

DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

RESUMO

A utilização de edulcorantes pela população tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, não somente pelos aspectos nutricionais e de saúde, como no caso de pessoas portadoras de diabetes, mas por questões de estética. Existe a necessidade de se conhecer os reais teores desses aditivos que são acrescentados aos alimentos, pois há a preocupação com possíveis reações adversas à saúde, que podem ser desde uma simples reação alérgica até a indução ao câncer. Por isso, o desenvolvimento de métodos confiáveis, precisos e de determinação simultânea é cada vez mais importante. Nesse trabalho, foi desenvolvida e validada uma metodologia para quantificação simultânea dos principais edulcorantes utilizados e permitidos pela legislação brasileira, sendo eles o aspartame, acesulfame-K, ciclamato de sódio e sacarina.

Palavras-chave: edulcorantes, CLAE, separação, aspartame

SUMMARY

The use of artificial sweeteners by the population has increased in recent years, not just for nutritional and health aspects, as the case of diabetics people, but also for aesthetic aspects. Today, there is the necessity to know the real quantities of these additives in food because there is a concern about possible adverse reactions to human health, which can be a simple allergic reaction or a cancer induction. For that reason, the development of trustworthy, precise and simultaneous determination methods is becoming more important each day. In this work, it has been developed and validated a methodology for simultaneous quantification of the main sweeteners used and allowed for the Brazilian legislation, being them Aspartame, Acesulfame-K, Sodium Cyclamate and Saccharin.

Keywords: sweeteners, HPLC, separation, aspartame

INTRODUÇÃO

Mudanças no estilo de vida das pessoas e a crescente preocupação com o corpo e a saúde fizeram com que o número de consumidores de edulcorantes se tornasse cada vez maior. O uso de adoçantes começou a se popularizar na década de 60, especialmente nos Estados Unidos; no Brasil, porém, só a partir da década de 80 que os produtos dietéticos passaram a extrapolar seu uso fármaco, associado principalmente ao controle de diabetes (Mello, 1999).

Atualmente, consumidores selecionam alimentos de baixa caloria, obtidos a partir de adoçantes artificiais, com a intenção de reduzir ou controlar seu consumo calórico e

também para auxiliar no controle de problemas como cardiopatias, obesidade, diabetes e até mesmo cáries dentárias. (Chen, 1997).

Uma pesquisa realizada em 1989 mostrou que além do número de adultos americanos que consomem produtos de baixa caloria ter aumentado, a maioria (cerca de 60%) não está fazendo dieta, mas usa esses produtos como parte de um estilo de vida saudável (Nabors, 1991). Por essas razões, adoçantes artificiais são amplamente utilizados em alimentos, bebidas e indústria farmacêutica em todo o mundo (Chen, 1997).

Juliana Prando e
Marcelo Alexandre Prado*

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

*Autora para correspondência:
R. Engenheiro Edward de Vita Godoy, 946, apto. 1-A
Cidade Universitária
CEP: 13084-090
Campinas, SP
Fone: (11) 8223-7112
E-mail:
juliana.prando@gmail.com

Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária (Portaria nº 540/MS, de 27/10/97), edulcorantes são substâncias diferentes dos açúcares e que conferem sabor doce ao alimento. Eles são classificados em naturais ou artificiais, sendo que no primeiro caso são obtidos sem reações químicas a partir de plantas ou animais e os artificiais são sintetizados através de reações químicas (Pesarini, 2001; Bobbio & Bobbio, 1992).

Os edulcorantes são os substitutos do açúcar e podem ser calóricos ou não, dependendo de seu metabolismo no corpo. Normalmente, as alternativas à sacarose não contribuem com calorias de forma significativa nos produtos em que são usados porque são necessárias quantidades muito pequenas da substância para atingir a doçura necessária (Altschul, 1993).

A doçura é algo subjetivo e depende de uma série de fatores, como: concentração do edulcorante, temperatura em que o produto é consumido, pH, outros ingredientes do produto e sensibilidade de quem está provando. O padrão usual é a sacarose e a avaliação de doçura de uma dada substância em relação à sacarose é feita numa base de peso (Altschul, 1993; Nabors, 1991). A tabela a seguir fornece uma comparação da doçura relativa de algumas alternativas à sacarose.

Cada edulcorante possui características próprias, como estabilidade em soluções ácidas ou básicas, estabilidade em grande faixa de temperatura e solubilidade em água. A segurança é fundamental e, portanto, não pode ser tóxico e deve ser metabolizado normalmente ou eliminado pelo organismo (Grenby, 1996).

Os edulcorantes artificiais mais comuns são: aspartame, ciclamato de sódio, acesulfame K e sacarina sódica, sendo que este último é o mais antigo dos adoçantes artificiais a ser usado como substituto do açúcar e há algumas décadas tem sido centro da controvérsia sobre a possibilidade de efeitos carcinogênicos (Zhu, 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), existe um valor de ingestão diária aceitável (por kg de massa corpórea) para cada tipo de edulcorante: 40 mg para aspartame, 11 mg para ciclamato, 15 mg para acesulfame K e 5 mg para a sacarina sódica. Devido à polêmica sobre a sua toxicidade, a máxima ingestão diária aceitável de sacarina sódica é a mais baixa entre os edulcorantes mais comuns. Atualmente, o aspartame é considerado o mais seguro dos edulcorantes artificiais e é o mais popular em cerca de 75 países. (World Health Organization; Chen, 2001; Chen, 1997).

Tabela 1. Poder adoçante e valor calórico de alternativas à sacarose

Substância	Doçura aproximada (sacarose = 1)	Valor calórico (kcal/g)
Acesulfame K	200	0
Aspartame	180 - 200	4
Ciclamato	30	0
Sacarina	300	0
Stevia	200 - 300	Não definido, mas > 0
Sucralose	600	0

Fonte: Kretchmer e Hollenbeck, 1991

Tabela 2. Valores de média e desvio padrão para cada lote de bala de morango

Edulcorante (média ± Desvio Padrão)					
Produto	Lote	Acesulfame	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Bala A	1	3,13 ± 0,06	-	-	-
Bala A	2	3,06 ± 0,07	-	-	-
Bala A	3	3,15 ± 0,14	-	-	-

Os edulcorantes podem ser usados separadamente ou em combinação uns com os outros, sendo que esta última opção tem se tornado cada vez mais popular, devido às vantagens técnicas, de saúde e comerciais. A variedade de edulcorantes existente nos permite escolher um em particular ou uma combinação deles para uma determinada aplicação. Do ponto de vista da saúde, o consumo diário de cada um será menor se a combinação for usada. Do ponto de vista comercial, o custo dos produtos pode ser reduzido ao se misturar um edulcorante de alto preço e qualidade com um adoçante de qualidade e preço menores, desde que o efeito sinérgico seja favorável (Khan, 1993; Chen, 1997).

OBJETIVO

Foi desenvolvida e validada uma metodologia para determinação simultânea de quatro edulcorantes utilizados no Brasil: aspartame, acesulfame-K, ciclamato de sódio e sacarina

sódica. Esta metodologia foi aplicada na verificação da conformidade de produtos com a legislação brasileira.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras e padrões

Utilizou-se amostras alimentícias nacionais que apresentavam em seus rótulos a declaração da presença de edulcorantes em sua formulação. Utilizou-se reagentes e padrões de edulcorantes fornecidos por empresas fabricantes. A água utilizada foi purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore).

Equipamentos

Para a análise em CLAE utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência HP (HELWETT PACKARD) série 1050, com sistema de bombeamento isocrático, válvula injetora tipo

Tabela 3. Média e desvio padrão para cada lote de refresco em pó sabor pêra

Produto	Lote	Edulcorante (média ± Desvio Padrão)			
		Acesulfame	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Suco A	1	2,92 ± 0,12	0,96 ± 0,03	11,74 ± 0,55	27,60 ± 0,19
Suco A	2	3,04 ± 0,05	0,61 ± 0,03	7,03 ± 0,43	25,80 ± 1,30
Suco A	3	*	*	*	*
Suco B	1	5,69 ± 0,29	-	-	31,20 ± 0,88
Suco B	2	5,45 ± 0,17	-	-	36,47 ± 0,87
Suco B	3	6,32 ± 0,08	-	-	32,27 ± 0,37
Suco C	1	4,40 ± 0,10	-	-	35,92 ± 0,25
Suco C	2	4,20 ± 0,05	-	-	42,48 ± 0,39
Suco C	3	5,02 ± 0,10	-	-	41,60 ± 0,49

* Foram injetados apenas dois lotes do suco marca A

Tabela 4. Média e desvio padrão para cada lote de gelatina em pó sabor uva

Produto	Lote	Edulcorante (média ± Desvio Padrão)			
		Acesulfame	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Gelatina A	1	18,32 ± 0,39	-	-	26,87 ± 0,73
Gelatina A	2	20,39 ± 0,33	-	-	29,78 ± 0,76
Gelatina A	3	*	-	-	*

* Foram injetados apenas dois lotes

Rheodyne e uma alça de amostragem de 20µL de capacidade. Um detector de arranjos de diodos (DAD) da HP série 1050 foi acoplado a um software HP Chemstation.

Para a separação dos compostos utilizou-se uma coluna cromatográfica de fase reversa C18 Vydac, com partículas de 5 µm, com dimensões de 250 x 4,6 mm d.i. (Supelco, SIGMA-ALDRICH, USA), protegida por uma coluna de guarda Micropore, C₁₈, 10µm, 30 x 4,6 mm d.i. (VARIAN).

PARTE EXPERIMENTAL

As amostras alimentícias que necessitavam de pré-preparo foram preparadas conforme as instruções contidas no rótulo. No caso de refrigerantes, realizou-se a degaseificação do produto antes de filtrar. Todas as amostras foram filtradas em membranas Millipore antes da injeção.

O método de separação utilizou uma fase móvel com acetonitrila (TEDIA) e tampão fosfato (MERCK) (10:90), com pH = 4,0, ajustado com ácido ortofosfórico (MERCK), todos com grau cromatográfico. A vazão adotada foi de 0,8 ml/min. O uso do detector de arranjos de diodo (DAD) permitiu a detecção dos 4 edulcorantes artificiais na região do ultravioleta (UV), sendo a 192 nm para o Ciclamato e Aspartame, 205 nm para a Sacarina e 227 nm para o Acesulfame.

A degaseificação da fase móvel foi feita com sistema de borbulhamento com gás Hélio, visto que o uso de ultra-som não foi eficiente para essa função.

A identificação foi feita através da comparação dos tempos de retenção dos padrões analisados para as mesmas condições analíticas e de espectros de absorção obtidos. A quantificação foi realizada por padronização externa, utilizando-se sete níveis de concentração, sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

As amostras alimentícias testadas tiveram cada lote injetado quatro vezes e, para cada marca, avaliou-se 3 lotes, totalizando 12 injeções de cada marca e 36 injeções para cada produto. Exceções ocorreram no caso de alguns produtos devido à dificuldade de se encontrar similares no mercado, ou mesmo lotes diferentes de um mesmo produto. Nesses casos, o número de lotes e marcas analisadas foi menor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de concentração obtidos, para cada edulcorante, em cada lote, apresentaram baixo desvio padrão e coeficiente de variação entre 5% e 6%, considerados satisfatórios. Os valores podem ser observados nas tabelas a seguir.

O produto bala dura de morango indicava no rótulo a presença do edulcorante acesulfame, porém a quantidade presente não foi declarada. Através das análises determinou-se uma quantidade de 3,1mg/100g para esse produto, estando de acordo com a legislação para limite máximo, mas em desacordo com a lei que obriga a declaração no rótulo das quantidades utilizadas.

Para refresco em pó sabor pêra, observou-se variação da concentração de alguns adoçantes em função do lote, principalmente nas marcas A e C.

As amostras de gelatina sabor uva não apresentavam a quantidade de edulcorante declarada, sendo determinada a presença de 19,4 mg/100ml de acesulfame e 28,3 mg/100ml de aspartame.

No caso das amostras de gelatina sabor morango, observou-se grande variação entre os lotes e, como também não havia quantidades declaradas, determinou-se para a marca A (em média, mg/ml): 12,7 para o acesulfame e 22,7 para o as-

Tabela 5. Média e desvio padrão para cada lote de gelatina sabor morango

Produto	Lote	Edulcorante (média ± Desvio Padrão)			
		Acesulfame	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Gelatina A	1	10,96 ± 0,35	-	-	19,08 ± 0,81
Gelatina A	2	14,53 ± 0,13	-	-	26,37 ± 0,31
Gelatina A	3	*	*	*	*
Gelatina B	1	-	9,18 ± 1,98	-	38,81 ± 4,40
Gelatina B	2	-	14,65 ± 0,73	-	43,02 ± 3,92
Gelatina B	3	*	*	*	*

* Foram injetados apenas dois lotes

partame. Para a marca B, encontrou-se 11,9 para a sacarina e 40,9 para o ciclamato (em mg/ml).

A tabela a seguir apresenta os limites máximos permitidos para o uso de edulcorantes artificiais, segundo a legislação brasileira.

Tabela 6. Limite máximo permitido para o uso de edulcorantes artificiais

Edulcorante	Acesulfame	Sacarina	Ciclamato	Aspartame
Limite Max. (mg/100ml)	35	30	130	75

Fonte: Anvisa

A Figura 1 a seguir mostra o cromatograma obtido com a injeção de amostra de refresco em pó sabor pêra.

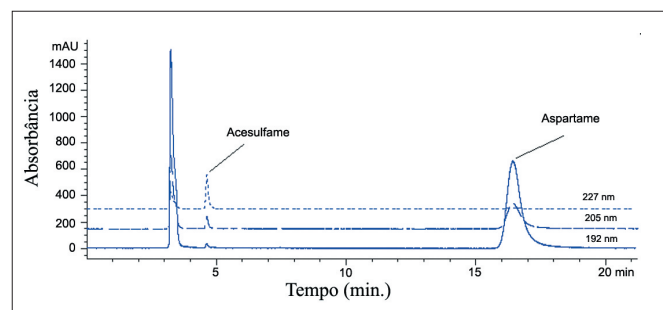


Figura 1. Cromatograma de edulcorantes presentes em refresco em pó sabor pêra (marca B). Condições cromatográficas descritas no texto. Tempos de retenção (min.): 4.6 (Acesulfame) e 16.4 (Aspartame); os outros picos correspondem a outras substâncias presentes no produto.

Como se pode observar, com uma corrida curta foi possível realizar de forma bastante eficiente a separação dos edulcorantes, não havendo interferência de outras substâncias presentes no produto.

CONCLUSÃO

O método de cromatografia líquida de alta eficiência testado mostrou-se bastante eficaz na separação dos quatro edulcorantes.

Nos testes com produtos comerciais obtiveram-se, para cada edulcorante em cada lote, valores de concentração com baixo desvio padrão e coeficiente de variação entre 5% e 6%, considerados satisfatórios. Todas as amostras estão de acordo com a legislação quanto aos limites máximos permitidos. No entanto, muitas delas não apresentaram rotulagem adequada, ou pela falta de informação da quantidade de edulcorante presente, ou pelos valores indicados, que são diferentes do realmente determinado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio financeiro da CNPQ para o desenvolvimento de projetos de pesquisa.

Referências

- MELLO, M. A. *Metodologia analítica para determinação do aspartame e seus produtos de decomposição em refrigerantes por cromatografia líquida de alta eficiência*. Campinas, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- CHEN, Q.; MOU, S. *Separation and determination of four artificial sweeteners and citric acid by high-performance anion-exchange chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 771, p.135 – 143, 1997.
- NABORS, L., GELARDI, R.C. **Alternative Sweeteners**. Second Edition. New York: Marcel Dekker, Inc., 461p, 1991.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº540, de 27 de outubro de 1997. Aprova Normas Técnicas referentes a Alimentos para Fins Especiais. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- PESARINI, S. *Determinação do Aspartame e seus Produtos de Decomposição por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Análise Sensorial da Perda de Doçura em Refrigerantes Dietéticos*. Campinas, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F.O., **Química do Processamento de Alimentos**. Campinas: UNICAMP. 232p, 1984.
- ALTSCHUL, A. M. **Low-Calories Foods Handbook**. New York: Marcel Dekker, Inc., 581p, 1993.
- KRETCHMER, N.; HOLLENBECK, C. **Sugars and Sweeteners**. Florida: CRC Press, Inc., 297p., 1991.
- GRENBY, T.H., **Advances in Sweeteners**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, p. 288, 1996.
- ZHU, Y.; GUO, Y. *Separation and Simultaneous Determination of Four Artificial Sweeteners in Food and Beverages by Ion Chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em <http://www.who.int/en/>. Acessado em 15 de abril de 2005.
- CHEN, Q.; WANG, J. *Simultaneous Determination of Artificial Sweeteners, Preservatives, Caffeine, Theobromine and Theophylline in Food and Pharmaceutical Preparations by Ion Chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 937, p.57 – 64, 2001.
- KHAN, R. **Low-Calorie Foods and Food Ingredients**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, p.183, 1993.
- ANVISA. Disponível em www.anvisa.gov.br, acessado em 12 de abril de 2005.