Vescovi, A. Bargellini and M. Vinceti (2019). "Aluminum and tin: Food contamination and dietary intake in an Italian population." Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.

Fry, J. C. (2012). 3 - Natural low-calorie sweeteners. Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings. D. Baines and R. Seal, Woodhead Publishing: 41-75.

García-Jiménez, J. F., M. C. Valencia and L. F. Capitán-Vallvey (2006). "Improved Multianalyte Determination of the Intense Sweeteners Aspartame and Acesulfame-K with a Solid Sensing Zone Implemented in an FIA Scheme." Analytical Letters **39**(7): 1333-1347.

Gardana, C., M. Scaglianti and P. Simonetti (2010). "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 **1217**(9): 1463-1470.

Gonzalez, M. H., G. B. Souza, R. V. Oliveira, L. A. Forato, J. A. Nóbrega and A. R. A. Nogueira (2009). "Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products." Talanta **79**(2): 396-401.

Gross, J. H. (2017). Mass Spectrometry: A Textbook. Switzerland, Springer.

Grotz, V. L. and I. C. Munro (2009). "An overview of the safety of sucralose." Regulatory Toxicology and Pharmacology **55**(1): 1-5.

Hagiwara, A., S. Fukushima, M. Kitaori, M. Shibata and N. Ito (1984). "Effects of three sweeteners on rat urinary bladder carcinogenesis initiated by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine." Gan **75**(9): 763-768.

Harris, D. C. (2005). Análise Química Quantitativa. Rio de Janeiro, RJ, LTC.

Hoenig, M. and A.-M. de Kersabiec (1996). "Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status." Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy **51**(11): 1297-1307.

Holler, F. J., D. A. Skoog and S. R. Crouch (2009). Princípios de Análise Instrumental. Porto Alegre, RS, Bookman.

INMETRO (2006). Adoçantes de mesa e Adoçante dietéticos. Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/adocantes.asp> (Acesso em 15/12/18).

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares realizada entre 2008-2009. Disponível em: [https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_encaa/defaulttabzip\\_brasil.shtm](https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/defaulttabzip_brasil.shtm) (Acesso em 26/01/19) .

Itkin, M., R. Davidovich-Rikanati, S. Cohen, V. Portnoy, A. Doron-Faigenboim, E. Oren, S. Freilich, G. Tzuri, N. Baranes, S. Shen, M. Petreikov, R. Sertchook, S. Ben-Dor, H. Gottlieb, A. Hernandez, D. R. Nelson, H. S. Paris, Y. Tadmor, Y. Burger, E. Lewinsohn, N. Katzir and A. Schaffer (2016). "The biosynthetic pathway of the nonsugar, high-intensity sweetener mogroside V from *Siraitia grosvenorii*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **113**(47): E7619-E7628.

Johnson, R. K., L. J. Appel, M. Brands, B. V. Howard, M. Lefevre, R. H. Lustig, F. Sacks, L. M. Steffen, J. Wylie-Rosett, P. A. American Heart Association Nutrition Committee of the Council on Nutrition, Metabolism, E. the Council on and Prevention (2009). "Dietary sugars intake and cardiovascular health: a scientific statement from the American Heart Association." Circulation **120**(11): 1011-1020.

Kim, J.-Y., J. Prescott and K.-O. Kim (2017). "Emotional responses to sweet foods according to sweet liker status." Food Quality and Preference **59**: 1-7.

Kinghora, A. D., D. D. Soejarto and G. E. Inglett (1986). "Sweetening agents of plant origin." Critical Reviews in Plant Sciences **4**(2): 79-120.

Kirkland, D. and D. Gatehouse (2015). "'Aspartame: A review of genotoxicity data'." Food and Chemical Toxicology **84**: 161-168.

Knight, I. (1994). "The development and applications of sucralose, a new high-intensity sweetener." Canadian Journal of Physiology and Pharmacology **72**(4): 435-439.

Koyama, M., K. Yoshida, N. Uchibori, I. Wada, K. Akiyama and T. Sasaki (2005). "Analysis of nine kinds of sweeteners in foods by LC/MS." Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan **46**(3): 72-78.

Kroger, M., K. Meister and R. Kava (2006). "Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: A review of the safety issues." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **5**(2): 35-47.

Krug, F. J. (2010). Métodos de Preparo de Amostra: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Piracicaba, SP.

Kumar, A. A., B. S. Narayanan and S. Ravi (2015). "Stevia the Ideal Sweetener: A Review." Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences **6**(2): 174-178.

Lei Nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 set. 1990.

Levy, R. B., R. M. Claro and C. A. Monteiro (2009). "Sugar and total energy content of household food purchases in Brazil." Public Health Nutrition **12**(11): 2084-2091.

Lipton, R. B., L. C. Newman, J. S. Cohen and S. Solomon (1989). "Aspartame as a dietary trigger of headache." Headache **29**(2): 90-92.

Magnuson, B. A., A. Roberts and E. R. Nestmann (2017). "Critical review of the current literature on the safety of sucralose." Food and Chemical Toxicology **106**: 324-355.

Martins, M. R. I. and R. Azoubel (2007). "Effects of Aspartame on Fetal Kidney: A Morphometric and Stereological Study." International Journal of Morphology **25**: 689-694.

Mazurek, S. and R. Szostak (2011). "Quantification of aspartame in commercial sweeteners by FT-Raman spectroscopy." Food Chemistry **125**(3): 1051-1057.

Meyer, V. R. (1994). Practical High-Performance Liquid Chromatography. Chichester, England, John Wiley & Sons.

Mitchell, H., 2006. Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Monteiro, L. S., B. K. Hassan, C. C. P. Estima, A. D. Souza, E. Verly, R. Sichieri and R. A. Pereira (2017). "Food Consumption According to the Days of the Week - National Food Survey, 2008-2009." Revista De Saude Publica **51**: 11.

Montoro, P., I. Molfetta, M. Maldini, L. Ceccarini, S. Piacente, C. Pizza and M. Macchia (2013). "Determination of six steviol glycosides of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) from different geographical origin by LC-ESI-MS/MS." Food Chemistry **141**(2): 745-753.

Nageswara Rao, R. and M. V. Talluri (2007). "An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **43**(1): 1-13.

NDNS (2014). "National diet and nutrition Survey: Results from years 1 to 4 (combined) of the rolling programme for 2008 and 2009 to 2011 and 2012 " Retrieved 30.10, 2015.

NDNS (2014). National diet and nutrition Survey: Results from years 1 to 4 (combined) of the rolling programme for 2008 and 2009 to 2011 and 2012 [online]. Disponível em <https://www.gov.uk/government/statistics/> (Acesso em 20/04/18).

Nehrling, J. K., P. Kobe, M. P. McLane, R. E. Olson, S. Kamath and D. L. Horwitz (1985). "Aspartame use by persons with diabetes." Diabetes Care **8**(5): 415-417.

Nobrega, J. A., C. Pirola, L. L. Fialho, G. Rota, C. E. de Campos Jordao and F. Pollo (2012). "Microwave-assisted digestion of organic samples: how simple can it become?" Talanta **98**: 272-276.

O'Donnel, K. and M. W. Kearsley (2012). Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology. Chichester, UK, John Wiley & Sons, Ltd.

O'Donnell, A. J., D. A. Lytle, S. Harmon, K. Vu, H. Chait and D. D. Dionysiou (2016). "Removal of strontium from drinking water by conventional treatment and lime softening in bench-scale studies." Water Research **103**: 319-333.

Okasha, E. (2016). "Effect of long term-administration of aspartame on the ultrastructure of sciatic nerve." Journal of Microscopy and Ultrastructure **4**(4): 175-183.

O'Mullane, M., B. Fields and G. Stanley (2014). "Food Additives: Sweeteners." 477-484.

Ordenez, E. Y., J. B. Quintana, R. Rodil and R. Cela (2012). "Determination of artificial sweeteners in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1256**: 197-205.

Ordenez, E. Y., J. B. Quintana, R. Rodil and R. Cela (2013). "Determination of artificial sweeteners in sewage sludge samples using pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1320**: 10-16.

Ordóñez, E. Y., R. Rodil, J. B. Quintana and R. Cela (2015). "Determination of artificial sweeteners in beverages with green mobile phases and high temperature liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Food Chemistry **169**: 162-168.

Pavlicek, V. and P. Tuma (2017). "The use of capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for sensitive determination of stevioside and rebaudioside A in foods and beverages." Food Chemistry **219**: 193-198.

Pawar, R. S., A. J. Krynitsky and J. I. Rader (2013). "Sweeteners from plants— with emphasis on *Stevia rebaudiana* (Bertoni) and *Siraitia grosvenorii* (Swingle)." Analytical and Bioanalytical Chemistry **405**(13): 4397-4407.

Pól, J., B. Hohnová and T. Hyötyläinen (2007). "Characterisation of *Stevia Rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1150**(1): 85-92.

Porfirio, D. M. (2004). Determinação de Macro e Microelementos em Adoçantes Dietéticos por ICP-OES. Mestrado, Universidade de São Paulo.

Portaria SVS/MS nº. 540, de 27 de outubro de 1997. Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 out. 1997.

Quiroga, A. L. B. (2013). "Edulcorantes." Food Ingredients Brasil **24**.

Renwick, A. G., J. P. Thompson, M. O'Shaughnessy and E. J. Walter (2004). "The metabolism of cyclamate to cyclohexylamine in humans during long-term administration." Toxicology and Applied Pharmacology **196**(3): 367-380.

Resolução RDC ANVISA/MS nº. 259, de 20 de setembro de 2002. Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 set. 2002.

Resolução RDC ANVISA/MS nº. 271, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para Açúcares e Produtos para Adoçar. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 set. 2005.

Richardson, M. L. (1967). "Analytical chemistry of cyclamates: a review." Talanta **14**(3): 385-391.

Rosen, A. L. and G. M. Hieftje (2004). "Inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry for speciation analysis: applications and instrumentation." Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy **59**(2): 135-146.

Shankar, P., S. Ahuja and K. Sriram (2013). "Non-nutritive sweeteners: Review and update." Nutrition **29**(11): 1293-1299.

Snyder, L. R. and J. J. Kikland (1979). Introduction to modern liquid chromatography. USA, John Wiley & Sons.

Snyder, L. R., J. J. Kirkland and J. L. Glajch (1997). Practical HPLC Method Development. USA, John & Wiley Sons.

Sousa, R. A., N. Baccan and S. Cadore (2011). "Determination of elemental content in solid sweeteners by slurry sampling and ICP OES." Food Chemistry **124**(3): 1264-1267.

Stojkovic, M., T. D. Mai and P. C. Hauser (2013). "Determination of artificial sweeteners by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection optimized by hydrodynamic pumping." Analytica Chimica Acta **787**: 254-259.

Sylvetsky, A. C. and K. I. Rother (2016). "Trends in the consumption of low-calorie sweeteners." Physiology & Behavior **164**: 446-450.

Thompson, C. O., V. C. Trenerry and B. Kemmery (1995). "Determination of cyclamate in low joule foods by capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection." Journal of Chromatography A **704**(1): 203-210.

Thomson, J. J. (1908). "LIV. Positive rays." The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science **16**(94): 657-691.

Vargas Jentsch, P., S. Torrico-Vallejos, S. Mendieta-Brito, L. A. Ramos and V. Ciobotă (2016). "Detection of counterfeit stevia products using a handheld Raman spectrometer." Vibrational Spectroscopy **83**: 126-131.

Vinichuk, M., A. F. S. Taylor, K. Rosén and K. J. Johanson (2010). "Accumulation of potassium, rubidium and caesium (<sup>133</sup>Cs and <sup>137</sup>Cs) in various fractions of soil and fungi in a Swedish forest." Science of The Total Environment **408**(12): 2543-2548.

Walters, D. E. (1991). The Rational Discovery of Sweeteners. Sweeteners, American Chemical Society. **450**: 1-11.

Walters, D. E. The Rational Discovery of Sweeteners. In Sweeteners/Discovery, Molecular Design, and Chemoreception; ACS Symposium Series 450; American Chemical Society: Washington, DC, 1991; pp 1-2.

Wasik, A., J. McCourt and M. Buchgraber (2007). "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**(1): 187-196.

Weihrauch, M. R. and V. Diehl (2004). "Artificial sweeteners—do they bear a carcinogenic risk?" Annals of Oncology **15**(10): 1460-1465.

WHO Media Centre. (2016). Factsheet: Obesity and overweight [online]. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (Acesso em 25/04/18).

Wiet Stephan, G. and K. Beyts Pamela (1992). "Sensory Characteristics of Sucralose and other High Intensity Sweeteners." Journal of Food Science **57**(4): 1014-1019.

World Health Organization. (2016). Global report on diabetes. World Health Organization. Disponível em <http://www.who.int/iris/handle/10665/204871> (Acesso em 25/04/18)

Yalamanchi, S., R. Srinath and A. Dobs (2016). Acesulfame-K. Encyclopedia of Food and Health. Oxford, Academic Press: 1-5.

Yamada, N. (2015). "Kinetic energy discrimination in collision/reaction cell ICP-MS: Theoretical review of principles and limitations." Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy **110**: 31-44.

Yang, D.-j. and B. Chen (2009). "Simultaneous Determination of Nonnutritive Sweeteners in Foods by HPLC/ESI-MS." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(8): 3022-3027.

Yang, L., S. Zhou, Y. Xiao, Y. Tang and T. Xie (2015). "Sensitive simultaneous determination of three sulfanilamide artificial sweeteners by capillary electrophoresis with on-line preconcentration and contactless conductivity detection." Food Chemistry **188**: 446-451.

Zhang, H., X. Zhou, L. Wang, W. Wang and J. Xu (2018). "Concentrations and potential health risks of strontium in drinking water from Xi'an, Northwest China." Ecotoxicology and Environmental Safety **164**: 181-188.

Zhang, Q., H. Yang, Y. Li, H. Liu and X. Jia (2017). "Toxicological evaluation of ethanolic extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: Genotoxicity and subchronic oral toxicity." Regulatory Toxicology and Pharmacology **86**: 253-259.

Zhou, C. Y., M. K. Wong, L. L. Koh and Y. C. Wee (1996). "Microwave-assisted dilute acid extraction of trace metals from biological samples for atomic absorption spectrometric determination." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **11**(8): 585-590.

Zhu, Y., K. Nakano and Y. Shikamori (2018). "Determination of Rubidium by ID-ICP-QMS/QMS with Fluoromethane as the Reaction Cell Gas to Separate Spectral Interference from Strontium." Analytical Sciences **34**(6): 681-685.

Zygler, A., A. Wasik and J. Namieśnik (2009). "Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs." TrAC Trends in Analytical Chemistry **28**(9): 1082-1102.