

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
Instituto de Ciências Exatas - Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química



Vívian Nazareth Oliveira

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
ANÁLISE DE EDULCORANTES POR ELETROFORESE CAPILAR**

Juiz de Fora
2010

Vívian Nazareth Oliveira

**Desenvolvimento e otimização de metodologia para análise de
edulcorantes por Eletroforese Capilar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Marccone Augusto Leal de Oliveira

Juiz de Fora

2010

Oliveira, Vivian Nazareth.

Desenvolvimento e otimização de metodologia para análise de edulcorantes por eletroforese capilar. – 2010.

102 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Bioquímica. 2. Aspartame. 3. Edulcorantes. I. Título.

CDU 577.1

Folha de aprovação

*Dedico esta dissertação ao meu marido
Leandro e minha mãe Lena, que me
sustentaram com amor, broncas e incentivos
nos momentos mais turbulentos deste período
de formação.*

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor de todo Universo, que me concede a capacidade para desenvolver meus estudos. A Ele toda honra e toda glória!

A minha mãe, primeira incentivadora em minha carreira acadêmica. Obrigada por ouvir meus lamentos por experimentos frustrados, mesmo sem entender, mas com toda atenção e ânsia em ajudar. A satisfação transbordante em minhas conquistas.

Ao meu esposo, por todo carinho dedicado a mim e muita paciência em relação a minha ausência, crises quanto ao curso, cansaço,.... Obrigada por suas noites revisando meu trabalho ou apenas esperando para eu não ficar sozinha. Foi melhor com você ao meu lado!!

Ao meu orientador, Profº Marcone, pela rigidez nas exigências, paciência para ensinar, tranqüilidade para corrigir e positividade nas adversidades. Sou ainda mais grata ao amigo, incentivador e confiante em minha capacidade.

Aos amigos do GQAQ Adriana, Patrícia, Brenda, Luíza, Arthur, Manoela e Carina pela colaboração no desenvolvimento das atividades no laboratório, tratamento de dados, explicações fora de hora e pelas agradáveis atividades extra-Universidade.

Agradecimento especial ao amigo Fernando Antônio, grande responsável pelo meu desenvolvimento acadêmico e gosto por CE, ainda na Iniciação Científica. Meu orientador no treinamento com equipamento, sempre aos sábados, com alegria e boa vontade. A amizade desenvolvida foi tanta que se estendeu a Maysa e se alastrou pela família... Acabou nisso: domingo tendo que me ensinar a fazer cálculos e gráficos!!!!

Também é muito grande minha gratidão a Juliana Pereira. Grande colaboradora, a quem, de olhos fechados, confiei. Obrigada por ter estado comigo

todos aqueles sábados e domingos de validação, não só pela execução em si, mas por tornar menos árduo e penoso todo procedimento.

Ao meu irmão Vítor, pelas demonstrações de confiança e orgulho.

Ao meu pai que, mesmo estando um pouco mais distante nesta etapa, é parte desta conquista, pois meus primeiros passos acadêmicos não foram no Mestrado... é fruto de muitos anos de orientação muito bem prestada.

A todos os meus tios, primos, amigos, minha avó por toda alegria em minhas conquistas e compreensão por minha ausência durante este período.

Aos Professores Guilherme e Denise, participantes da banca da Qualificação, pela rigidez com a qual me avaliaram. Suas observações tornaram meu trabalho muito melhor.

Às funcionárias da secretaria do Departamento de Química, Nayana e Simone, por toda boa vontade e préstimos.

Ao Sr. Timóteo Torres, meu patrão na DrogaNorte, meus chefes e gerente na Cesama, Cassiano Fernandes, Elenice Scalabrino Lignani e Francisco de Assis Araújo, respectivamente, pela colaboração.

MUITO OBRIGADA!!

“Até aqui nos ajudou o Senhor”

I Samuel 7.12b

RESUMO

Foi desenvolvida inovadora metodologia para a separação e quantificação simultânea de aspartame, ciclamato, sacarina e acesulfame-K por eletroforese capilar, com detecção direta e indireta UV, tempo de análise de aproximadamente 6 minutos e sem derivatização da amostra. Como o ciclamato possui baixa absorvidade, foi utilizado um sistema de eletrólito adicionado de um cromóforo, possibilitando a detecção indireta deste analito. O comprimento de onda foi escolhido considerando-se uma absorvidade intermediária entre o cromóforo do eletrólito, o aspartame, sacarina e acesulfame-K. Após teste de alguns cromóforos, o ácido benzóico foi selecionado como o mais adequado. Um ponto a ser considerado é que matrizes de alimento possuem ácido benzóico em sua constituição, sendo utilizado como conservante. Apesar dele ainda ser detectado no sistema de eletrólito e condições de análise propostos, sua quantificação não pode ser realizada, devido sua inclusão no eletrólito, demonstrando indícios de falta de ajuste do modelo linear, com 95% de confiança. A condição ótima para separação eletroforética foi obtida mediante uso de planejamento fatorial 3^2 . A otimização consistiu de $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio e $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tampão Tris-ABen ($\text{pH } 9,15 \pm 0,03$), tensão de +20 kV, injeção de 4 segundos a 50 mbar, 215 nm, utilizando levofloxacina como padrão interno. Uma amostra de preparado sólido para bebida de chá sabor limão, possuindo em sua constituição os quatro edulcorantes foi analisada, sendo o seu pré-tratamento constituído unicamente da filtração da mesma, após reconstituição, sem nenhuma derivatização. Apesar da metodologia analítica não ter sido validada, algumas figuras de mérito foram avaliados: linearidade, seletividade, limites de detecção e quantificação, precisão, recuperação e robustez. Os parâmetros avaliados demonstram um coeficiente de regressão maior que 0,98, além não apresentar falta de ajuste na faixa de concentração testada, avaliado com 95% de confiança, para todos os analitos. A seletividade foi testada mediante curva de adição de padrão, podendo-se observar um paralelismo entre os coeficientes angulares dos padrões e na amostra, indicando seletividade da metodologia. O RSD (%) para tempo de migração e área utilizando razão com padrão interno foi menor que 5% para a área e menor que 2% para o tempo de migração para os quatro analitos, considerando amostra e padrão. Os limites de detecção encontrados foram

6,8 mg L⁻¹ para aspartame, 12 mg L⁻¹ para ciclamato, 0,50 mg L⁻¹ para sacarina e 3,3 mg L⁻¹ para acesulfame-K, sendo valores mais significativos do que aqueles encontrados na literatura para determinação por CE e muito competitivos, senão melhores, que a determinação por outras técnicas. A exatidão mostrou-se dentro de limites aceitáveis, tendo os valores de recuperação no intervalo de 91,9 a 102,2%.

Palavras-chave: Aspartame. Ciclamato. Sacarina. Acesulfame-K. Eletroforese capilar.

ABSTRACT

An innovative methodology was developed to simultaneously separate and quantify aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K through capillary electrophoresis with direct and indirect detection of UV, analysis time of roughly 6 minutes and with no sample derivatization. As the cyclamate has low absorptivity we used a system of electrolyte added to a chromophore, which allowed the indirect detection of this analyte. The wavelength was chosen taking into account an intermediary absorptivity among chromophore electrolyte, aspartame, saccharin and acesulfame-K. After testing some chromophores, the benzoic acid was selected as the most appropriate. A point to be considered is that food matrices have benzoic acid in its constitution, used as a preservative. Although it is still detected in the electrolyte system and the proposed analytical conditions, its quantification cannot be attained due to its inclusion in the electrolyte, showing signs of lack of adjustments of the linear model with 95% confidence. The ideal condition for electrophoretic separation was obtained by applying 3^2 factorial design. The optimization consisted of 20.0 mmol L^{-1} of sodium tetraborate and 15.0 mmol L^{-1} Tris-Aben ($\text{pH } 9.15 \pm 0.03$), voltage of +20 kV, injection of 4 seconds at 50 mbar, 215 nm, using levofloxacin as internal standard. A sample of a solid prepared for drink lemon tea with the four sweeteners in its constitution was analyzed, and its pre-treatment consisting only of filtering the sample, after reconstitution, without any derivatization. Even though the analytical methodology was not validated, some important figures were evaluated: linearity, selectivity, limits of detection and quantification, precision, recovery and strength. The parameters assessed showed a regression coefficient greater than 0.98 and did not show lack of adjustment in the concentration range tested, evaluated as 95% granted for all analytes. Selectivity was tested through standard addition curve, which makes possible the observation of parallelism between the slopes of the patterns and the sample, indicating selectivity of the methodology. The RSD (%) for migration time and area using ratio as internal standard was less than 5% for the area and less than 2% for migration time for the four analytes, considering sample and standard. The detection limits found were 6.8 mg L^{-1} for aspartame, 12 mg L^{-1} for cyclamate, 0.50 mg L^{-1} for saccharin and 3.3 mg L^{-1} for acesulfame-K. These values are more significant than those found in the literature for determination by CE and they are

very competitive, if not better, than the determination by other techniques. The accuracy was found to be within acceptable limits, and the recovery values in the range of 91.9 to 102.2%.

Keywords: Aspartame. Cyclamate. Saccharin. Acesulfame-K. Capillary electrophoresis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1	Adoçantes nutritivos e não nutritivos.	24
Desenho 1	Estrutura química dos edulcorantes.	26
Esquema 2	Representação esquemática do sistema de eletroforese capilar	36
Esquema 3	(a) Dupla camada elétrica criada pela sílica carregada negativamente e pelos cátions próximos. (b) O predomínio de cátions na camada difusa da dupla camada produz um fluxo eletrosmótico global em direção ao catodo quando é aplicado um campo elétrico externo.	38
Esquema 4	Perfis para um fluxo laminar, induzido por pressão (acima) e para um fluxo eletrosmótico, induzido pelo campo elétrico (abaixo) e efeitos correspondentes na variância da distribuição.	39
Esquema 5	Separação de solutos de tamanho similar e cargas distintas por eletroforese capilar de zona em solução livre. Detalhe mostrando a superfície interna do capilar, carregada negativamente, e a organização da solução nas imediações da superfície. A composição vetorial das velocidades eletrosmóticas (v_{osm}) e eletroforética (v_{ep}) resulta na velocidade aparente (v_i) de migração do soluto.	42
Esquema 6	Preparo da amostra para análise.	50
Gráfico 1	- Espectro de absorção do aspartame, ciclamato, sacarina, acesulfame-K e ácido benzóico.	52
Gráfico 2	Eletoferogramas de separação para mistura de padrões contendo: LEVO (50 mg L ⁻¹), ASP (150 mg L ⁻¹), CICL (150 mg L ⁻¹), SAC(50 mg L ⁻¹), ACE (50 mg L ⁻¹) e ABen (75 mg L ⁻¹). A- detecção a 215 nm. B- detecção a 230 nm. Composição do eletrólito: 20 mmol L ⁻¹ tetraborato de sódio e 15 mmol L ⁻¹ tampão Tris-ABen (pH 9,15). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho 30 °C, capilar (50µm) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo).	53
Gráfico 3	Curva de mobilidade efetiva em função do pH.	54
Gráfico 4	Eletoferogramas de separação para mistura de padrões contendo: ASP, SAC, ACE e ABen a 200 mg L ⁻¹ cada. Composição do eletrólito: A- 20,0 mmol L ⁻¹ tampão fosfato (pH 7,47); B- 20,0 mmol L ⁻¹ tampão Tris-HCl (pH 8,23); C- 20,0 mmol L ⁻¹ tetraborato de sódio (pH 9,40); D- 20,0 mmol L ⁻¹ tampão carbonato de sódio (pH 10,36). Condições	55

de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho 30 °C, detecção a 215 nm e capilar (50µm) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo).

- Gráfico 5 Eletroferogramas de separação de mistura de padrões contendo: (1) ASP, (2) ABen, (3) SAC e (4) ACE, a uma concentração de 200,0 mg L⁻¹ cada. Composição do eletrólito: A- 20,0 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio (pH 9,40); B- 25,0 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio e 10,0 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 9,15). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho 30 °C, detecção a 215 nm e capilar (50µm) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo). 56
- Gráfico 6 Eletroferogramas de separação para mistura de padrões contendo: ASP, CICL, ABen, SAC e ACE, a uma concentração de 100,0 mg L⁻¹ cada. Composição do eletrólito: A- 25,0 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio e 10,0 mmol L⁻¹ tampão Tris-HCl e 30 µmol L⁻¹ VM (pH 9,17), 433 nm; B- 25,0 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio e 10,0 mmol L⁻¹ tampão Tris-PABA (pH 9,08), 215 nm; C – 25,0 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio e 10,0 mmol L⁻¹ tampão Tris-DNB (pH 9,15), 215 nm. Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho 30 °C, capilar (50µm) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo). (* Picos do sistema). 58
- Gráfico 7 Eletroferogramas de separação para mistura de padrões contendo: ASP, CICL, SAC e ACE. A- 100,0 mg L⁻¹ cada e B- todos a 100,0 mg L⁻¹, exceto CICL a 200,0 mg L⁻¹. Composição do eletrólito: 25,0 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio e 10,0 mmol L⁻¹ tampão Tris-DNB (pH 9,15). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho 30 °C, detecção a 215 nm e capilar (50µm) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo). (* Picos do sistema). 60
- Gráfico 8 Eletroferogramas de separação para mistura de padrões contendo: ASP, CICL, SAC, e ACE. A- 100,0 mg L⁻¹ cada e B- todos a 100,0 mg L⁻¹, exceto CICL a 200,0 mg L⁻¹. Composição do eletrólito: 25 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio e 10 mmol L⁻¹ tampão Tris-ABen (pH 9,15). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho 30 °C, detecção a 215 nm e capilar (50µm) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo). (* Picos do 62

	sistema).	
Gráfico 9	Eletroferogramas dos 9 primeiros experimentos, conforme Tabela 6. Mistura de padrões contendo: (1) ASP, (2) CICL, (3) SAC e (4) ACE, todos a 100,0 mg L ⁻¹ . Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20kV, temperatura 30°C, 215 nm e capilar (50µm) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo). (* Picos de sistema).	65
Gráfico 10	Superfície de resposta obtida pelo planejamento fatorial 3 ² .	67
Esquema 7	Esquema do mecanismo de separação de edulcorantes por CZE.	68
Esquema 8	Comparação da curva de mobilidade eletroforética com um eletroferograma.	69
Gráfico 11	Eletroferograma de preparado sólido para bebida de chá. Composição do eletrólito: 20,0 mmol L ⁻¹ tetraborato de sódio e 15,0 mmol L ⁻¹ tampão Tris-ABen (pH 9,15). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho 30°C, detecção a 215 nm e capilar (50µm) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo).	71
Gráfico 12	Eletroferogramas de seleção de PI. A- 100,0 mg L ⁻¹ de NaNO ₃ ; B- 100,0 mg L ⁻¹ de AF; C- Separação de mistura de padrões contendo: ASP, CICL, SAC, ACE e AS, todos a 100,0 mg L ⁻¹ e ABen a 50,0 mg L ⁻¹ D- Separação de mistura de padrões contendo: ASP, CICL, SAC, ACE e DNB, todos a 100,0 mg L ⁻¹ e ABen a 50,0 mg L ⁻¹ . Composição do eletrólito: 20,0 mmol L ⁻¹ tetraborato de sódio e 15,0 mmol L ⁻¹ tampão Tris-ABen (pH 9,15). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho 30 °C, detecção a 215 nm e capilar (50µm) de 48,5 cm 40,0 cm de comprimento efetivo). (*=Pico de sistema).	75
Gráfico 13	Eletroferogramas de seleção de PI. Mistura de padrões contendo: Aspartame, Ciclamato, Sacarina, Acesulfame-K, todos a 100 mg L ⁻¹ e ainda: A- 100 mg L ⁻¹ GATI e ABen a 50 mg L ⁻¹ ; B- 100 mg L ⁻¹ de LEVO. Composição do eletrólito: 20,0 mmol L ⁻¹ tetraborato de sódio e 15,0 mmol L ⁻¹ tampão Tris-ABen (pH 9,15). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho 30 °C, detecção a 215 nm e capilar (50µm) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo). (* = Pico de sistema).	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critério para utilização do termo light relacionado ao conteúdo de açúcar	22
Tabela 2	Características de composição e qualidade para alimentos com dietas de restrição de carboidratos e ingestão controlada de carboidratos	23
Tabela 3	Alguns alimentos e sua ingestão máxima diária, de acordo com o peso corporal.	32
Tabela 4	Limite máximo permitido para edulcorantes	33
Tabela 5	Comparação entre o eletrólito 20 mmol L ⁻¹ tetraborato e o eletrólito 25 mmol L ⁻¹ tetraborato e 10 mmol L ⁻¹ Tris-HCl, após três injeções consecutivas da mesma mistura de padrões.	57
Tabela 6	Planejamento fatorial 3 ² , fatores, níveis e fator de resposta.	64
Tabela 7	Faixa de concentração para estudo de linearidade.	72
Tabela 8	Tabela de análise da variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear nos parâmetros.	73
Tabela 9	Valores calculados para análise de variância e R ²	74
Tabela 10	Valores calculados para análise de variância e R ² .	78
Tabela 11	Repetibilidade (RSD %) e resolução obtida na conformidade do sistema.	79
Tabela 12	Resultados estatísticos obtidos para avaliação da seletividade e linearidade	81
Tabela 13	Valores de LD e LQ.	82
Tabela 14	RSD (%) em área e tempo de migração de padrões e amostra obtidos no estudo de repetibilidade.	84
Tabela 15	Porcentagem de recuperação encontrada para ASP, CACL, SAC e ACE.	86
Tabela 16	Comparação entre valor rotulado e valor encontrado.	87
Tabela 17	Planejamento fatorial 2 ⁴ com triplicata no ponto central para avaliação da robustez.	88

LISTA DE ABREVIATURAS

ABen	Ácido benzóico
ACE	Acesulfame-K
AF	Ácido ftálico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASP	Aspartame
AS	Ácido Salicílico
CE	Eletroforese capilar
CICL	Ciclamato
CZE	Eletroforese capilar de zona
DAD	<i>Diode array detector</i>
DNB	Ácido 3,5-Dinitro benzóico
EOF	Fluxo eletrosmótico
FIA	Análise por injeção em fluxo
FSCE	Eletroforese capilar em solução livre
GATI	Gatifloxacina
HPLC	Cromatografia à líquido de alta eficiência
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IDEC	Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LEVO	Levofloxacina
MEKC	Cromatografia eletrocinética micelar
OMS	Organização Mundial de Saúde
PABA	Ácido p-aminobenzóico
PI	Padrão interno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SAC	Sacarina
SPE	Extração em fase sólida

Tris	2-amino-2-(hydroximetil)-1,3-propanodiol
UV-vis	Ultravioleta - visível
VM	Vermelho de metila

LISTA DE SÍMBOLOS

V	Tensão
μ_{ef}	Mobilidade efetiva
α_j	Fração molar ou função de distribuição
μ_j	Mobilidade iônica de cada espécie individual j
t	Tempo de migração
W_b	Largura da banda, tomada à meia altura, nas mesmas unidades de t
R_s	Resolução entre picos de pares adjacentes
μ_{osm}	Mobilidades eletroosmótica
μ_{ep}	Mobilidades eletroforética
L_{tot}	Comprimento total do capilar
v_{osm}	Velocidade eletroosmótica
v_{ep}	Velocidade eletroforética
v_i	Velocidade aparente de migração
N	Número de pratos
H	Altura de um prato
σ^2	Variância da zona
R	Resposta
n_i	número de repetições no nível i
m	número de níveis distintos da variável independente
n	$\sum n_i =$ número total de observações
ρ	número de parâmetros do modelo
\hat{y}_i	sinal previsto
\bar{y}	média do sinal encontrado
y_{ij}	sinal observado
\bar{y}_i	média no nível
r	Coeficiente de correlação
RSD	Desvio padrão relativo
s	Desvio padrão
\bar{x}	Média aritmética
S_b	Desvio padrão da linha base

Cs	Concentração do analito
H _{máx}	Altura máxima do pico
H _{mín}	Altura da linha base
Rec	Recuperação
A _{a+s}	Área do pico com adição de padrão
A _a	Área do pico do padrão
A _s	Área do pico do analito

SUMÁRIO

1	<i>INTRODUÇÃO</i>	21
1.1	USO DE EDULCORANTES NO BRASIL E LEGISLAÇÃO	21
1.2	EDULCORANTES	24
1.2.1	Aspartame	26
1.2.2	Ciclamato	28
1.2.3	Sacarina	29
1.2.4	Acesulfame-K	30
1.3	INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL E LIMITES PERMITIDOS PARA EDULCORANTES	31
2	<i>OBJETIVO</i>	34
2.1	JUSTIFICATIVA	34
2.2	OBJETIVO	34
3	<i>PRINCÍPIOS BÁSICOS SOBRE ELETROFORESE CAPILAR</i>	35
3.1	CONCEITO	35
3.2	INSTRUMENTAÇÃO	35
3.3	INTRODUÇÃO DA AMOSTRA	36
3.4	FLUXO ELETROOSMÓTICO	37
3.5	MOBILIDADE EFETIVA	39
3.6	RESOLUÇÃO E EFICIÊNCIA	40
3.7	SOLUÇÃO TAMPÃO	43
3.8	MODOS DE SEPARAÇÃO	44
3.9	ANÁLISE DE EDULCORANTES	44
4	<i>PARTE EXPERIMENTAL</i>	48
4.1	INSTRUMENTAÇÃO	48
4.1.1	Eletroforese Capilar	48
4.1.2	Espectrofotômetro	48
4.2	CAPILAR	48
4.3	REAGENTES E PADRÕES	49
4.3.1	Reagentes	49
4.3.2	Padrões	49

4.4	SOLUÇÕES	49
4.5	PREPARO DA AMOSTRA	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	ESTUDOS PRELIMINARES	51
5.1	Seleção do comprimento de onda	51
5.1.2	Seleção do eletrólito	53
5.1.3	Desenvolvimento de metodologia para análise de ciclamato	57
5.2	OTIMIZAÇÃO DO ELETRÓLITO	63
5.3	MECANISMO DE SEPARAÇÃO PROPOSTO	67
5.4	ANÁLISE DA AMOSTRA	69
5.5	FIGURAS DE MÉRITO DE VALIDAÇÃO	72
5.5.1	Seleção do padrão interno e verificação do ajuste do modelo	74
5.5.2	Avaliação da metodologia	78
5.5.2.1	Teste de conformidade do sistema	78
5.5.2.2	Seletividade e Linearidade	80
5.5.2.3	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	81
5.5.2.4	Precisão	83
5.5.2.5	Exatidão	85
5.5.2.6	Robustez	87
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS	90
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICE A	97
	APÊNDICE B	99
	ANEXO I	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 USO DE EDULCORANTES NO BRASIL E LEGISLAÇÃO

No Brasil, até 1988 os produtos *diet* e *light* eram restritos à comercialização em farmácias e se constituíam basicamente de adoçantes dietéticos. Até então eram considerados medicamentos e controlados pela Vigilância Sanitária de Medicamentos. A partir de 1988, passaram a ser considerados alimentos e agora são controlados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (HARA; HORITA; ESCANHUELA, 2003).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor (IDEC), “nos últimos 13 anos, o setor de edulcorantes cresceu 1875%, movimentando em 2003 US\$ 3 bilhões, ou seja, 35% dos lares brasileiros consomem algum tipo de produto diet ou light, sendo mais freqüentes os adoçantes de mesa, refrigerantes e sucos” (PESQUISA ..., 2006). Tal aumento no consumo está relacionado ao interesse das pessoas em melhorar a saúde, sua aparência física e boa forma corporal, uma vez que os adoçantes têm um poder dulcificante muitas vezes maior que o do açúcar, com a vantagem de ter uma quantidade de calorias muito menor, diminuindo, portanto os impactos que uma dieta rica em açúcar pode ter sobre a qualidade de vida das pessoas (ADOÇANTES ..., 2006).

O termo *light*, de acordo com a legislação atual (BRASIL, 1998^a) é utilizado para designar alimentos com propriedades nutricionais muito diversificadas. Este termo é aplicado quando o atributo é BAIXO ou REDUZIDO para valor energético, açúcar, gordura total, gordura saturada, colesterol ou sódio. É possível um alimento receber esta denominação quando o atributo é BAIXO ou REDUZIDO com relação a apenas um desses componentes (PEREIRA et al., 2003).

A Tabela 1 relaciona as condições para declarações relacionadas ao conteúdo de açúcares para utilização do termo *light*.

Tabela 1- Critério para utilização do termo light relacionado ao conteúdo de açúcar.

Conteúdo Absoluto de Açúcar
<ul style="list-style-type: none"> - Máximo de 5 g / 100 g (sólidos); - Máximo de 5 g / 100 mL (líquidos); e - Mesmas condições exigidas para atributos REDUZIDO ou BAIXO valor energético, ou frase “este não é um alimento com valor energético reduzido” ou frase equivalente.
Conteúdo Comparativo de Açúcar
<ul style="list-style-type: none"> - Redução mínima de 25% açúcar; - Diferença maior que 5 g de açúcar / 100 g (sólido) e 5 g de açúcar / 100 mL (líquido); e - Mesmas condições exigidas para os atributos REDUZIDO ou BAIXO VALOR ENERGÉTICO ou frase “este não é um alimento com valor energético reduzido” ou frase equivalente, quando a redução de mais de 25% de açúcar implicar em aumento ou manutenção do valor energético do produto.

Fonte: Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998.

A Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998 (BRASIL, 1998b) define “Alimentos para Fins Especiais” como aqueles especialmente formulados ou processados, nos quais se introduzem modificações no conteúdo de nutrientes, adequados a utilização em dietas, diferenciadas ou opcionais, atendendo as necessidades de pessoas em condições metabólicas e fisiológicas específicas. Dentre as classificações feitas nesta portaria, apenas podem ser denominados alimentos diet: alimentos para dietas com restrições de nutrientes (carboidratos, gorduras, proteínas, sódio, outros alimentos destinados a fins específicos) e alimentos para ingestão controlada de nutrientes (alimentos para controle de peso e alimentos para dietas de ingestão controlada de açúcar).

A Tabela 2 apresenta as definições e valores permitidos para alimentos em que é permitido o uso da denominação diet, correlacionadas a açúcares.

Tabela 2- Características de composição e qualidade para alimentos com dietas de restrição de carboidratos e ingestão controlada de carboidratos.

DIETAS COM RESTRIÇÃO DE CARBOIDRATOS		
Tipos	Definição	Valores Permitidos
1- Sacarose, frutose e ou glicose (dextrose).	Alimentos especialmente formulados para atender às necessidades de pessoas com distúrbio no metabolismo destes açúcares.	Máximo 0,5 g de sacarose, frutose e/ou glicose por 100 g ou 100 mL do produto final a ser consumido.
2- Outros mono e/ou dissacarídeos	Alimentos especialmente formulados para atender às necessidades de portadores de intolerância à ingestão de dissacarídeos e/ou erros inatos do metabolismo de carboidratos	Máximo de 0,5 g do nutriente em referência por 100 g ou 100 mL do produto final a ser consumido.
3- Adoçantes com restrições de sacarose, frutose e/ou glicose – Adoçantes dietéticos.	Adoçantes formulados para dietas com restrição de sacarose, frutose e/ou glicose, para atender as necessidades de pessoas sujeitas a restrição desses carboidratos.	As matérias primas sacarose, frutose e glicose não podem ser utilizadas na formulação desses produtos alimentícios
INGESTÃO CONTROLADA DE CARBOIDRATOS		
	Alimentos especialmente formulados para atender às necessidades de pessoas que apresentam distúrbios do metabolismo de açúcares, não devendo ser adicionados de açúcares.	É permitida a presença dos açúcares naturalmente existentes nas matérias primas utilizadas.

Fonte: Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998.

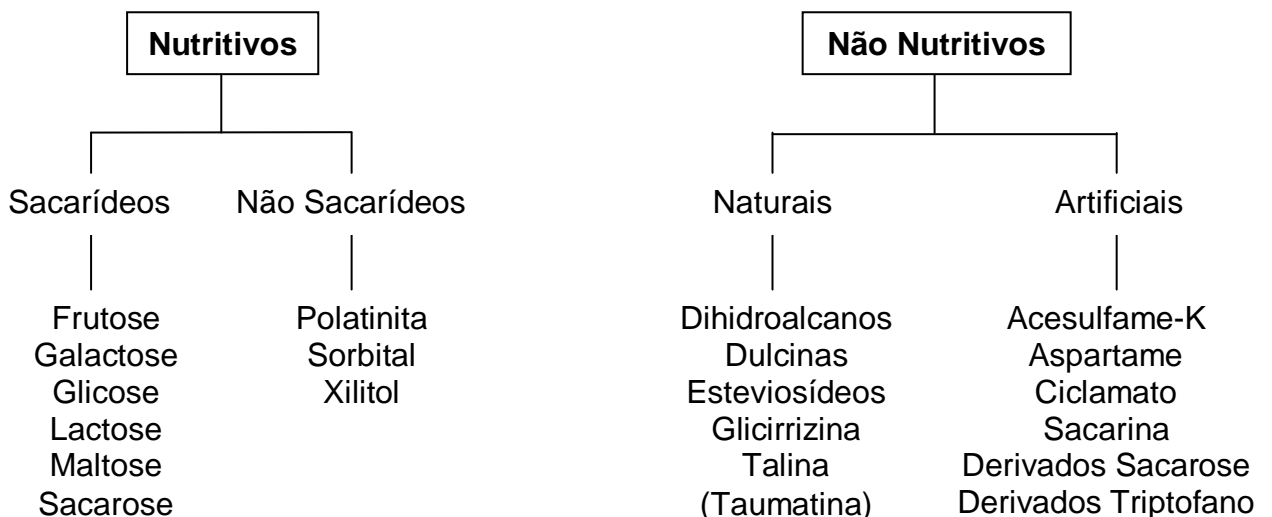
A Portaria nº 38, de 13 de janeiro de 1998 (BRASIL, 1998c), que aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de adoçantes de mesa define “Adoçante de Mesa” como os produtos especificamente formulados para conferir sabor doce aos alimentos e bebidas, sendo que quando o produto for formulado para dietas com restrição de sacarose, frutose e glicose (dextrose), para atender a necessidade de pessoas sujeitas a restrição de ingestão desses açúcares, são designados como “Adoçantes Dietéticos”, os quais devem atender aos dispositivos do Regulamento Técnico para Alimentos para Fins Especiais.

1.2 EDULCORANTES

A redução ou restrição do açúcar na alimentação requer a substituição desta por outras substâncias que supram o sabor doce nos alimentos, tendo um papel significativo para o convívio social e psicológico de indivíduos com deficiência de metabolização do açúcar (CASTRO; FRANCO, 2002) ou aqueles dispostos a uma alteração no estilo de vida em busca de menor ingestão calórica.

Conforme a Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997 (BRASIL, 1998d) edulcorantes são aditivos alimentares (ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas e biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento) com a função de conferir sabor doce aos alimentos, diferindo dos açúcares. Este conceito será adotado neste trabalho. Porém, quando não se considera a natureza química, mas apenas a propriedade de conferir sabor doce, os termos adoçante e edulcorante podem ser empregados indistintamente.

Os edulcorantes podem ser naturais ou artificiais, e ainda nutritivos ou não nutritivos, conforme esquema descrito na Esquema 1:



Esquema 1- Adoçantes nutritivos e não nutritivos.

Fonte- Fatibello-Filho et al., (1996).

Podem ainda ser classificados em dois grandes grupos:

- Agentes de corpo: são usados em alimentos em que textura e o volume, além do dulçor, são importantes, como em doces, bolos e gomas de mascar. Este grupo de edulcorantes fornece menor quantidade de calorias, porém com redução não muito significativa. Englobam basicamente os edulcorantes nutritivos.

- Edulcorantes intensos ou não nutritivos: consistem em substâncias com intenso sabor doce, usados em pequenas quantidades para substituir a doçura de grandes quantidades de sacarose. Possuem uso muito difundido, principalmente em associações (KROGER, M. et al., 2006).

No Brasil são quatro os edulcorantes artificiais não nutritivos mais disseminados no mercado consumidor, a saber: acesulfame-K (ACE), aspartame (ASP), ciclamato (CICL) e sacarina (SAC) (FATIBELLO-FILHO et al., 1996), os quais são permitidos em mais de 90 países.

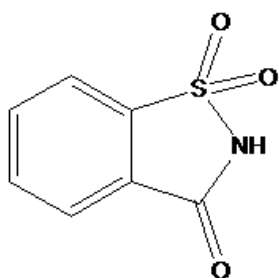
O adoçante ideal deve:

a) contribuir com calorias (< 2 kcal/g) ou ser isento, permitir níveis irrestritos de utilização e proporcionar as propriedades funcionais, qualidade de doçura, sabor residual e perfil de doçura *versus* tempo, semelhantes aos da sacarose, sem gosto lateral não doce;

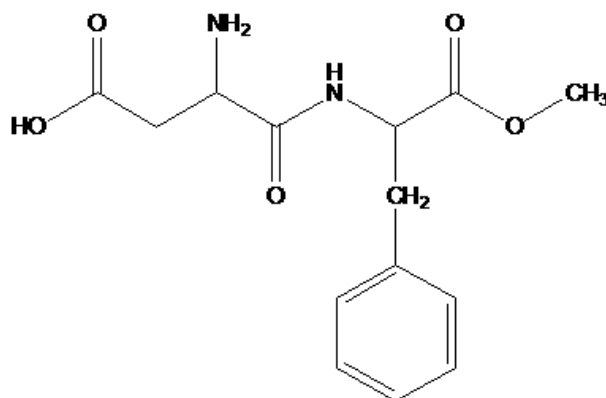
b) ter poder adoçante igual ou superior ao da sacarose (baixo custo/unidade de doçura), compatibilidade química com aditivos, como aromatizantes e corantes, e fácil solubilidade e estabilidade química e térmica;

c) ser incolor, inodoro, inerte aos demais componentes dos alimentos, isento de toxidade e normalmente metabolizado ou resistente à digestão. Ele não deve promover diarreia osmótica nem cáries (PEREIRA et al., 2003).

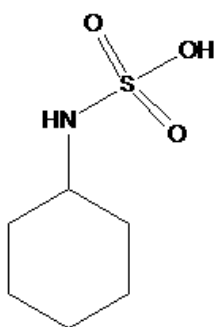
O Desenho 1 mostra a estrutura química dos edulcorantes de interesse no presente trabalho.



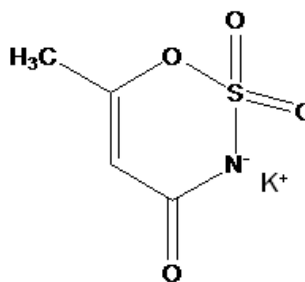
SACARINA

 $pK_a = 2,0$ 

ASPARTAME

 $pK_{a1} = 3,19$ $pK_{a2} = 7,87$ 

CICLAMATO

 $pK_a = 1,9$ 

ACESULFAME-K

 $pK_a = 2,0$

Desenho 1- Estrutura química dos edulcorantes.

Fonte- O autor (2010).

1.2.1 Aspartame

A descoberta do aspartame, assim como a grande maioria dos edulcorantes, foi acidental. Nos anos 60, um dos projetos da G.D Searle and Company (Skokie, Illinois), era encontrar um inibidor para gastrina, produto utilizado no tratamento de úlcera. O tetrapeptídeo terminal da gastrina (Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) foi empregado como padrão para ensaio biológico e o aspartame (Asp-Phe-O-Met) foi o intermediário na síntese. Em 1965, o pesquisador James M. Schlatter aquecia o aspartame em um frasco contendo metanol quando a mistura espirrou para fora do frasco e caiu-lhe nos dedos. Minutos após, levando o dedo a boca para folhear um

livro sentiu um sabor extremamente doce. O aspartame possui mais de 20 análogos, um dos quais é 33000 vezes mais doce que a sacarose.

O aspartame é o éster metílico de dois aminoácidos, a fenilalanina e o ácido glutâmico, ou seja, éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina. A molécula de aspartame é composta 39,5% de ácido aspártico, 50% de fenilalanina e 10,5% de éster metílico.

O aspartame tem o sabor do açúcar: o perfil de doçura é o que mais se aproxima ao da sacarose apesar de desenvolver-se mais lentamente e persistir por mais tempo. Não deixa qualquer sabor residual amargo, químico ou metálico, frequentemente associados aos demais edulcorantes.

Sua doçura é 120 a 220 vezes superior a da sacarose (133 e 200 vezes em relação à sacarose a 10% e 4%, respectivamente). Para refrigerantes pode-se considerar o valor de 180. A doçura relativa ou potência (concentração de sacarose dividida pelo do aspartame a igual doçura) varia com o sistema alimentar utilizado. O aspartame é geralmente mais potente a baixas concentrações e em produtos a temperatura ambiente que em produtos gelados ou quentes. Fatores como pH e presença de outros aditivos podem afetar a potência do aspartame. Podem ocorrer perdas em presença de alguns flavorizantes, especialmente a base de aldeídos (benzaldeídos, vanilina, citral, n-decanal) ou mesmo outros componentes de alimentos que contenham compostos carbonílicos. A reatividade é influenciada pela concentração relativa dos reagentes, pH e atividade da água.

O efeito sinérgico é observado na combinação de aspartame com vários dos carboidratos ou dos edulcorantes intensos. A mistura aspartame – acesulfame-K na proporção 1:1, aumenta o poder adoçante do aspartame (290 vezes em relação à sacarose a 10%), podendo atingir, dependendo do tipo de alimento em que é aplicado, valores de 3 a 6 vezes superiores que quando utilizados individualmente. Suas propriedades edulcorantes são ainda melhores quando em mistura com glucona-delta-lactona, sais gluconados e bicarbonato de sódio.

Devido ao alto poder adoçante, são necessárias quantidades mínimas para produzir a doçura desejada, reduzindo a ingestão calórica. Seu valor calórico é 4 kcal g⁻¹, no entanto, assumindo doçura relativa de 180, o valor calórico por unidade de doçura é de aproximadamente 0,02kcal/g. Este valor mostra uma contribuição desprezível relativamente à doçura.

A máxima estabilidade do aspartame esta na faixa de pH de 3,0 a 5,0 onde se encontra a maioria dos alimentos e bebidas, e em teor de umidade de 4,0 a 4,5%.

Não provoca cáries, retardando ou inibindo a formação de placas e diminuindo a desmineralização do esmalte (CÂNDIDO; CAMPOS,1996).

1.2.2. Ciclamato

A descoberta do ciclamato (Michael Sveda, Universidade de Illinois), em 1937, foi atribuída a uma contaminação acidental de um cigarro com um derivado da ciclohexilamina.

É denominado ácido ciclohexilsulfâmico, podendo existir sob quatro formas químicas: ácido ciclâmico, ciclamato de cálcio, de sódio e de potássio. O sal sódico é o mais utilizado, embora o sal de cálcio possa também ser empregado em dietas hipossódicas.

O ciclamato mostra lenta percepção da doçura com duradouro sabor residual desagradável doce-azedo, o qual torna difícil a determinação da exata equivalência de doçura dos ciclamatos em altas concentrações. Segundo alguns autores, o ciclamato não apresenta gosto amargo como a sacarina. Mostra sinergia com edulcorantes intensos como sacarina, acesulfame-K, aspartame, sucralose, alitame e esteviosídeo, e também com sacarose. A mistura na proporção de dez partes de ciclamato para uma de sacarina, onde cada um contribui com metade da doçura, é a mais satisfatória, pois, além de acentuar a doçura, elimina o sabor residual de ambos. Essa mistura mostra perfil de doçura semelhante ao da sacarose, realça sabores, como o de frutas, e proporciona a sensação de mais corpo a refrigerantes de baixa caloria. A mistura com acesulfame-K mostra excelente estabilidade ao armazenamento.

As principais propriedades do ciclamato são:

- a) 30-50 vezes mais doce que a sacarose (para alimentos – fator superior a 30; bebidas a base de fruta – fator de 40);
- b) estável a frio ou a quente (resiste à cocção prolongada);
- c) estável na forma seca, em soluções aquosas e em presença de gases (refrigerantes);
- d) estável em ampla faixa de pH (em solução aquosa na faixa de 2,0 a 10,0) e as variações ocorridas durante o processamento de alimento e bebidas;

e) altamente solúvel em água (19,5 g/100 mL a 20 °C);

f) longa vida de prateleira.

O ciclamato não é cariogênico e não apresenta o efeito anti-cariogênico demonstrado por acesulfame-K, sacarina e aspartame (CÂNDIDO; CAMPOS,1996).

1.2.3 Sacarina

A sacarina foi descoberta em 1879 pelo químico norte americano Constantin Fahlberg, que trabalhava no laboratório de Ira Remsen na universidade de John Hopkins nos Estados Unidos, quando estudava a oxidação das sulfonamidas (O-toluenosulfonamidas), substâncias obtidas de derivados do petróleo.

Apesar de ter sido inicialmente usada como antisséptico e como conservante de alimentos, vem sendo comercializada como edulcorante desde 1900. Sua incorporação em alimentos aumentou significativamente durante as duas Guerras Mundiais em decorrência da escassez e racionamento de açúcar.

Quimicamente corresponde a 2,3-dihidro,3-oxobenzeno na sulfanazol. A sacarina pode ser comercializada sob a forma ácida, ou sob a forma de sais de sódio, cálcio ou amônio.

A sacarina apresenta uma série de características que a tornam muito próximas do adoçante ideal: alto poder edulcorante (200 a 700 vezes superior ao da sacarose; 200 vezes em relação à sacarose a 10%), alta estabilidade, alta solubilidade em água (sal de sódio – 82 g / 100 g; sal de cálcio – 67 g / 100 g), não higroscópica, não cariogênica e poder calórico nulo.

A sacarina mostra sinergia com vários edulcorantes intensos, no entanto, este efeito é muito pouco acentuado com acesulfame-K ou esteviosídeo. O perfil de doçura da sacarina é diferente do da sacarose, pois produz um impacto bastante lento que vai crescendo gradativamente até atingir intensidade máxima e persistente. Gosto amargo ou metálico e adstringente está associado ao dulçor da sacarina e tendem a intensificar-se com o aumento da concentração. Nos países onde é permitido o uso de ciclamato, a associação de sacarina e ciclamato mascara o sabor residual da sacarina ao mesmo tempo em que eleva o poder adoçante do ciclamato, sendo a proporção 1:10 a melhor.

Devido à estabilidade térmica (inalterável após uma hora a 150 °C) e em meio altamente ácido, a sacarina pode ser utilizada em produtos assados, temperos para

saladas, geléias, gelatinas, bebidas carbonatadas, preparados para refresco, enlatados e outros produtos. É o edulcorante mais econômico considerando a relação custo/poder edulcorante (CÂNDIDO; CAMPOS,1996).

1.2.4 Acesulfame-K

A descoberta do acesulfame-K por Karl Clauss e H. Jensen, da companhia Hoechst, em 1967, na Alemanha, ocorreu acidentalmente quando os pesquisadores trabalhavam no desenvolvimento de novos produtos e descobriram um composto de gosto doce, não sintetizado anteriormente. O nome inicial era “acetosulfam” e, em 1978, a OMS (Organização Mundial de Saúde) registrou o nome genérico “acesulfame potassium salt”, sendo que, atualmente, foi abreviado para acesulfame-K.

Estruturalmente lembra à sacarina. Quimicamente, o acesulfame-K é o sal potássico da sulfonamida cíclica 6-metil,1,2,3-oxatiazina-4(3H)-ona-2,2-dióxido. Variações de substitutos nas posições 5 e 6 do anel afetam a intensidade e a pureza da doçura.

O acesulfame-K mostra excelente estabilidade nas seguintes condições: na forma seca, por armazenamento prolongado, as alterações no processamento especialmente a temperaturas elevadas e pH baixo, em contato com outros ingredientes ou constituintes dos alimentos, e ao ataque microbiológico. A estabilidade em solução depende do pH e da temperatura. É altamente estável em solução na faixa de pH de alimentos e bebidas (variável de pH 3 ao da neutralidade). Em pH abaixo de 3,0 e acima de 9,0, a hidrólise é mais rápida, sendo influenciada pela temperatura.

O acesulfame-K não é higroscópico e é rapidamente solúvel em água (270 g L^{-1} a $20 \text{ }^\circ\text{C}$; 1 kg L^{-1} a $100 \text{ }^\circ\text{C}$). Não é cariogênico, podendo ser anti-cariogênico, sendo que os produtos que o contêm podem apresentar o símbolo de um dente molar e um guarda-chuva utilizado em muitos países e divulgado pela “British Dental Association” como logo marca de “Happy Tooth”.

É cerca de 180 a 200 vezes mais doce que soluções de sacarose a 4 e 3%, respectivamente. Como ocorre com outros edulcorantes, a intensidade de doçura não aumenta proporcionalmente ao aumento da concentração. Concentrações de acesulfame-K superiores a 800 mg L^{-1} (0,08%) não promovem nenhum aumento de

doçura, sendo 600 mg L^{-1} o teor máximo indicado. O grau de doçura do acesulfame-K é semelhante ao do aspartame, aproximadamente metade do da sacarina e quatro vezes superior ao do ciclamato. Estas relações são importantes porque obtém-se sinergia máximo quando a mistura é feita na razão inversa da intensidade de doçura, ou onde 50% da doçura, por exemplo, aspartame 1:1, ciclamato 1:3 ou 1:5 (CÂNDIDO; CAMPOS, 1996).

1.3 INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL E LIMITES MÁXIMOS PERMITIDOS PARA EDULCORANTES

Nenhum adoçante é perfeito para todos os usos, contudo limitações podem ser eliminadas por meio da combinação de dois ou mais adoçantes. Na indústria alimentícia, é de grande valor a concepção do adoçante múltiplo. Essa concepção consiste na utilização de combinações de adoçantes e edulcorantes, de maneira que permita obter níveis mais elevados de doçura, aperfeiçoar o gosto, procurando produzir perfil de doçura o mais próximo possível ao da sacarose, mascarar sabores residuais, aumentar a estabilidade, aumentar a solubilidade em água, reduzir o custo de produção e do preço unitário da mistura, reduzir a contribuição calórica do agente edulcorante artificial e de exposição do consumidor a um único adoçante, fazendo com que a quantidade de cada edulcorante usado permaneça bem abaixo de sua Ingestão Diária Aceitável (IDA) e dentro dos limites legais (PEREIRA et al., 2003).

Considerando-se a preocupação existente quanto à segurança dos edulcorantes, visto as suspeitas, de serem potenciais carcinogênicos, a ANVISA fixou a IDA dos aditivos, tendo para isso observado os limites estabelecidos pela Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). O JECFA é o comitê científico, vinculado a Organização Mundial de Saúde (OMS), que faz a análise de segurança de uso dos aditivos para alimentos. A IDA (expressa em mg da substância/kg de massa corporal) é a estimativa da quantidade máxima que uma substância pode ser ingerida diariamente, com segurança, durante toda a vida, sendo definida de acordo com os conhecimentos científicos disponíveis na época da avaliação toxicológica do aditivo.

A Tabela 3 apresenta a IDA para os edulcorantes de interesse neste trabalho, correlacionando-os com o seu teor em alguns alimentos e seu consumo diário máximo, considerando-se indivíduos de pesos diferentes.

Tabela 3- Alguns alimentos e sua ingestão máxima diária, de acordo com o peso corporal.

Produto	Composição (mg/100 mL)		IDA (mg/kg de peso)	Ingestão máxima diária	
				Indivíduo com 70 kg Adulto	Indivíduo com 30 kg Criança
Refrigerante a base de cola	ASP	24	40	18,5 latas	7,9 latas
	ACE	16	15		
Refrigerante a base de guaraná	CICL	31	11	65,7 latas	3 latas
	ASP	12	40		
	SAC	5	5		
Preparado sólido para refresco 1	ASP	28	40	30,8 copos	13,2 copos
	CICL	12,5	11		
	ACE	3,2	15		
	SAC	1,2	5		
Preparado sólido para refresco 2	CICL	120	11	3,2 copos	1 copo
	SAC	9,75	5		

1 Lata = 355 mL; 1 Copo = 200 mL

Fonte- O autor (2010).

A ingestão segura dos alimentos é muito dependente da composição do mesmo, sendo bem variável a quantidade que se pode consumir de produto para produto. Nota-se que a oferta de alimentos contendo edulcorantes deve ser administrada com cuidado para crianças, uma vez que a IDA é facilmente atingida. O ciclamato é responsável pela limitação da quantidade de alimentos a ser ingerido na maioria das formulações em que está presente. Estudo realizado sobre o consumo de adoçantes dietéticos indica que a combinação sacarina e ciclamato é consumida por 45,2% dos entrevistados, seguido pelo aspartame, com uma frequência de 29,3%. A mistura sacarina/ciclamato é a mais econômica existente no mercado (CASTRO; FRANCO, 2002).

Observando-se a necessidade de segurança do uso de aditivos na fabricação de alimentos e considerando que o emprego destes aditivos deve ser limitado a alimentos específicos e em menor nível para alcançar o efeito desejado, a ANVISA estabeleceu limites máximos de edulcorantes em alimentos. A Tabela 4 sintetiza as informações quanto a limites máximos pertinentes aos edulcorantes em estudo.

Tabela 4- Limite máximo permitido para edulcorantes.

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

(1) Exceto para gomas de mascar e micro pastilhas de sabor intenso, com limite máximo de 0,5 g/100 g e de 0,25 g/100 g, respectivamente.

(2) Exceto para gomas de mascar e micro pastilhas de sabor intenso, com limite máximo de 1,0 g/100 g e de 0,6 g/100 g, respectivamente.

(3) Exceto para bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas, com limite máximo de 0,075 g/100 mL.

(4) Exceto para bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas, com limite máximo de 0,056 g/100 mL.

(5) Exceto para gomas de mascar com limite máximo de 0,12 g/100 g.

Fonte: Resolução RDC nº 18, de 24 de março de 2008.

2 OBJETIVO

2.1 JUSTIFICATIVA

Visto os limites de IDA e a quantidade máxima por produto, é relevante que métodos de identificação e quantificação de edulcorantes sejam desenvolvidos a fim de se avaliar a conformidade com a legislação, não somente quando a limites máximos, mas também quanto à presença ou não no produto, uma vez que devem ser declarados no rótulo, ou ainda não utilizados em países onde seu uso é proibido.

2.2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e otimizar metodologia analítica alternativa por eletroforese capilar de zona para análise simultânea de aspartame, ciclamato, sacarina e acesulfame-K com detecção espectrofotométrica direta e indireta, sem derivatização.

3 PRINCÍPIOS BÁSICOS DE ELETROFORESE CAPILAR

3.1 CONCEITO

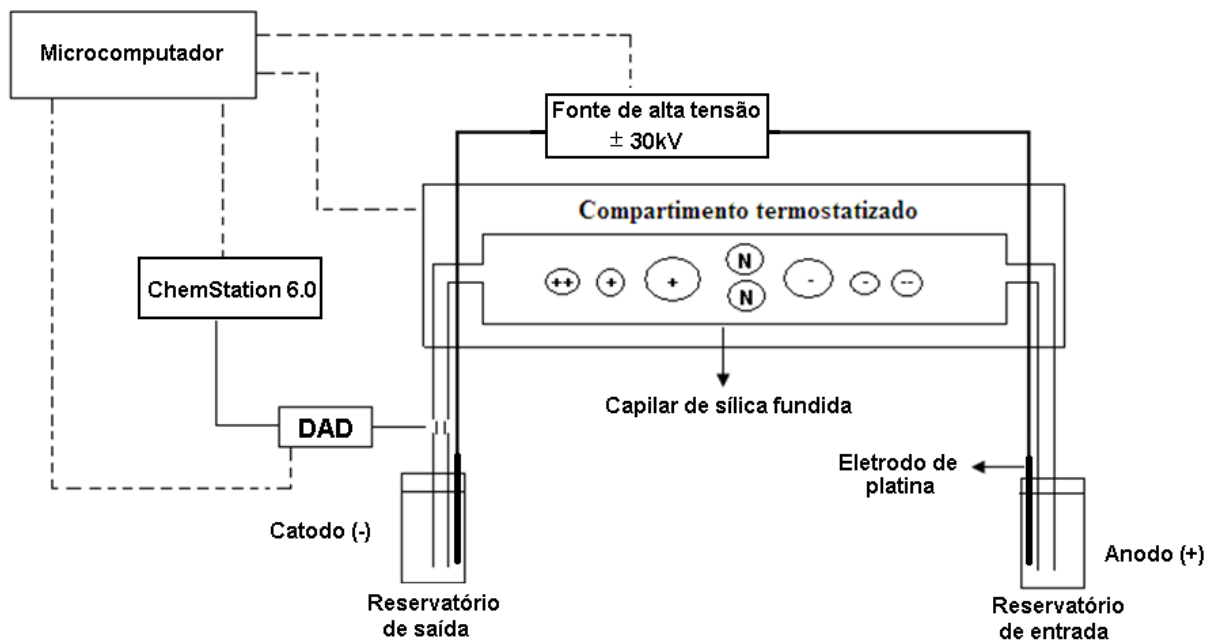
A eletroforese capilar (CE, "capillary electrophoresis") é definida como uma técnica que opera em meio líquido, baseado na migração diferenciada de compostos, neutros, iônicos ou ionizáveis, mediante a aplicação de um campo elétrico, tangenciando uma coluna capilar (sílica fundida, teflon ou pirex) a qual contém em seu interior uma solução de eletrólito conveniente, normalmente tamponado, atuando como canal de migração (KUHNS; HOFFSTETTER-KUHNS, 1993; BAKER, 1995; TAVARES, 1996).

3.2 INSTRUMENTAÇÃO

Em CE, a separação é conduzida em tubos com dimensões de 15 a 100 μm de diâmetro interno, e 50 a 100 cm de comprimento. O uso do capilar oferece muitas vantagens sobre outros meios utilizados para eletroforese (placa de gel, papel). A geometria do capilar (elevada área superficial interna relativo ao volume) favorece a dissipação do calor (oriunda do efeito Joule), sendo possível o estabelecimento de campos elétricos substancialmente maiores, resultando em separações de alta eficiência (geralmente excede 10^5 pratos), resolução inigualável e tempos de análise apreciavelmente curtos.

O sistema (Esquema 2) consiste em uma fonte de alta tensão, capilares (sílica fundida é o material mais comumente empregado), eletrodos (geralmente platina) e um detector apropriado. Uma fonte de corrente contínua regulada de alta tensão é usada para estabelecer o campo elétrico ao longo do capilar. Tais fontes podem, em geral, ser operadas a tensão constante e/ou corrente constante, com valores típicos de voltagem no intervalo de 0-50 kV e corrente de 0-200 μA . O operador é protegido contra um contato acidental com a alta voltagem pela inclusão do sistema inteiro, ou pelo menos o terminal de alta voltagem, numa caixa de acrílico, equipadas com chaves de segurança. A fonte de alta tensão é conectada, através de eletrodos de platina, a dois reservatórios contendo uma solução de um eletrólito conveniente. Tubos capilares de sílica fundida são então preenchidos com a solução, e servem como canal de migração. As extremidades do capilar são

imersa nos reservatórios da solução para completar o contato elétrico. Para minimizar efeitos térmicos, o capilar deve ser mantido a temperatura constante. Há várias possibilidades para termostatização do sistema, incluindo circulação de um líquido de ar através do cartucho contendo o capilar, além do uso de ventiladores e fornos. Os comandos para o controle do equipamento e aquisição de dados são feitos mediante interface com o computador (TAVARES, 1996).



Esquema 2- Representação esquemática do sistema de eletroforese capilar

Fonte: O autor (2010).

3.3 INTRODUÇÃO DA AMOSTRA

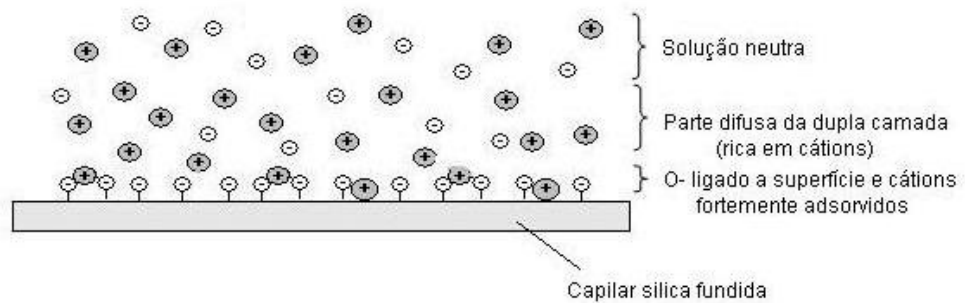
A maneira pela qual a amostra é introduzida no capilar tem implicação direta em análise quantitativa. Em eletroforese capilar, amostras podem ser introduzidas no capilar por métodos electrocinéticos ou hidrodinâmicos. Na injeção electrocinética, um gradiente de potencial é estabelecido ao longo do capilar, enquanto que na injeção hidrodinâmica utiliza-se um gradiente de pressão. O gradiente de pressão pode ser estabelecido por diferentes mecanismos: pressurização ou vácuo em um reservatório de solução, ou por gravidade, onde um dos reservatórios é elevado em relação ao outro e a amostra é introduzida por sifonagem.

A injeção hidrodinâmica introduz no capilar uma alíquota representativa da composição do soluto na amostra. O volume de injeção (nL) depende do tempo de injeção, dimensões do capilar, viscosidade da solução tampão e da diferença de pressão estabelecida. A injeção hidrodinâmica é usualmente mais precisa que a eletrocinética porque é baseada estritamente na transferência de volume (a repetibilidade da área do pico obtido é de aproximadamente 1% do desvio padrão relativo). Entretanto, pode ocorrer alargamento significativo da zona, como resultado do perfil de velocidade parabólico, característica do fluxo induzido por pressão. Injeções hidrodinâmicas são preferidas em aplicações de eletroforese de zona em solução livre e micelar, particularmente quando a concentração da amostra está dentro dos limites de sensibilidade do detector (TAVARES, 1996).

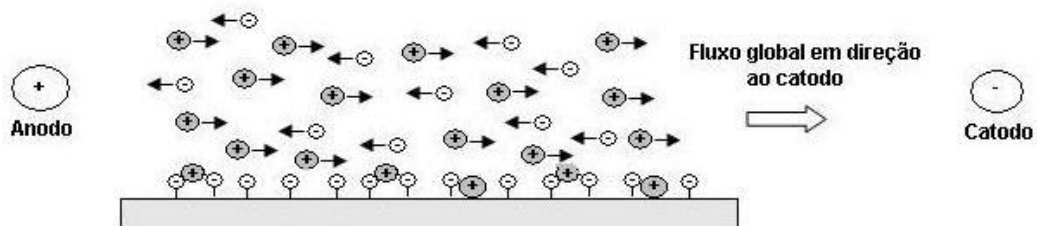
3.4. FLUXO ELETROSMÓTICO

A parede interna de um capilar de sílica fundida contém grupos silanóis (Si-OH) com uma carga negativa (Si-O⁻) acima de pH \approx 2. O Esquema 3^a mostra a dupla camada elétrica na parede do capilar. Uma camada imóvel de cátions, fortemente adsorvidos, adjacentes à superfície negativa neutraliza parcialmente a carga negativa. A carga negativa residual é neutralizada pelo excesso de cátions móveis solvatados na parte difusa da dupla camada na solução próxima à parede. Em um campo elétrico, os cátions são atraídos para o catodo e os ânions são atraídos para o anodo (Esquema 3b). O excesso de cátions na parte difusa da dupla camada confere uma força em direção ao catodo. Esta ação de bombeamento, chamada eletroosmose, é conduzida pelos cátions solvatados dentro de aproximadamente 10 nm nas paredes e cria um fluxo eletrosmótico (EOF, "electroosmotic flow") uniforme na solução inteira em direção ao catodo (BAKER, 1995).

a)



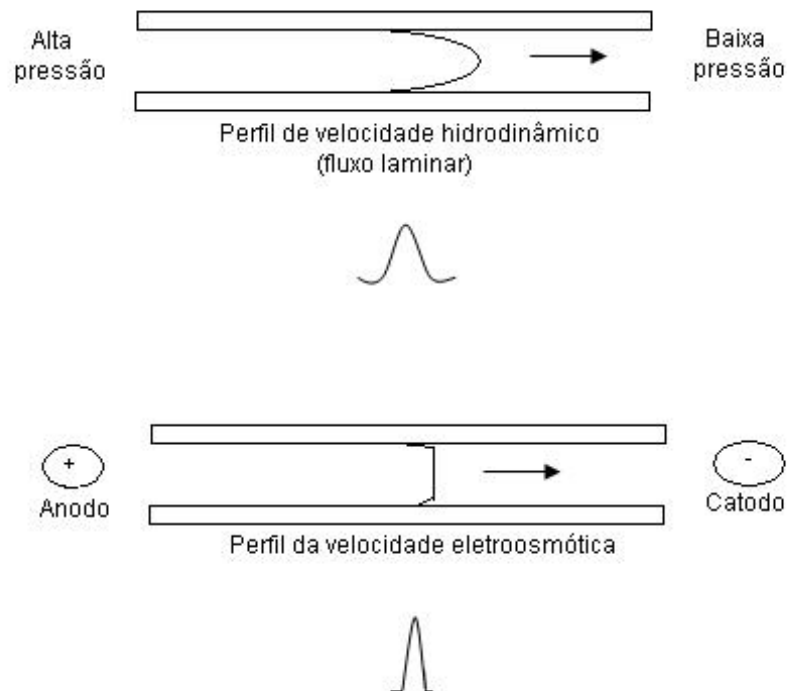
b)



Esquema 3- (a) Dupla camada elétrica criada pela sílica carregada negativamente e pelos cátions próximos. (b) O predomínio de cátions na camada difusa da dupla camada produz um fluxo eletroosmótico global em direção ao catodo quando é aplicado um campo elétrico externo.

Fonte: O autor (2010).

A existência do EOF tem importantes implicações na eletroforese capilar. O fluxo de solução contribui significativamente para a automação da técnica, permitindo a introdução de amostra e detecção diretamente no capilar. Quando a velocidade eletroosmótica é de grande magnitude, o fluxo é responsável pela condução dos solutos, sem distinção de carga, em direção ao detector. Assim, a análise simultânea de amostras contendo tanto solutos catiônicos e neutros como aniônicos é possível, muito embora não haja discriminação temporal entre diferentes solutos neutros. Além disso, as características de alta eficiência da técnica estão, em parte, vinculadas ao perfil radial da velocidade eletroosmótica (Esquema 4). Sendo linear, o mesmo componente de velocidade é adicionado a todos os solutos, independentemente da sua posição radial. Esta peculiaridade distingue a eletroforese capilar dos métodos cromatográficos em fase líquida em coluna, que apresentam um perfil de velocidade parabólico, característico do fluxo induzido por pressão (TAVARES, 1996).



Esquema 4- Perfis para um fluxo laminar, induzido por pressão (acima) e para um fluxo eletroosmótico, induzido pelo campo elétrico (abaixo) e efeitos correspondentes na variância da distribuição.

Fonte: O autor (2010).

3.5 MOBILIDADE EFETIVA

Para soluções de eletrólitos compostos de um ácido ou base fracos, existem pelo menos duas espécies em equilíbrio, a molécula não ionizada (com mobilidade zero), e a base ou ácido conjugado, cada qual com um valor particular de mobilidade. Assim, da mesma forma que os íons simples são caracterizados por um valor de mobilidade iônica (μ_i), o conceito de mobilidade efetiva é utilizado para descrever a migração de eletrólitos fracos. A mobilidade efetiva (μ_{ef}) pode ser calculada pela definição clássica de Tiselius, na qual qualquer substância i presente em solução em diferentes formas j , relacionadas entre si por um equilíbrio ácido-base rápido, irá migrar em um campo elétrico como um soluto único, possuindo uma certa mobilidade efetiva dada pela equação (1):

$$(\mu_{ef})_i = \sum (\mu_j \alpha_j) \quad (1)$$

Onde:

μ_{ef} = Mobilidade efetiva

α_j = Fração molar ou função de distribuição

μ_j = Mobilidade iônica de cada espécie individual j.

As funções de distribuição dependem da magnitude das constantes de dissociação do soluto (pK_a), e determinam a predominância relativa das várias espécies num intervalo de pH. Desta forma, a equação (1) sugere uma dependência indireta entre a mobilidade efetiva e o pH do meio (TAVARES, 1996).

3.6 RESOLUÇÃO E EFICIÊNCIA

Em qualquer problema analítico envolvendo separação, o objetivo fundamental é o de atingir completa resolução entre todos os componentes da mistura. A resolução (equação (2)) entre as bandas de dois solutos adjacentes é definida pela diferença entre o tempo de migração (t), dividida pelo valor médio entre as larguras de base de cada banda (W_b), expressas nas mesmas unidades dos tempos de migração.

$$R_{s\ i,i+1} = \frac{2(t_{i+1} - t_i)}{W_{bi} + W_{bi+1}} \quad (2)$$

Onde:

$R_{s\ i,i+1}$ = Resolução entre picos de pares adjacentes

t_i = Tempo de migração

W_b = Largura da base

Na presença de fluxo eletrosmótico, o tempo de migração do soluto i , do ponto de injeção até a posição do detector (L_{det}) é determinada por sua velocidade aparente de migração (v_i), que é a combinação vetorial da velocidade eletrosmótica (v_{osm}) e eletroforética (v_{ep}), de acordo equação (3):

$$t_i = \frac{L_{det}}{v_i} = \frac{L_{det}}{v_{osm} + v_{ep}} = \frac{L_{det}L_{tot}}{(\mu_{osm} + \mu_{ep})V} \quad (3)$$

Onde:

t_i = Tempo de migração do soluto

v_i = Velocidade aparente de migração

v_{osm} = Velocidade eletrosmótica

v_{ep} = Velocidade eletroforética

μ_{osm} = Mobilidade eletrosmótica

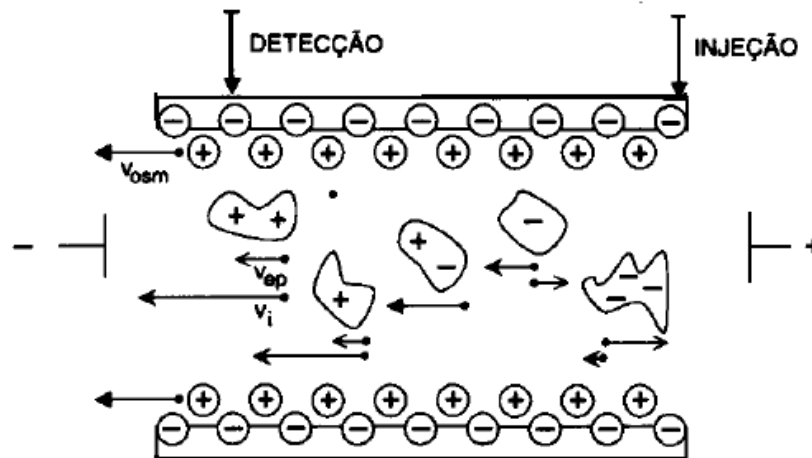
μ_{ep} = Mobilidade eletroforética

V = Tensão aplicada

L_{tot} = Comprimento total do capilar

L_{det} = Comprimento efetivo do capilar

O Esquema 5 ilustra a separação de alguns solutos com aproximadamente o mesmo tamanho, mas cargas distintas, na situação de velocidade eletrosmótica maior, em módulo, que a velocidade eletroforética de qualquer um dos solutos presentes. Na prática, esta situação é conseguida quando o eletrólito é uma solução de pH elevado e baixa concentração. O detector é fixo em uma posição conveniente, perto do final do capilar. O soluto catiônico migra com uma velocidade maior que a que migraria na ausência de fluxo, e, portanto chega ao detector em um tempo menor. O soluto neutro (velocidade eletroforética nula) migra exclusivamente pela ação do EOF. Se a amostra contém vários solutos neutros, com tamanhos aproximadamente iguais, estes passariam pelo detector no mesmo tempo, como uma banda única, não resolvida. O soluto aniônico é arrastado pelo EOF para o pólo de carga similar, e migra com uma velocidade menor que a do soluto neutro, ou pode permanecer parado ou retornar para o reservatório de entrada se a magnitude da mobilidade eletroforética for igual ou maior que a mobilidade eletrosmótica, respectivamente.



Esquema 5- Separação de solutos de tamanho similar e cargas distintas por eletroforese capilar de zona em solução livre. Detalhe mostrando a superfície interna do capilar, carregada negativamente, e a organização da solução nas imediações da superfície. A composição vetorial das velocidades eletrosmóticas (v_{osc}) e eletroforética (v_{ep}) resulta na velocidade aparente (v_i) de migração do soluto.

Fonte: Tavares (1996).

É importante observar que medidas experimentais do tempo de migração sempre levam à determinação de mobilidades aparentes. A mobilidade eletrosmótica precisa ser determinada separadamente, para que a mobilidade eletroforética do soluto possa ser avaliada. O tempo de migração de uma molécula neutra, como indicativo da velocidade eletrosmótica, constitui um dos métodos mais simples.

Conforme a equação (4), a eficiência de uma separação esta diretamente relacionada à variância da zona e pode ser expressa em termos do número de pratos.

$$N = \frac{L_{det}^2}{\sigma^2} \quad (4)$$

Onde:

N = Número de pratos

σ^2 = Variância da zona

L_{det} = Comprimento efetivo do capilar

ou pela altura equivalente a um prato (H):

$$H = \frac{L_{\text{det}}}{N} \quad (5)$$

O número de pratos pode ser calculado diretamente de um eletroferograma através da equação (6):

$$N = 16 \left(\frac{t_i}{W_{b_i}} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_i}{W_{b_{i/2}}} \right)^2 \quad (6)$$

Onde W_b e $W_{b_{1/2}}$ é a largura da banda tomada à base e à meia altura da banda, respectivamente, nas mesmas unidades de t_i .

3.7 SOLUÇÃO TAMPÃO

Quando a separação envolve solutos com caráter ácido-base, a mobilidade eletroforética do soluto depende do pH do eletrólito. Neste caso, o termo mobilidade efetiva, o qual incorpora o produto das mobilidades eletroforéticas das espécies em equilíbrio e a distribuição das concentrações relativas de cada espécie no pH considerado, é empregado. Assim sendo, o controle de pH é aconselhável e a escolha de uma solução tampão adequada tem implicações diretas na otimização da separação. Adicionalmente, a suscetibilidade do fluxo eletrosmótico a variações de pH requer que o tampão apresente constância no valor do pH (alta capacidade). Outras propriedades desejáveis para um sistema tampão incluem: baixo valor de absorvância no comprimento de onda selecionado para a análise, e baixa mobilidade, para minimizar a geração de calor por efeito Joule. Além disso, a escolha do tampão está vinculada a considerações sobre a forma da banda: via de regra, tampões contendo íons com mobilidade semelhantes a do soluto previnem distorções no perfil da banda e minimizam o seu alargamento.

De forma geral, os sistemas tampão são eficientes em um intervalo de pH correspondente ao pK_a , mais ou menos uma unidade (TAVARES, 1996).

3.8 MODOS DE SEPARAÇÃO

Vários modos de separação, com mecanismos singulares e seletividade características, são possíveis em eletroforese capilar: fronteira móvel, zona, isotacoforese e focalização isoelétrica. Neste trabalho, o modo de separação utilizado foi a eletroforese capilar de zona, que será discutido a diante.

A eletroforese capilar em solução livre (FSCE, “Free Solution Capillary Electrophoresis”) ou eletroforese capilar de zona (CZE, “Capillary Zone Electrophoresis”), como é ainda comumente conhecida, é um dos modos de separação eletroforética mais usados na prática, provavelmente em razão da facilidade de sua implementação e otimização das condições experimentais. Em FSCE, o tubo capilar é simplesmente preenchido com um eletrólito, geralmente com características tamponantes. A separação ocorre como resultado de duas estratégias: maximizar as diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos e minimizar as causas de alargamento das zonas (TAVARES, 1997).

3.9 ANÁLISE DE EDULCORANTES

Atualmente existem várias possibilidades analíticas para análise de edulcorantes, entre as quais destacam-se análise por injeção em fluxo (FIA, “Flow Injection Analysis”), métodos eletroanalíticos, cromatográficos e espectroscópicos.

A análise por injeção em fluxo pode ser realizada através de métodos espectrofotométricos UV ou enzimáticos mediante ou não reações de derivatização através do uso de ninidrina (NOBREGA et al., 1994), fosfato de zinco imobilizado (PEREIRA; MARCOLINO-JUNIOR; FATIBELLO-FILHO, 2000) e reações enzimáticas (DINCKAYA; CAGIN; TELEFONCU, 1994; PEÑA; LIMA; SARAIVA, 2004) para o ASP, por meio de método turbidimétrico, após oxidação do grupo sulfônico a sulfato pela adição de nitrito de sódio, a 420 nm (LLAMAS et al., 2005), ou ainda pela promoção da reação com nitrito de sódio em excesso, e quantificação da sobra de nitrito por iodometria, a 350 nm no caso do CACL (ROCHA et al., 2005). A espectrofotometria direta, sem derivatização, também é utilizada, promovendo-se uma migração diferenciada dos analitos. É o caso da separação de ASP e SAC obtida por meio de pré-concentração do ASP em mini coluna em gel C₁₈ e

separação da SAC (detectada a 210 nm) que é transitoriamente retida no adsorvente Sephadex G-25 e o ASP (detectado a 205 nm) é eluído com metanol (VALENCIA et al., 2006). Na mesma linha de desenvolvimento tem-se a separação de ASP, ACE e SAC, entre outros aditivos, obtida por eluição em coluna C₁₈ (5 mm) incluída no sistema em linha, e detecção em comprimento de onda específico por um sistema de arranjo de diodos (GARCÍA-JIMENEZ; VALENCIA; CAPITÁN-VALLVEY, 2007).

A eletroanalítica pode ser utilizada para determinação de SAC (ELMOSALLAMY et al., 2005; CARLONI FILHO et al., 2003). A determinação de ASP também pode ser feita pela utilização de biosensores, com diferentes enzimas e técnicas de imobilização descritos na literatura (VILLARTA; SULEIMAN; GUILBAULT, 1993; ODACI; TIMUR; TELEFONCU, 2004). Ainda para determinação de ASP e ACE foi descrito método espectrofotométrico por transformada de Fourier (FTIR, "Fourier Transform Infrared") (ARMENTA; GARRIGUES; LA GUARDIA, 2004).

Várias metodologias utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, "High Performance Liquid Chromatography") foram desenvolvidas para a separação de misturas de edulcorantes (HUANG et al., 2006; DEMIRALAY; ÖZKAN; GUZEL-SEYDIM, 2006; CHEN; WANG, 2001; KOYAMA et al., 2005; ZHU et al., 2005; WASIK; McCOURT; BUCHGRABER, 2007; TSANG et al., 1985; CHEN et al., 1997; CHOI; HSU; WONG, 2000). De maneira geral, são métodos operantes em modo isocrático, com detecção distinta da espectrofotometria direta e necessidade de pré-tratamento das amostras. A cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas, utilizando como fase móvel acetato de dibutilamônio e acetonitrila (8:2), conseguiu a separação do ACE, SAC, ASP, CACL, sucralose, entre outros (KOYAMA et al., 2005). A separação e quantificação de 9 edulcorantes foi conseguida em gêneros alimentícios, após extração dos mesmos em tampão (pH 4,5) e clean up com extração em fase sólida, com posterior análise por cromatografia líquida com detector evaporativo de dispersão de luz (WASIK; McCOURT; BUCHGRABER, 2007). A detecção indireta do CACL foi implementada pela utilização de cromóforo na fase móvel (indicador vermelho de metila diluído em uma mistura de tampão fosfato pH 7,0 e metanol). Por esta metodologia foi possível ainda analisar ASP e SAC (CHOI; HSU; WONG, 2000). A cromatografia iônica acoplada a supressor de condutividade, utilizando KOH como eluente regenerador e detecção para condutividade, detecta ACE, SAC, ASP, CACL em 11 minutos (ZHU et al., 2005).

A calibração multivariada tem se mostrado uma alternativa para determinação de misturas de edulcorantes. Uma proposta seria a detecção espectrofotométrica do ACE, CICL e SAC baseada na cinética diferenciada de reação com permanganato de potássio, utilizando como método de referência técnica de HPLC (NI; XIAO; KOKOT, 2009). Outro método, também de determinação espectrofotométrica, determina SAC e ASP, utilizando ácido salicílico como padrão interno e a eletroforese capilar como técnica de referência (CANTARELLI et al., 2008).

A CE tem se mostrado uma ferramenta poderosa para análise envolvendo matrizes de alimentos. Devido à sua alta eficiência e resolução, baixo consumo de solventes e facilidade de automação, a CE é uma alternativa viável para determinação de edulcorantes nos diversos gêneros alimentícios. Pesek e Matyska (1997) desenvolveram um método por CZE para determinação de aspartame em alimentos utilizando 30,0 mmol L⁻¹ de tampão fosfato adicionado com 19,0 mmol L⁻¹ de tampão TRIS com detecção a 211 nm em aproximadamente 4 minutos. A desvantagem desse método é o pH de trabalho (2,14), devido à instabilidade do analito em pH menor que 3. Aspartame, cafeína e ácido benzóico foram determinados por Walker, Zaugg e Walker (1997), em bebidas utilizando 20,0 mmol L⁻¹ de tampão glicina (pH 9,0) a 215 nm, com o qual conseguiu-se obter um tempo de migração de 1,5 minutos para ASP. Thompson, Trenery e Kemmerly (1995b) também determinaram ciclamato com sucesso em 5 minutos por determinação indireta a 254 nm em bebidas e geléias utilizando o seguinte eletrólito: 1,0 mmol L⁻¹ hidróxido de hexadeciltrimetilamônio adicionado com 10,0 mmol L⁻¹ de benzoato de sódio, operando em - 20 kV. O ácido alfa-hidroxi isobutírico foi utilizado como padrão interno. HORIE e outros (2007) desenvolveram um método, aplicando-o em várias matrizes alimentícias, pela adição da etapa de clean-up com extração em fase sólida (SPE, "Solid Phase Extraction"). Os extratos das amostras foram passados em um cartucho de extração em fase sólida Oasis HLB para remover interferentes. O eletrólito consistiu em 1,0 mmol L⁻¹ brometo de hexadeciltrimetilamônio e 10,0 mmol L⁻¹ de sorbato de potássio com detecção e comprimento de onda de referência para o ciclamato foram 300 nm e 254 nm, respectivamente.

Para análise de multianalitos, diferentes modos de CE foram utilizados, sendo cromatografia eletrocínética micelar (MECK, "Micellar Electrokinetic Chromatographia") o mais comum. Thompson, Trenery e Kemmerly (1995^a) utilizaram MEKC para determinar aspartame, acesulfame-K, sacarina, alitame,

dulcina, cafeína, ácido benzóico e ácido sórbico em alimentos, incluindo bebidas de baixa caloria, massa de tomate, marmelada e bala em tempo menor que 12 minutos. O eletrólito consistia de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de desoxicolato de sódio, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de dihidrogenortofosfato de potássio, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, operando a 20 kV. O ácido dehidroacético foi utilizado como padrão interno. Outro sistema por MEKC, implementado por Boyce (1999), com detecção a 214 nm foi desenvolvido para aspartame, sacarina e acesulfame-K, além de antioxidantes e conservantes, em bebidas e geléias de baixo teor calórico com eletrólito composto por $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tampão borato e 35 mmol L^{-1} colato de sódio, $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ dodecil sulfato de sódio e 10 % de metanol em pH 9,3. Frazier e outros (2000) desenvolveram metodologia para rápida análise de aspartame, acesulfame-K e sacarina na presença de conservantes e corantes usados como aditivos em bebidas. A mistura foi separada por MEKC utilizando $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tampão carbonato a pH 9,5 com $62,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de dodecil sulfato de sódio como fase micelar, a 220 nm. Herrmannová (2006) conseguiu a separação de oito edulcorantes (aspartame, ciclamato, sacarina, acesulfame-K, lactitol, sorbitol, manitol, e xilitol) em doces e goma de mascar por isotacoforese com detecção por condutividade. A separação foi conseguida em aproximadamente 20 minutos, eletrólito líder constituído de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de HCl e 14 mmol L^{-1} tampão Tris, pH 7,7 e como eletrólito terminal 5 mmol L^{-1} L-histidina e 5 mmol L^{-1} TRIS, pH 8,3.

É importante destacar que todas as metodologias descritas por CE até agora não separaram mais de três dos quatro edulcorantes mais comuns, simultaneamente, usando detecção espectrofotométrica. Neste contexto, este trabalho descreve uma metodologia inédita para simultânea análise de aspartame, ciclamato, sacarina e acesulfame-K por CE sob detecção direta e indireta no UV em tempo de análise de 6 minutos.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

4.1.1 Eletroforese Capilar

Foi utilizado equipamento comercial Agilent CE, equipado com fonte de alta tensão ($\pm 30\text{kV}$), detector de arranjo de diodos (DAD, "Diode Array Detector"), controle de temperatura no interior do cartucho por passagem de ar forçado e programa de controle, aquisição e tratamento de dados ChemStation 6.0.

4.1.2 Espectrofotômetro

As medidas de absorção de reagentes foram feitas em um espectrofotômetro modelo UV-1601PC (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado com emissão de duplo feixe simultâneo. Celas de quartzo com caminho ótico de 1,00 cm foram usadas nas leituras.

4.2 CAPILAR

Utilizou-se capilar de sílica fundida com revestimento externo de polimida, obtido da Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, EUA), com dimensões do capilar de 50 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo. A janela de detecção foi feita por remoção da polimida, a 40 cm do início do capilar, para um comprimento total de 48,5 cm.

Sempre que um novo capilar foi utilizado, ele foi condicionado com um flush de NaOH 1,0 mol L⁻¹ durante 30 minutos, 10 minutos de água deionizada e 15 minutos de eletrólito. Entre corridas, o capilar foi submetido a uma limpeza com flush de NaOH 0,01 mmo L⁻¹, água deionizada e eletrólito por 2 minutos cada.

4.3. REAGENTES E PADRÕES

4.3.1. Reagentes

Todos os reagents utilizados foram de grau analítico. O tampão tetraborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl) foram comprados da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); Tris (2-amino-2-(hydroximetil)-1,3-propanodiol) foi comprado da Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden).

4.3.2 Padrões

Os padrões de ácido benzóico (ABen) e os edulcorantes aspartame (ASP), ciclamato (CICL), e acesulfame-K (ACE) foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). A sacarina (SAC) foi comprada da Supelco (Bellefonte, PA, USA). Levofloxacin (LEVO) foi comprada de Xiamen Mchem Pharma Group (Xiamen, China).

4.4 SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada obtida através de sistema de purificação Milli-Q.

A solução estoque de tampão $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ foi preparada pela pesagem e dissolução, em meio aquoso, de massa correspondente a $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em balão volumétrico de $200,0 \text{ mL}$. O banho de ultra-som foi utilizado para dissolução.

A solução estoque do tampão Tris-ABen foi preparada pela pesagem e dissolução, em meio aquoso, de massa correspondente a $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TRIS e $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido benzóico em balão volumétrico de $200,0 \text{ mL}$.

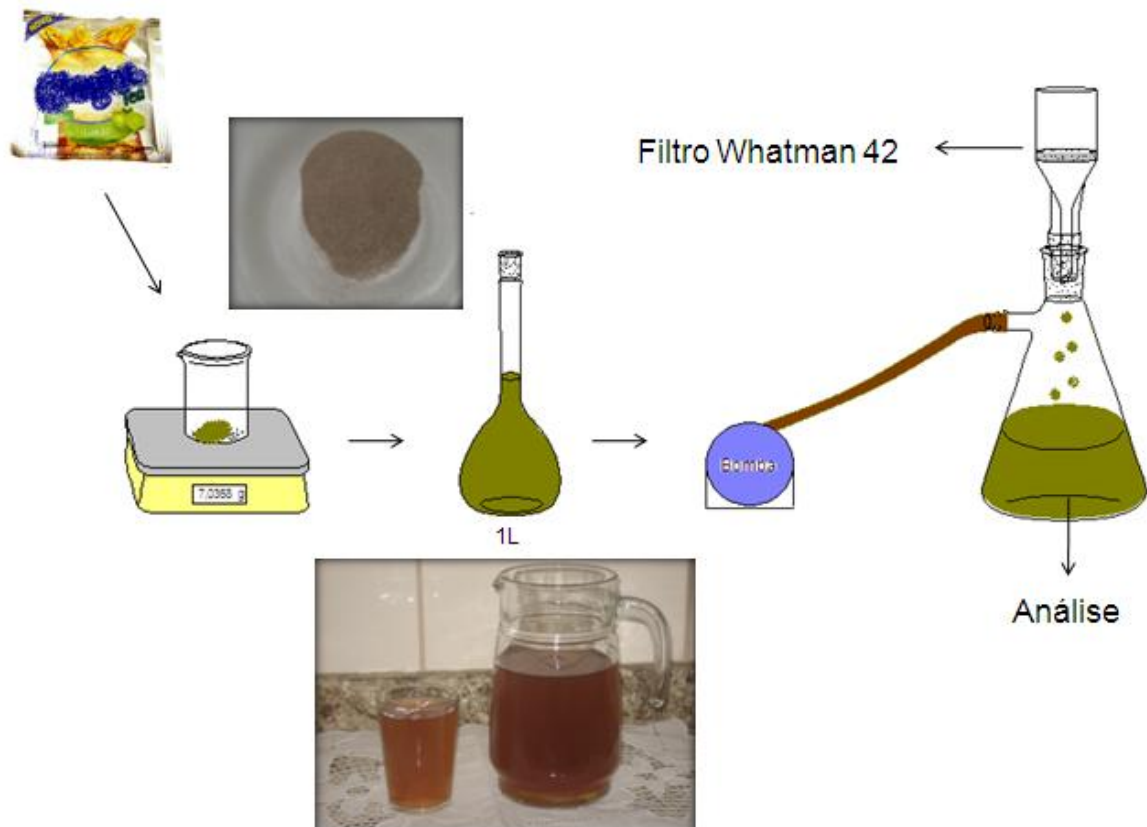
As soluções de trabalho do eletrólito foram preparadas pela apropriada diluição dos estoques. O eletrólito otimizado consistiu de $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tampão $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ e $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ Tris-ABen resultando em pH por volta de 9,15.

As soluções estoques contendo $2500,0 \text{ mg L}^{-1}$ de aspartame, $2000,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ciclamato, $1500,0 \text{ mg L}^{-1}$ de sacarina, $2000,0 \text{ mg L}^{-1}$ de acesulfame K e $1000,0 \text{ mg L}^{-1}$ levofloxacin foram separadamente preparadas e estocadas em geladeira.

Todas foram preparadas em água deionizada. As misturas de edulcorantes foram preparadas nas concentrações desejadas no momento da análise.

4.5 PREPARO DA AMOSTRA

O conteúdo de um pacote de preparado sólido para chá sabor limão, comprado em mercado local, foi pesado (7,0368 g) e solubilizado com água deionizado em um balão volumétrico de 1 L. Em seguida a amostra foi filtrada utilizando filtro Whatman 42, com sistema de vácuo, para reduzir a turbidez da amostra, ocasionada por espessante (carboximetilcelulose), 1% de polpa de limão, corante e outros aditivos que tem por finalidade fornecer flavor e textura a esta bebida.



Esquema 6- Preparo da amostra para análise.

Fonte: O autor (2010).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDOS PRELIMINARES

5.1.1 Seleção do comprimento de onda

Um estudo espectrofotométrico na região do ultravioleta (UV) foi realizado no intuito de selecionar o comprimento de onda de detecção mais adequado, levando-se em consideração a melhor resposta de sinal para os diferentes analitos investigados.

O Gráfico 1 apresenta os espectros de absorção dos edulcorantes e do ácido benzóico. Como se pode observar, um comprimento de onda próximo a 200 nm favorece a detecção da sacarina e do aspartame. No entanto, há um grande comprometimento da sensibilidade do acesulfame-K, cuja detecção seria mais eficiente em 230 nm. Walker e outros (1997) em seu estudo para determinação de aspartame, cafeína e ácido benzóico, utiliza o comprimento de onda em 215 nm, o qual se mostrou adequado para a determinação dos analitos. Considerando-se isto, decidiu-se realizar as leituras em 215 nm, uma vez que a perda da sensibilidade de aspartame, sacarina é admissível, considerando-se que o seu teor nas amostras supera o teor de acesulfame-K.

A determinação do ciclamato (na ausência de derivatização) utilizando-se detecção direta no UV/vis torna-se inviável devido à baixa absorvidade do analito, conforme também pode ser observado no Gráfico 1. Uma alternativa para sua determinação é a utilização da detecção indireta por UV.

O espectro do ácido benzóico (ABen) foi analisado por ser um aditivo comum em alimentos, utilizado com a finalidade de conservação do mesmo, e por eluir entre os analitos de interesse. Além disso, o ácido benzóico sinalizou como uma alternativa viável como cromóforo para detecção indireta do ciclamato.

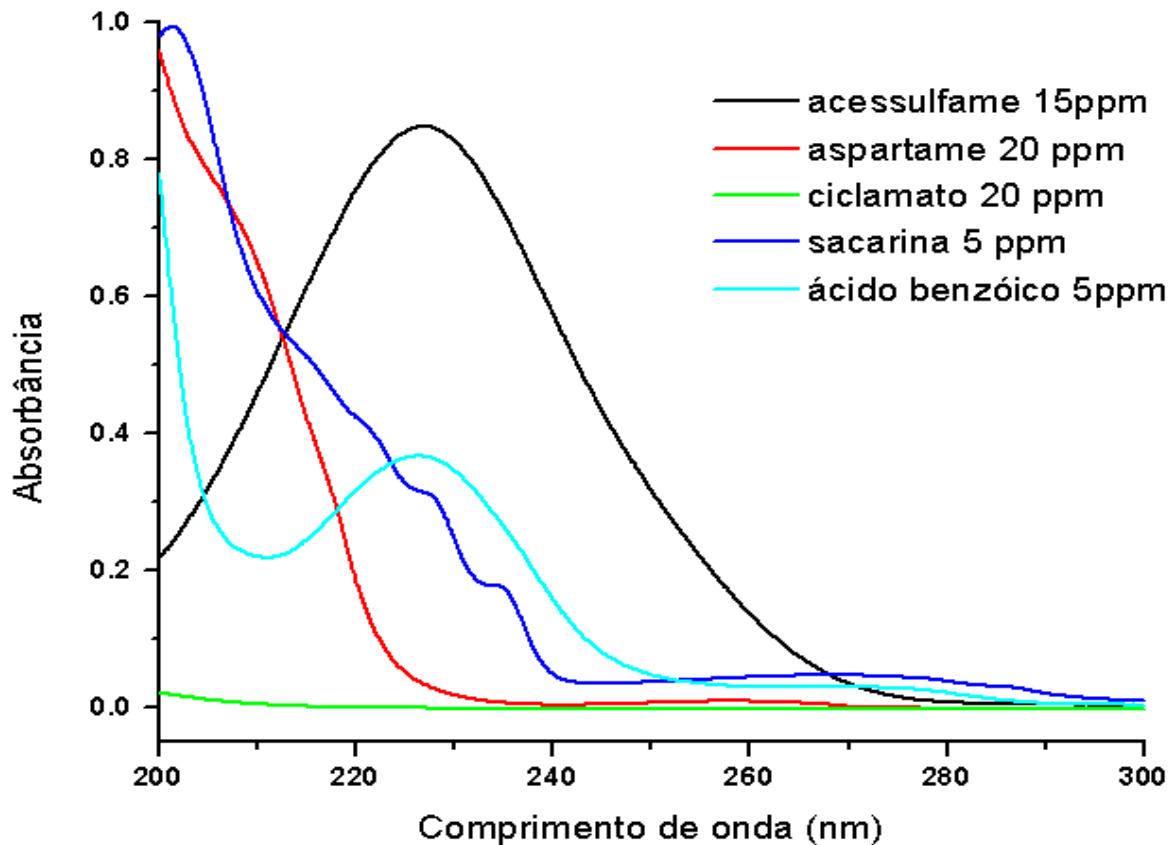


Gráfico 1- Espectro de absorção do aspartame, ciclamato, sacarina, acesulfame-K e ácido benzóico.

Fonte: O autor (2010).

Após a otimização do eletrólito para a análise simultânea dos analitos de interesse, fez-se a comparação entre o sinal obtido em 215 e 230 nm através de um estudo dos espectros através dos recursos oferecidos pelo sistema DAD (Gráfico 2). Pôde-se verificar pelo perfil dos picos que 215 nm é o melhor comprimento de onda. Embora ocorra um pequeno decréscimo do sinal para o acesulfame-K, este não é significativo quando comparado com a leitura em 230 nm para todos os demais analitos. Logo, o comprimento de onda de 215 nm é realmente o mais adequado conforme proposto por Walker e outros (1997).

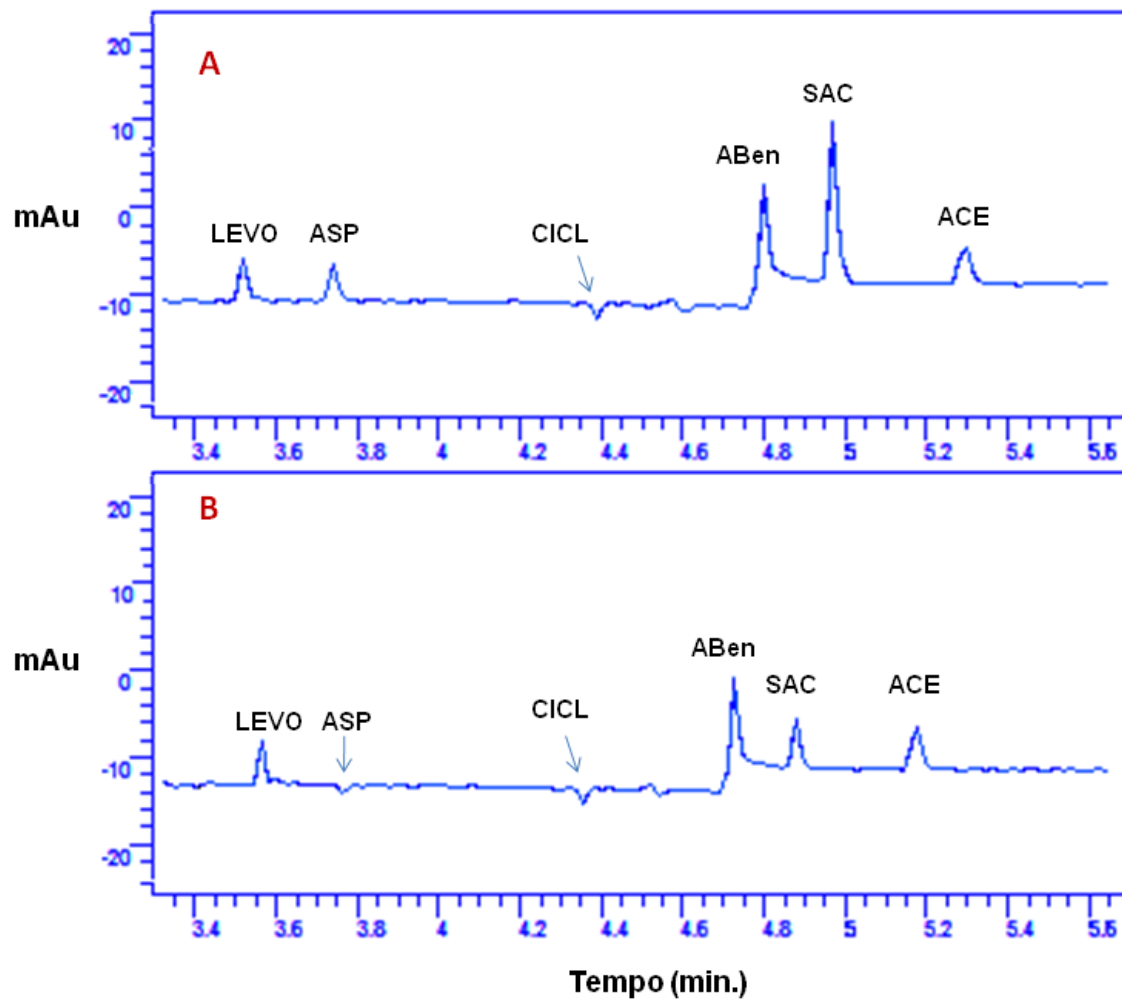


Gráfico 2- Eletroferogramas de separação para mistura de padrões contendo: LEVO (50 mg L^{-1}), ASP (150 mg L^{-1}), CICL (150 mg L^{-1}), SAC (50 mg L^{-1}), ACE (50 mg L^{-1}) e ABen (75 mg L^{-1}). A- detecção a 215 nm. B- detecção a 230 nm. Composição do eletrólito: 20 mmol L^{-1} tetraborato de sódio e 15 mmol L^{-1} tampão Tris-ABen (pH 9,15). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, capilar ($50\mu\text{m}$) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo).

Fonte: O autor (2010).

5.1.2. Seleção do eletrólito

O Gráfico 3 apresenta curvas de mobilidade efetiva versus pH para os analitos de interesse. Curvas desse tipo são excelentes indicadores de condições de pH mais propícia para a separação ocorrer, ou seja, o pH onde as diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos são maximizadas.

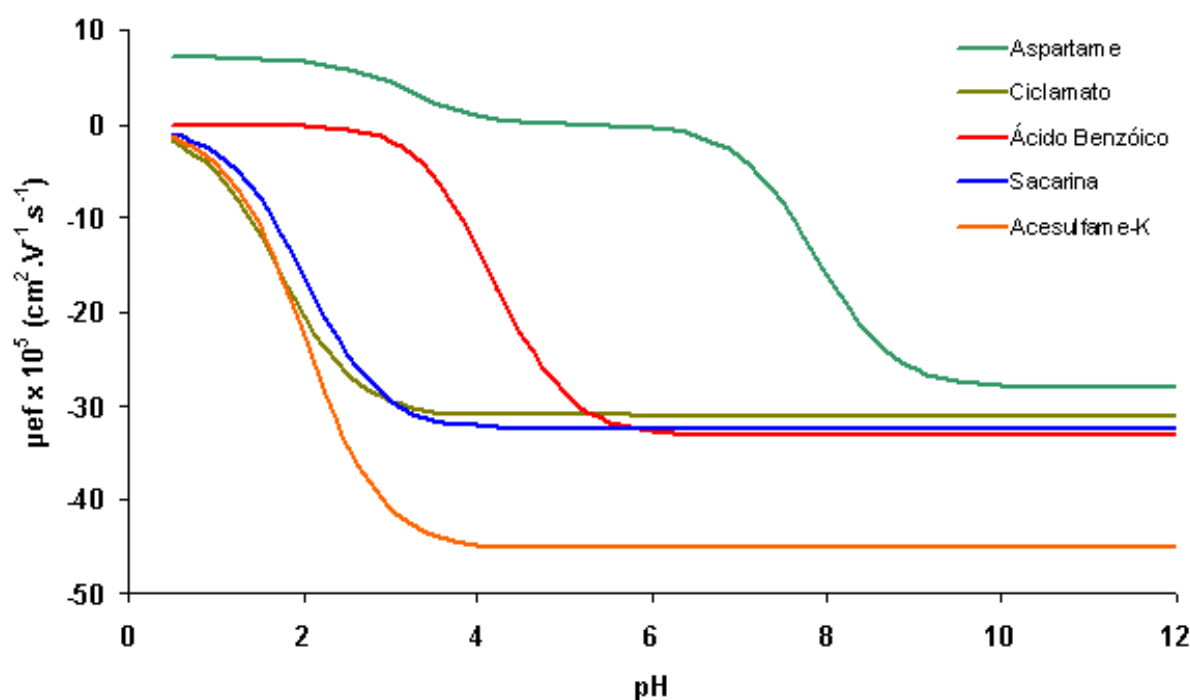


Gráfico 3- Curva de mobilidade efetiva em função do pH.

Fonte: O autor (2010).

O intervalo de pH de 7,0 a 10,5, faixa de pH com bom potencial para separação simultânea dos analitos de interesse, foi selecionado para um estudo preliminar. Quatro eletrólitos foram testados para um estudo de comportamento de separação de mistura dos edulcorantes, além do ácido benzóico, a saber: tampão fosfato (pH 7,47), Tris-HCl (pH 8,23), tetraborato de sódio (pH 9,41) e tampão carbonato de sódio (pH 10,36). O estudo foi realizado sob condições instrumentais como tensão, temperatura, injeção, comprimento de onda e dimensões do capilar constantes.

No Gráfico 4, pode-se observar a separação de três dos cinco componentes da mistura de padrões ao se utilizar 20 mmol L⁻¹ tampão fosfato (A). Usando-se o tampão 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl (B) obteve-se uma identificação de quatro dos cinco componentes, mas sem resolução satisfatória. O uso de eletrólitos com 20 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio (C) e outro com 25 mmol L⁻¹ de tampão carbonato de sódio (D) mostraram uma separação de quatro componentes, sendo que o primeiro apresentou maior sensibilidade, picos mais finos e melhor resolução que o segundo. Em nenhum dos casos o ciclamato de sódio foi detectado, o que já era de se

esperar, devido a sua baixa absorção no UV/vis. Sua determinação será discutida mais adiante.

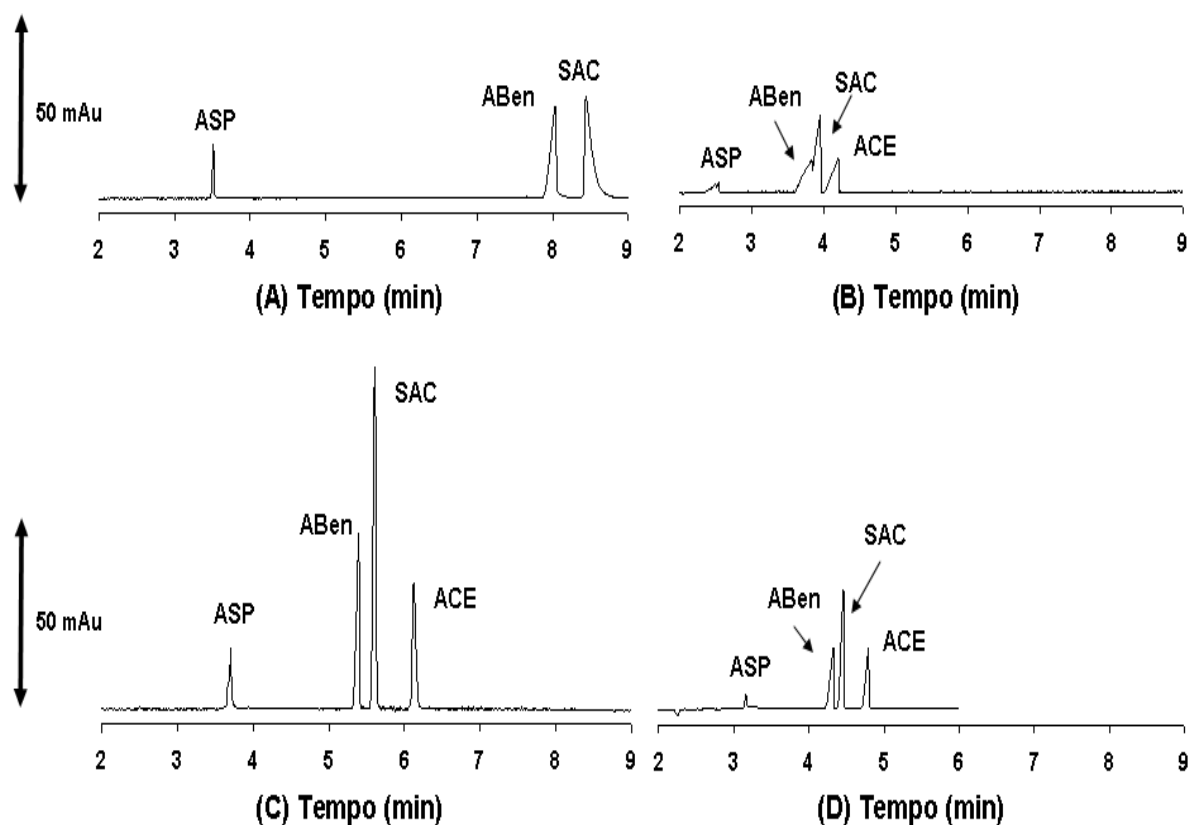


Gráfico 4- Eletroferogramas de separação para mistura de padrões contendo: ASP, SAC, ACE e ABen a 200 mg L⁻¹ cada. Composição do eletrólito: A- 20,0 mmol L⁻¹ tampão fosfato (pH 7,47); B- 20,0 mmol L⁻¹ tampão Tris-HCl (pH 8,23); C- 20,0 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio (pH 9,40); D- 20,0 mmol L⁻¹ tampão carbonato de sódio (pH 10,36). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho 30 °C, detecção a 215 nm e capilar (50µm) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo).

Fonte: O autor (2010).

Apesar dos bons resultados obtidos com eletrólito tetraborato 20,0 mmol L⁻¹, decidiu-se testar uma mistura de eletrólito constituído por tetraborato e Tris-HCl, utilizando-os numa concentração de 25,0 mmol L⁻¹ tetraborato e 10,0 mmol L⁻¹ de Tris-HCl (pH 9,15), a fim de se verificar o comportamento analítico para a separação, uma vez que o pH resultante era compatível com a faixa de pH selecionada, levando-se em consideração a curva de mobilidade efetiva.

O Gráfico 5 mostra a comparação entre o eletroferograma obtido com o eletrólito composto por 20 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio e o obtido com 25 mmol

L^{-1} de tetraborato de sódio / $10 \text{ mmol } L^{-1}$ Tris-HCl. Pode-se notar que o eletrólito com $25 \text{ mmol } L^{-1}$ de tetraborato de sódio / $10 \text{ mmol } L^{-1}$ Tris-HCl apresenta um comportamento mais promissor, o que pode ser comprovado ao se analisar a Tabela 5. Pelos resultados obtidos há uma menor deformação nos picos e maior sensibilidade e maior eficiência (número de pratos). Logo, o eletrólito contendo mistura de tetraborato e Tris/HCl foi considerado superior ao contendo apenas tetraborato.

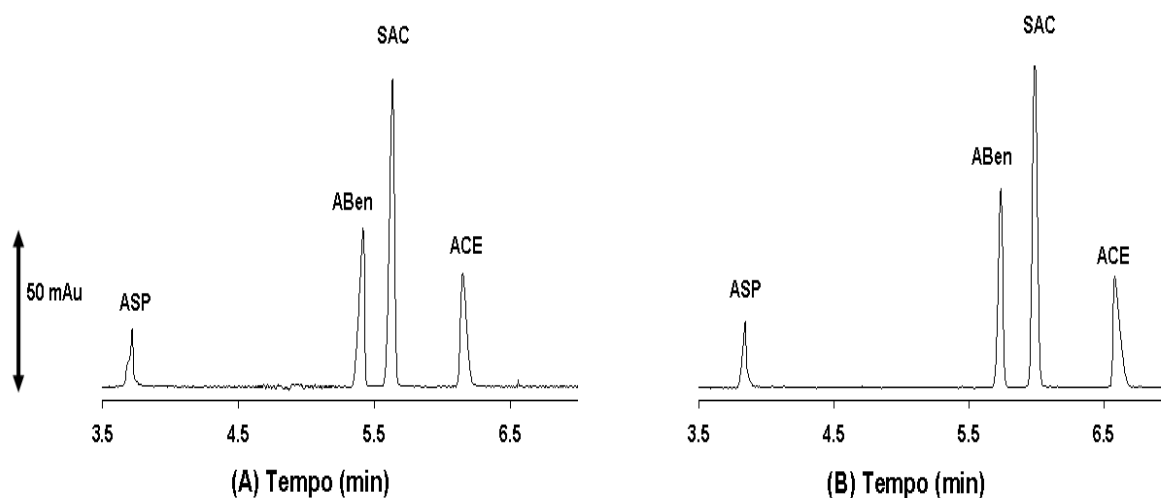


Gráfico 5- Eletroferogramas de separação de mistura de padrões contendo: (1) ASP, (2) ABen, (3) SAC e (4) ACE, a uma concentração de $200,0 \text{ mg } L^{-1}$ cada. Composição do eletrólito: A- $20,0 \text{ mmol } L^{-1}$ tetraborato de sódio (pH 9,40); B- $25,0 \text{ mmol } L^{-1}$ tetraborato de sódio e $10,0 \text{ mmol } L^{-1}$ Tris-HCl (pH 9,15). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, detecção a 215 nm e capilar ($50\mu\text{m}$) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo).

Fonte- O autor (2010).

Tabela 5- Comparação entre o eletrólito 20 mmol L⁻¹ de tetraborato e o eletrólito 25 mmol L⁻¹ de tetraborato e 10 mmol L⁻¹ de Tris-HCl, após três injeções consecutivas da mesma mistura de padrões.

		ASP	ABen	SAC	ACE
20 mmol L⁻¹ de tetraborato	Tempo de migração	3,70	5,39	5,60	6,11
	Área	42,93	156,47	286,90	128,97
	Resolução	11,2 (ASP, ABen)	1,7 (ABen, SAC)	3,5 (SAC, ACE)	-
	Número de pratos	55811	79692	97395	78013
25 mmol L⁻¹ de tetraborato e 10 mmol L⁻¹ de Tris-HCl	Tempo de migração	3,83	5,72	5,97	6,56
	Área	50,03	168,00	310,57	136,43
	Resolução	13,8 (ASP, ABen)	1,8 (ABen, SAC)	3,8 (SAC, ACE)	-
	Número de pratos	63640	116894	11822	71092

Fonte- O autor (2010).

5.1.3 Desenvolvimento de metodologia para análise de ciclamato

Para compostos que apresentam baixa absorvidade molar no UV/vis, como o ciclamato, é possível utilizar a detecção espectrofotométrica indireta. Usando este modo de detecção, um composto que absorva luz, um íon cromóforo, é utilizado no tampão de corrida, criando uma grande absorbância de fundo. Para determinação de ânions, o soluto aniônico que não absorve presente na amostra desloca o ânion cromóforo no tampão. Quando o soluto que não absorve passa pelo detector, causa uma redução na absorbância, resultando em uma queda na linha base que apresenta um pico negativo. A detecção indireta no UV/vis é um método universal, no qual todos os solutos podem ser detectados (BAKER, 1995).

Testou-se a utilização do ácido p-aminobenzóico (PABA), o ácido 3,5-dinitro benzóico (DNB) como contra-íons do tampão Tris. Como o indicador vermelho de metila (VM) fora utilizado com sucesso em HPLC (CHOI; HSU; WONG, 2000) também foi testado, havendo, no entanto a necessidade de alterar o comprimento de onda de leitura para 433 nm. Neste comprimento de onda esperava-se fazer uma detecção indireta de todos os analitos. O perfil de separação pode ser observado no Gráfico 6.

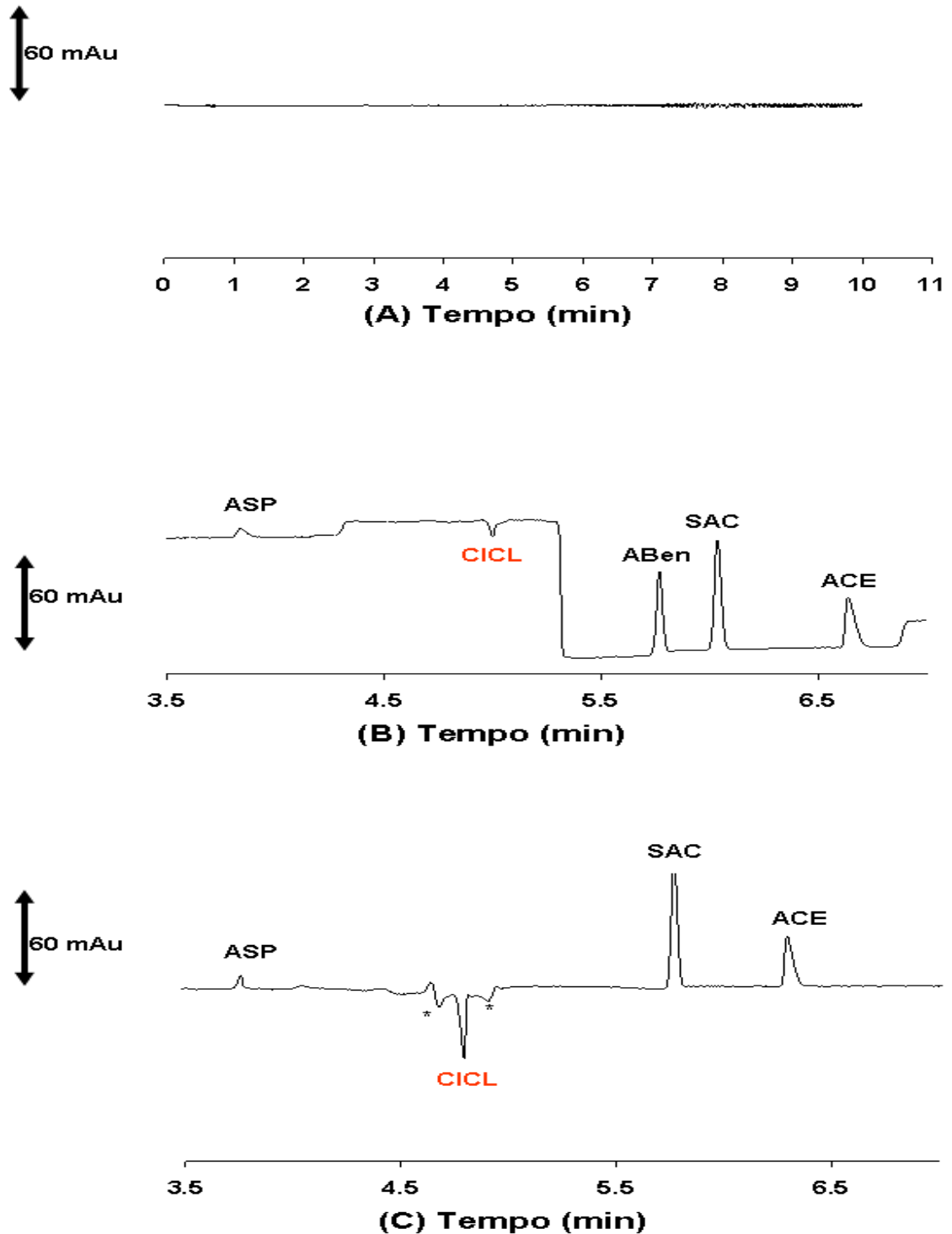


Gráfico 6- Eletroferogramas de separação para mistura de padrões contendo: ASP, CACL, ABen, SAC e ACE, a uma concentração de $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ cada. Composição do eletrólito: A- $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tetraborato de sódio e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tampão Tris-HCl e $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ VM (pH 9,17), 433 nm; B- $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tetraborato de sódio e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tampão Tris-PABA (pH 9,08), 215 nm; C – $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tetraborato de sódio e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tampão Tris-DNB (pH 9,15), 215 nm. Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho $30 \text{ } ^\circ\text{C}$, capilar ($50 \mu\text{m}$) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo). (* Picos do sistema).

Fonte- O autor (2010).

O eletrotroferograma referente ao VM não reproduziu o bom resultado obtido em HPLC, não sendo identificado nenhum analito. Com o PABA e DNB foi possível detectar a presença de um pico negativo, característico da detecção indireta. Tal pico negativo, em ambos os casos, foi confirmado como sendo referente ao ciclamato. Como o experimento com PABA apresentou uma grande queda da linha base, desconsiderou-se o uso deste eletrólito. No experimento com DNB, detectou-se a presença de um pico negativo central pronunciado, com dois picos menores adjacentes. Para confirmar a identificação de ciclamato, fez-se uma nova injeção, aumentando-se para 200 mg L^{-1} a concentração dos padrões (Gráfico 7).

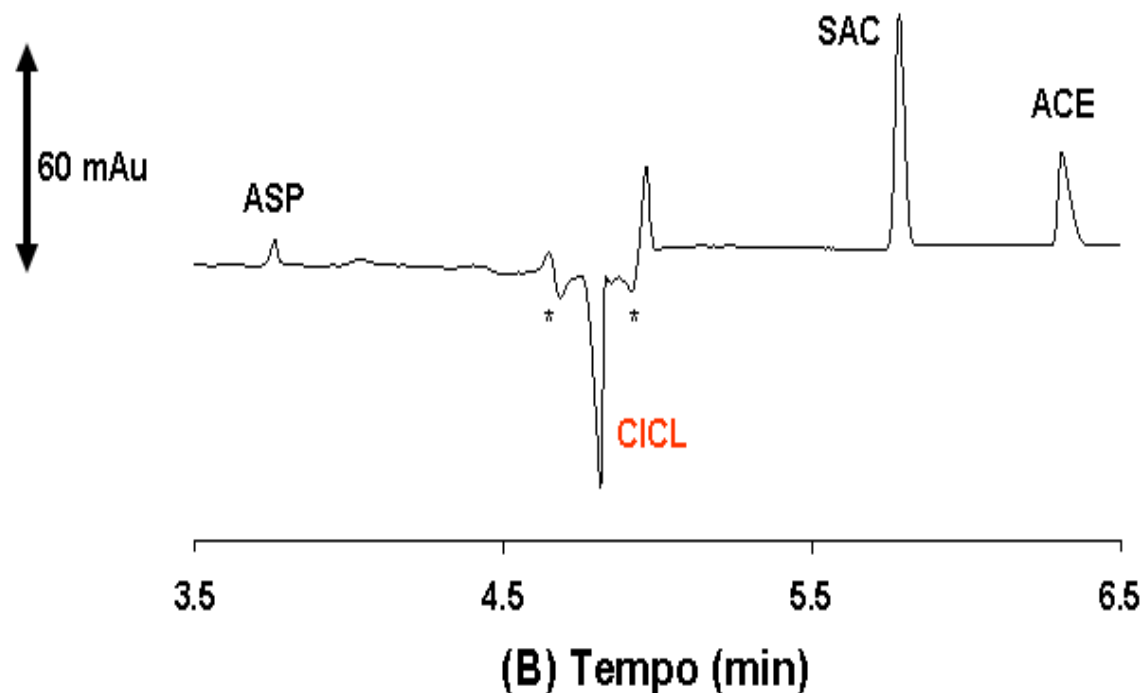
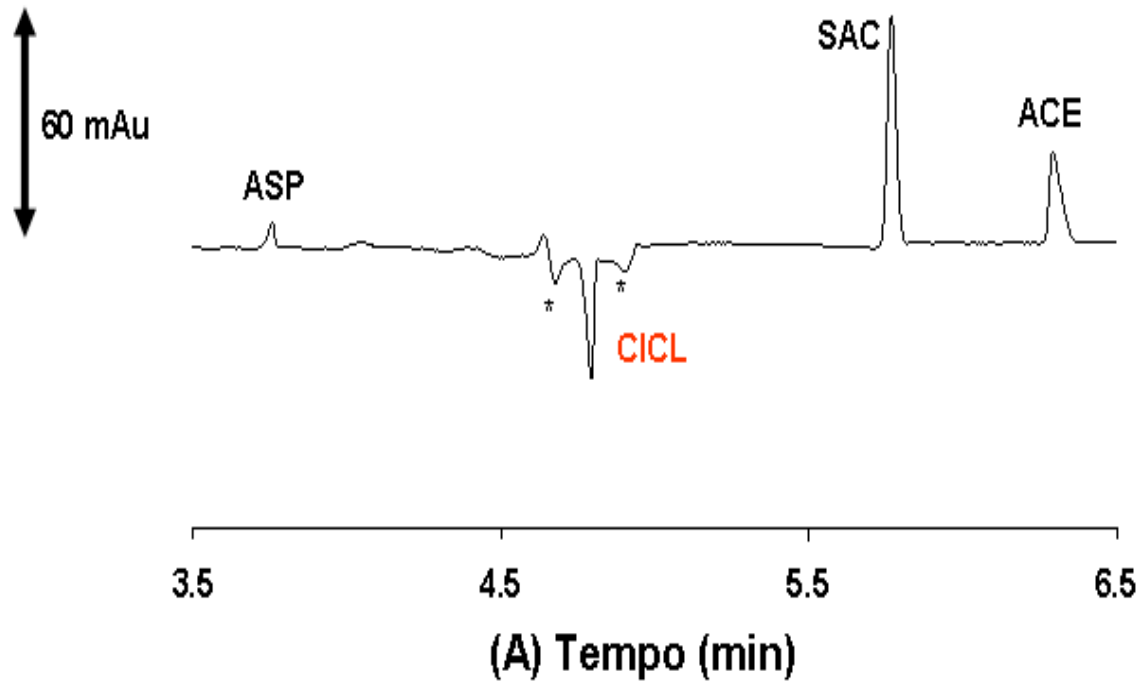


Gráfico 7- Eletroferogramas de separação para mistura de padrões contendo: ASP, CICL, SAC e ACE. A- 100,0 mg L⁻¹ cada e B- todos a 100,0 mg L⁻¹, exceto CICL a 200,0 mg L⁻¹. Composição do eletrólito: 25,0 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio e 10,0 mmol L⁻¹ tampão Tris-DNB (pH 9,15). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho 30 °C, detecção a 215 nm e capilar (50µm) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo). (* Picos do sistema).

Fonte- O autor (2010).

A identificação dos picos do aspartame, sacarina e acesulfame-K foram feitos pela análise dos espectros dos picos.

Na tentativa de reduzir os picos de sistema gerados pela introdução do DNB, decidiu-se testar a substituição deste por ácido benzóico, já utilizado com sucesso para determinação indireta de ciclamato por CE (THOMPSON, 1995), resultando no eletrólito 25,0 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio e 10,0 mmol L⁻¹ Tris-ABen. O resultado pode ser observado no Gráfico 8. A eliminação dos picos de sistema não foi conseguida. No entanto, pode-se observar deslocamento do pico do ciclamato, se antecipando aos picos negativos de sistema, constituindo um vantagem, uma vez que isola o sinal do analito de interesse, favorecendo a interpretação de dados, evitando co-eluição dos picos.

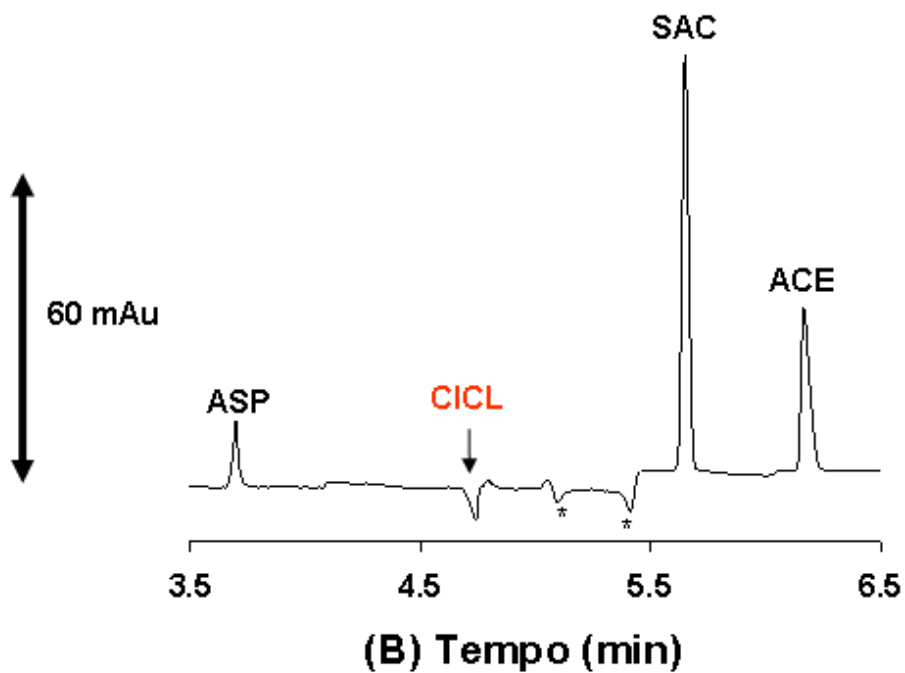
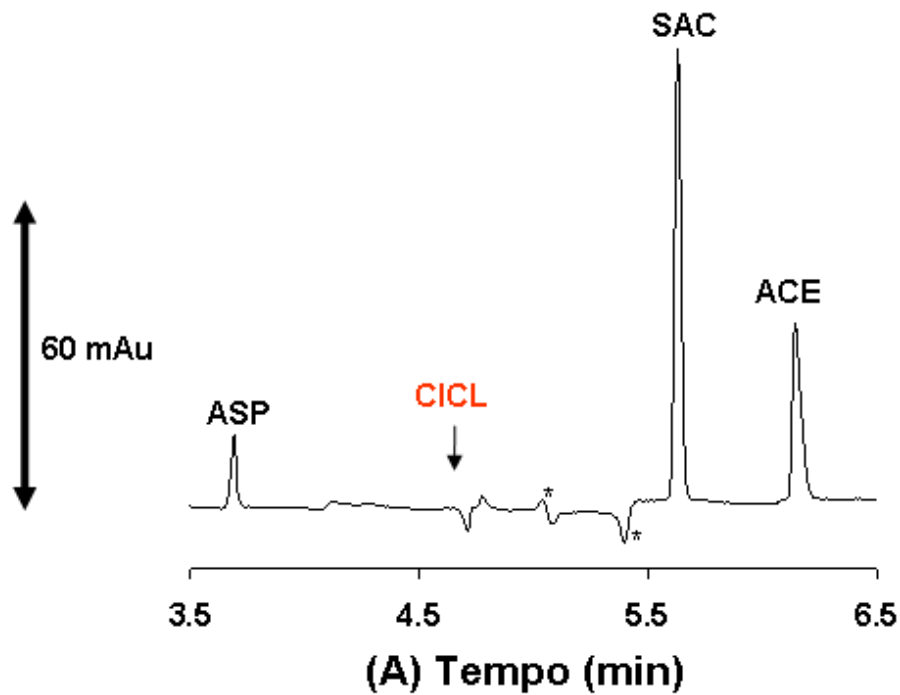


Gráfico 8- Eletroferogramas de separação para mistura de padrões contendo: ASP, CICL, SAC, e ACE. A- 100,0 mg L⁻¹ cada e B- todos a 100,0 mg L⁻¹, exceto CICL a 200,0 mg L⁻¹. Composição do eletrólito: 25 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio e 10 mmol L⁻¹ tampão Tris-ABen (pH 9,15). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho 30 °C, detecção a 215 nm e capilar (50µm) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo). (* Picos do sistema).

Fonte- O autor (2010).

5.2 OTIMIZAÇÃO DO ELETRÓLITO

De acordo com os estudos preliminares, o eletrólito constituído por 25,0 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato e 10,0 mmol L⁻¹ de tampão Tris-ABen, em pH próximo de 9,15 foi o que apresentou melhor resultado. No entanto, variações destas concentrações ainda não tinham sido avaliadas. Considerando que a concentração dos tampões do eletrólito são relevantes para o sistema de separação, e buscando verificar se tais concentrações eram as mais adequadas foi proposto um planejamento de experimentos.

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística que vem sendo muito utilizada em estudos e pesquisas envolvendo otimização de sistemas complexos contendo duas ou mais variáveis e que se deseja saber sobre a presença ou não de efeitos interativos (sinergia), que eventualmente possam levar a resultados que não seriam possíveis conseguir por métodos univariados (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

Os valores das concentrações do tampão tetraborato e do tampão Tris-ABen foram fixados conforme descrito na Tabela 6. A representação (-1) correspondeu aos valores do nível inferior, a representação (+1) correspondeu aos valores do nível superior e o (0) aos valores do ponto central, que são aqueles utilizados até então. Montou-se um fatorial 3², ou seja, três níveis (inferior, central e superior) e dois fatores (concentração de tetraborato e Tris-ABen), com triplicata no ponto central. A Tabela 6 mostra a matriz de contraste do planejamento fatorial 3², representando os ensaios realizados e ainda as respostas NA escolhida para avaliação do sistema. O experimento foi realizado em ordem aleatória, visando reduzir a interferência de fatores não controláveis no sistema.

Os demais parâmetros experimentais foram mantidos constantes: 30°C, 215 nm, +20 kV, injeção 4 segundos a 50 mbar. A mistura dos padrões ASP, CICL, SAC e ACE, todos a 100,0 mg L⁻¹, foi injetada.

Tabela 6- Planejamento fatorial 3^2 , fatores, níveis e resposta.

Fator	Níveis		
	(-1)	0	(+1)
1- Tetraborato	20,0 mmolL ⁻¹	25,0 mmolL L ⁻¹	30,0 mmolL L ⁻¹
2- Tris-ABen	5,0 – 2,5 mmolL L ⁻¹	10,0 – 5,0 mmo L ⁻¹	15,0 – 7,5 mmolL L ⁻¹

Experimento	Ordem de corrida	Tetraborato	Tris-ABen	R
A	8	-1	-1	0,390
B	5	-1	0	0,599
C	10	-1	1	0,670
D	4	0	-1	0,261
E	10	0	0	0,454
F	1	0	1	0,553
G	7	1	-1	0,193
H	11	1	0	0,303
I	12	1	1	0,457
J	6	0	0	0,430
L	3	0	0	0,454
M	2	0	0	0,433

Fonte- O autor (2010).

O Gráfico 9 apresenta os eletroferogramas dos ensaios realizados experimentalmente, menos o ponto central.

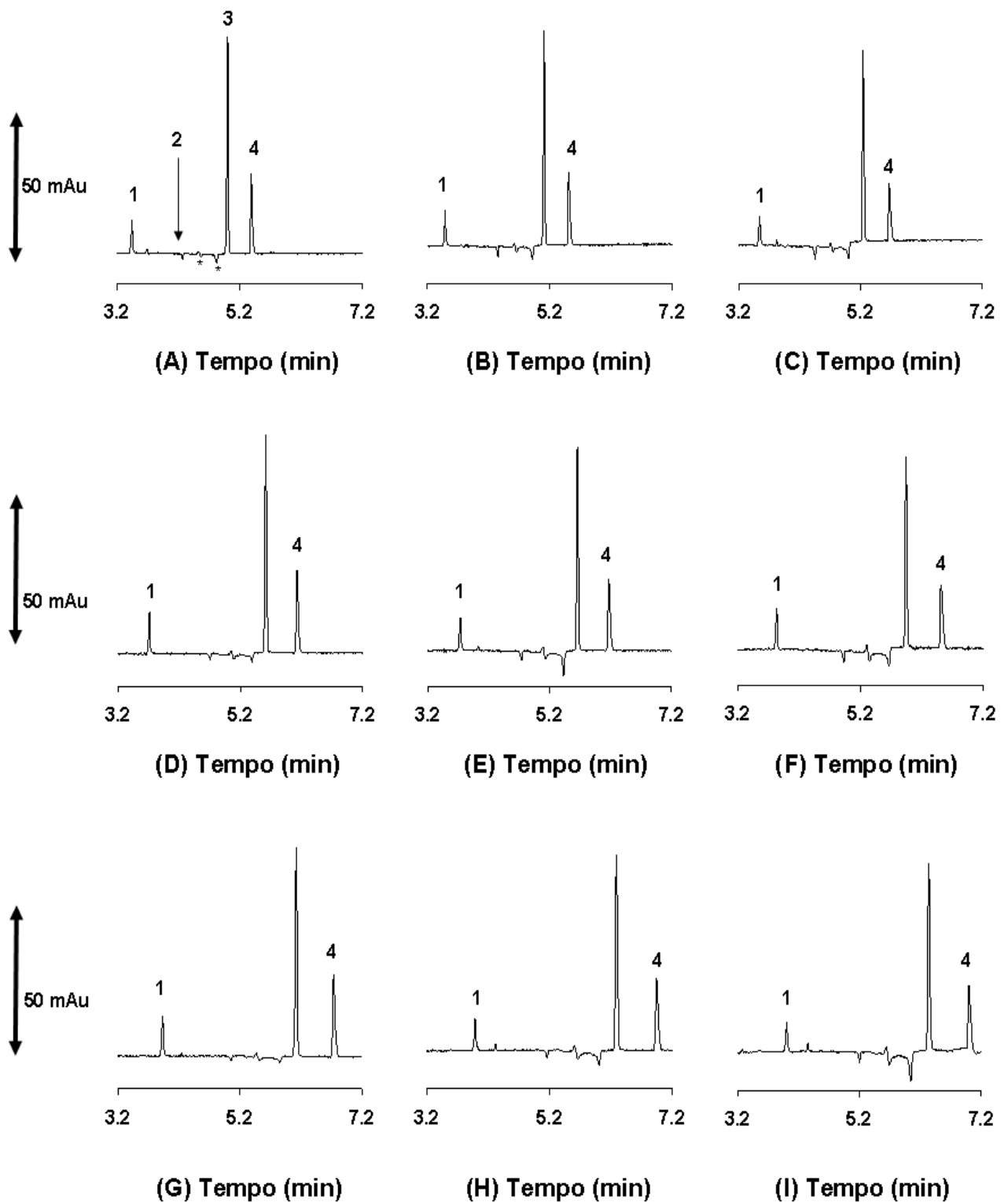


Gráfico 9- Eletroferogramas dos 9 primeiros experimentos, conforme Tabela 6. Mistura de padrões contendo: (1) ASP, (2) CACL, (3) SAC e (4) ACE, todos a $100,0 \text{ mg L}^{-1}$. Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20kV, temperatura 30°C , 215 nm e capilar ($50\mu\text{m}$) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo). (* Picos de sistema).

Fonte- O autor (2010).

Pela observação visual dos eletroferogramas conclui-se que os experimentos aparentemente apresentaram perfil de separação semelhantes. Para determinar qual experimento teria melhor qualidade de separação utilizou-se uma resposta. A resposta selecionada considerou dois aspectos importantes para o sistema: intensidade do sinal do CICL e tempo total de análise, caracterizado pela saída do acesulfame-K. A equação (7) representa a relação matemática da resposta.

$$R = \frac{H_{\text{CICL}}}{t_{\text{ACE}}} \quad (7)$$

Onde:

R = Resposta

H_{CICL} = Altura do pico do ciclamato

t_{ACE} = Tempo de migração do acesulfame-K

A partir do planejamento fatorial foi construído um modelo matemático de previsão, representado abaixo, onde x_1 representa a concentração do tampão tetraborato de sódio e x_2 a concentração do tampão Tris-ABen:

$$y = 0,4406 (\pm 0,005) - 0,1178 x_1 (\pm 0,005) + 0,1394 x_2 (\pm 0,005) + 0,0145 x_1^2 (\pm 0,008) - 0,0295 x_2^2 (\pm 0,008) - 0,0040 x_1 x_2 (\pm 0,007)$$

Como o modelo não apresentou evidência de falta de ajuste com 95% de confiança, para o intervalo de concentração testado, construiu-se uma superfície de resposta (Gráfico 10), onde o comportamento de interação tetraborato-Tris/HCl pode ser facilmente avaliado.

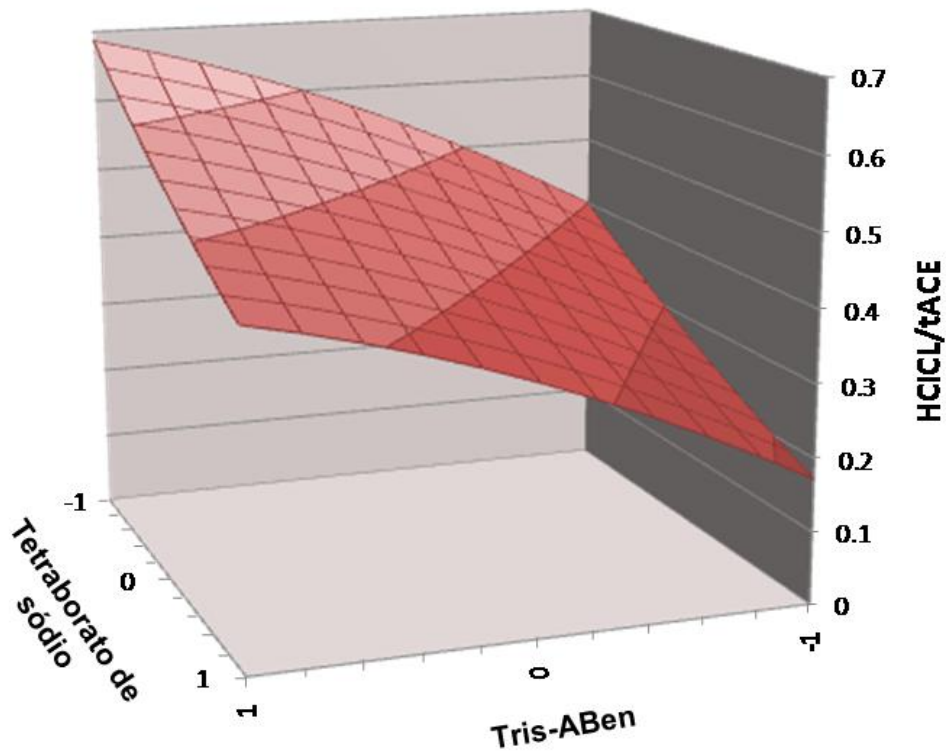


Gráfico 10- Superfície de resposta obtida pelo planejamento fatorial 3^2 .

Fonte- O autor (2010).

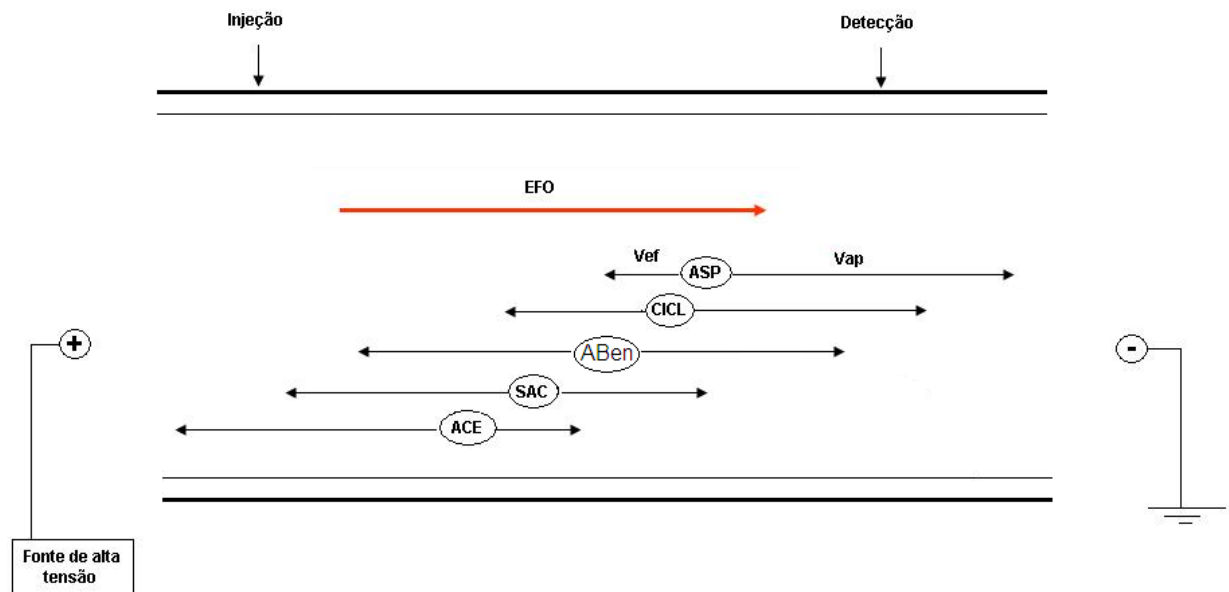
A interpretação da superfície de resposta nos leva a concluir que a melhor região de análise é obtida quando se caminha para o nível inferior da concentração do tampão Tetraborato e para o nível superior da concentração do tampão Tris-ABen.

A melhor resposta indica que a concentração mais favorável para a separação dos edulcorantes é o experimento C, $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ tampão tetraborato e $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ de tampão Tris-ABen. Sendo assim, este eletrólito passou a ser o de escolha para a determinação dos edulcorantes.

5.3 MECANISMO DE SEPARAÇÃO PROPOSTO PARA OS EDULCORANTES

Para o sistema de eletrólito proposto a separação simultânea dos edulcorantes aspartame, ciclamato, sacarina e acesulfame-K ocorre em contra fluxo, ou seja, velocidade do fluxo eletrosmótico e eletroforética na mesma direção, porém em sentidos contrários, uma vez que todos se comportam como ânions. A

ordem de eluição dos edulcorantes obedece ao mecanismo de CZE. Logo, estruturas com maior relação carga/massa eluem primeiro, pois apresentam vetor de velocidade aparente V_{ap} (diferença entre velocidade eletroforética e a velocidade do EOF) maior em direção a detecção. No Esquema 7 apresenta esquema ilustrativo para o mecanismo de separação.

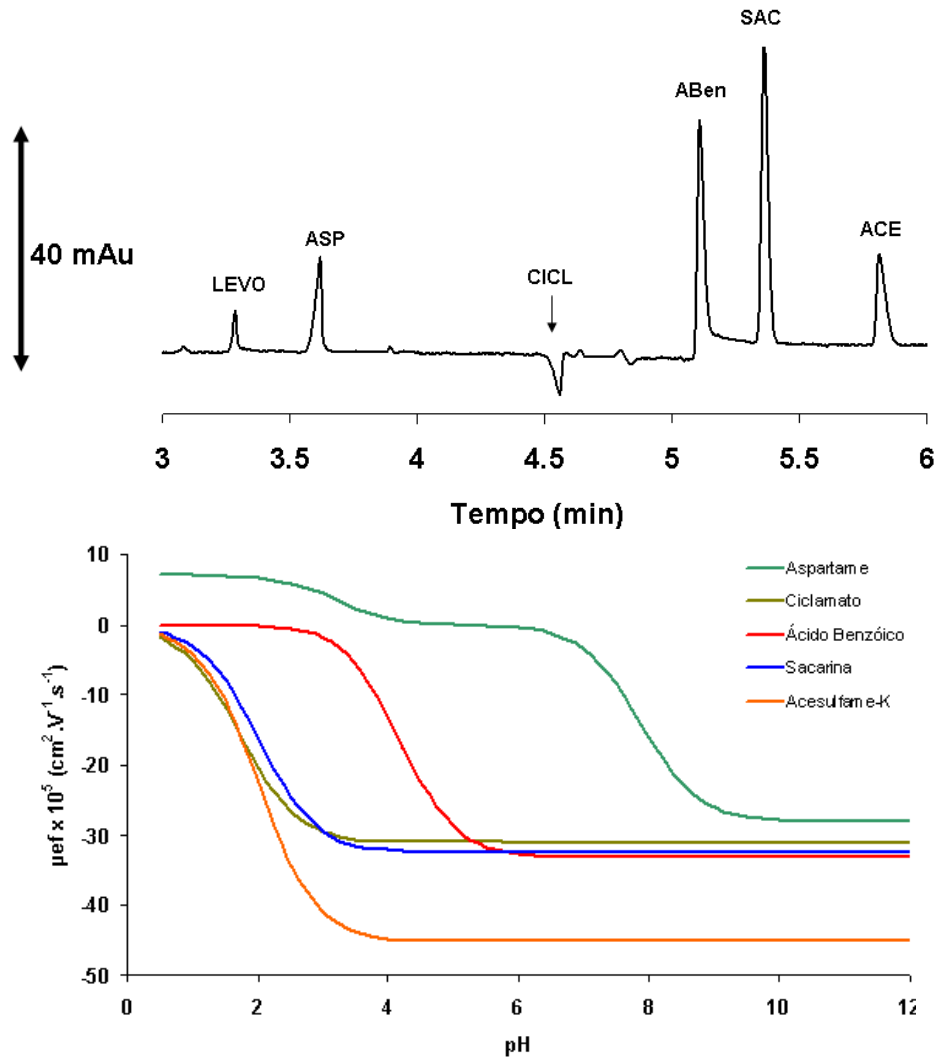


Esquema 7- Esquema do mecanismo de separação de edulcorantes por CZE.

Fonte- O autor (2010).

A ordem de separação esquematizada traduz o comportamento observado ao se promover um separação dos edulcorantes com a metodologia proposta.

Comparando-se a curva de mobilidade eletroforética com um eletroferograma (Esquema 8) podemos observar que a seqüência de eluição dos edulcorantes é coerente com o previsto, exceto pela inversão que ocorre entre a sacarina e o ácido benzóico. Uma possível explicação para este comportamento seria a formação de dímeros de ácido benzóico. A formação de dímeros cíclicos com ligação de hidrogênio do ácido benzóico é descrita por Ito, Tsukioka e Imanishi (1960). Outros estudos reportam a formação de dímeros em etanol e água (TOMIOKA et al., 1984). Esta alteração da estrutura promoveria um aumento do raio do conservante, acelerando sua velocidade aparente, proporcionando sua saída precoce.



Esquema 8- Comparação da curva de mobilidade eletroforética com um eletroferograma.

Fonte- O autor (2010).

5.4 ANÁLISE DA AMOSTRA

Considerando-se que a nova metodologia se propõe a determinar simultaneamente aspartame, ciclamato, sacarina e acesulfame-K a amostra foi selecionada levando em consideração a presença dos quatro analitos. Logo, um preparado sólido para bebida de chá, sabor limão, foi comprada em um supermercado local. A relativa complexidade da amostra se dá devido em sua composição conter maltodextrina, extrato de chá, polpa de limão desidratada (1%), acidulante ácido cítrico, regulador de acidez citrato de sódio, antiemectante fosfato tricálcico, e corante caramelo, além dos edulcorantes de estudo. Por conter

espessante e polpa a amostra precisou ser filtrada, a fim de reduzir os insolúveis presentes.

O Gráfico 11 mostra um eletroferograma da amostra filtrada. Os espectros relativos aos analitos identificados estão representados. Pela análise dos espectros, pode-se inferir que o interferente separado sinaliza como sendo ácido benzóico. No entanto, o fabricante não declara em seu rótulo este aditivo.

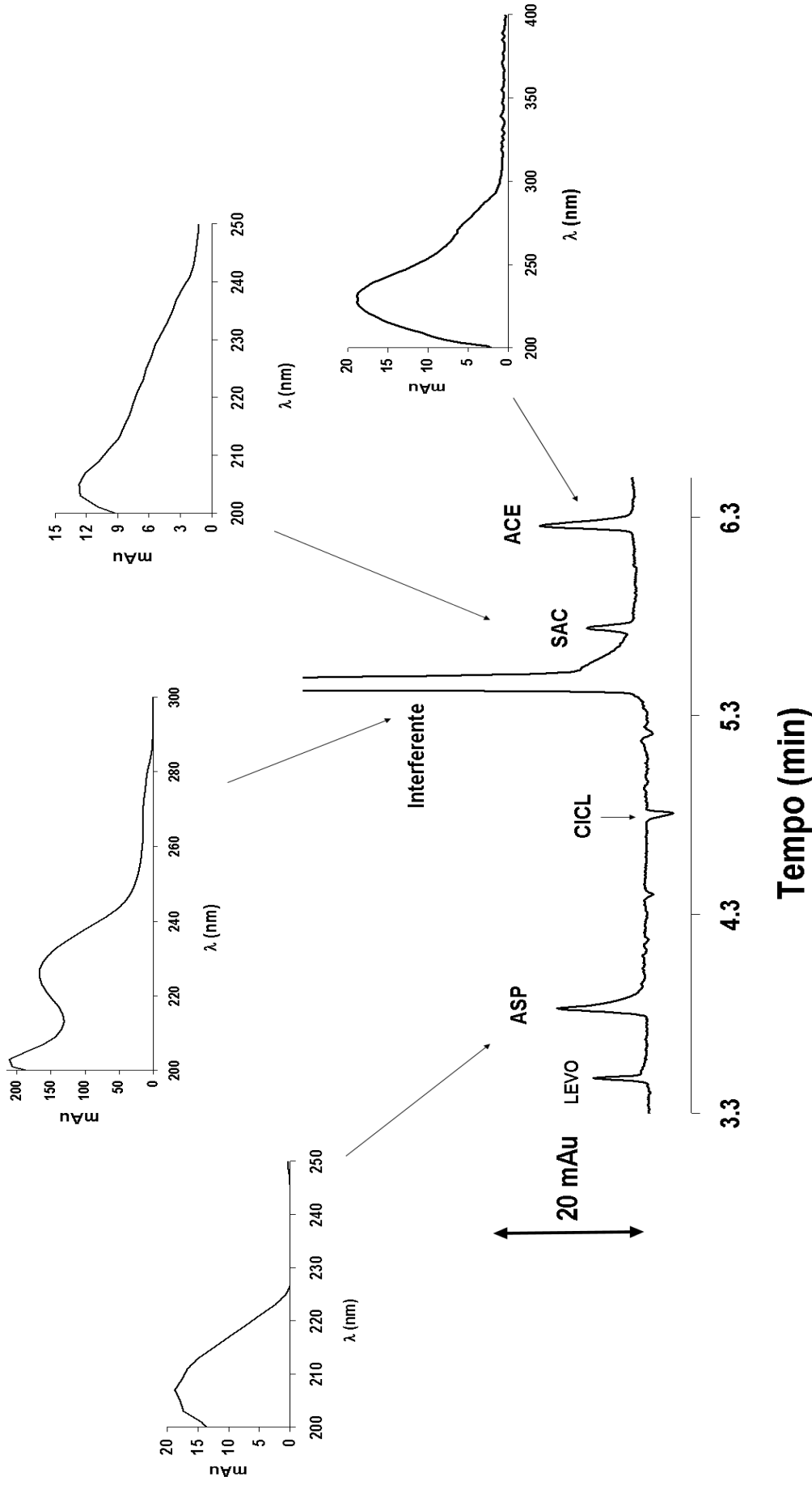


Gráfico 11- Eletroferograma de preparado sólido para bebida de chá. Composição do eletrólito: 20,0 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio e 15,0 mmol L⁻¹ tampão Tris-ABen (pH 9,15). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho 30°C, detecção a 215 nm e capilar (50µm) de 48,5 cm de comprimento efetivo).

Fonte-O autor (2010).

5.5 FIGURAS DE MÉRITO

Finalizada a otimização do eletrólito, iniciou-se a avaliação da linearidade do método. As curvas analíticas foram construídas considerando-se a faixa de concentração encontrada em vários tipos de alimentos disponíveis para o consumidor, sendo por isso diferente entre os analitos em estudo. A Tabela 7 mostra os intervalos de concentração de construção da curva. Cada intervalo foi regularmente dividido em 6 níveis de concentração. A avaliação das figuras de mérito foi realizada tomando como referência Ribani e outros (2004).

Tabela 7- Faixa de concentração para estudo de linearidade.

Analito	Intervalo de concentração analisado
Aspartame	50,0 – 300,0 mg L ⁻¹
Ciclamato	50,0 – 300,0 mg L ⁻¹
Sacarina	10,0 – 110,0 mg L ⁻¹
Acesulfame-K	10,0 – 110,0 mg L ⁻¹

Fonte- O autor (2010).

A linearidade foi avaliada levando-se em conta o coeficiente de regressão (R^2) da curva analítica de cada edulcorante. Outra forma de se verificar a linearidade é pelo cálculo da existência ou não de ajuste do modelo. Só faz sentido utilizar o modelo se ele se mostrar capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento dos valores experimentais. A validade do modelo e a significância estatística da curva ajustada podem ser testadas por meio da Análise de Variância. Se o modelo estiver bem ajustado, a média quadrática devida à falta de ajuste reflete apenas os erros aleatórios, portanto deve ser aplicado o teste F que relaciona as variâncias dos resíduos e das medidas encontradas. Os cálculos foram realizados conforme mostra a Tabela 8:

Tabela 8- Tabela de análise da variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear nos parâmetros.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$

N_i = número de repetições no nível i ; m = número de níveis distintos da variável independente; $n = \sum n_i$ = número total de observações; p = número de parâmetros do modelo; \hat{y}_i = sinal previsto; \bar{y} = média do sinal encontrado; y_{ij} = sinal observado; \bar{y}_i = média no nível; g.l. = v = graus de liberdade.

Fonte- Neto; Scarminio; Bruns (2007).

FALTA DE AJUSTE

$$\frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} = F_{calc} \quad F_{calc} < F_{v_{faj}, v_{ep}} \quad (8)$$

SIGNIFICÂNCIA DA REGRESSÃO

$$\frac{MQ_R}{MQ_r} = F_{calc} \quad F_{calc} > F_{v_R, v_r} \quad (9)$$

Para verificar se o modelo apresenta falta de ajuste, compara-se a razão da média quadrática da falta de ajuste pela média quadrática do erro puro (F_{calc}) com o $F_{crítico} = F_{v_{faj}, v_{ep}}$ (equação 8). Se F_{calc} for menor que $F_{crítico}$, há evidência de não haver falta de ajuste no modelo, considerando-se a significância aplicada e o intervalo de concentração trabalhado. Em seguida, verifica-se a significância da regressão,

calculando-se a razão da média quadrática da regressão pela média quadrática do resíduo (F_{calc}) e comparando-se com o $F_{\text{crítico}} = F_{vR, vR}$ (equação 9). Se F_{cal} for maior que $F_{\text{crítico}}$ (preferencialmente, mais de 10 vezes maior) há evidência de haver significância na regressão do modelo, considerando-se a significância aplicada e o intervalo de concentração trabalhado. A significância só pode ser considerada se não houver evidência de falta de ajuste do modelo.

Como pode ser observado na Tabela 9, os modelos apresentam um coeficiente de regressão maior que 0,90 e pelos valores calculados para análise de variância é possível afirmar que as curvas analíticas possuem falta de ajuste, e, portanto o modelo apresentado não representa bem à reta, exceto para o ciclamato.

Tabela 9- Valores calculados para análise de variância e R^2 .

Analito	Teste de falta de ajuste		Teste da significância da regressão		R^2
	$F_{0,05;4;24}$	$F_{\text{calculado}}$	$F_{0,05;1;28}$	$F_{\text{calculado}}$	
ASP	2,78	12,26	2,89	3872	0,9970
CICL	2,78	2,61	2,89	3660	0,9924
SAC	2,78	954,20	2,89	816	0,9668
ACE	2,78	316,69	2,89	773	0,9651

Fonte- O autor (2010).

Considerando-se que os resultados encontrados foram insatisfatórios, optou-se por buscar um padrão interno (PI) para a metodologia proposta, visando solucionar o problema de falta de ajuste do modelo.

5.5.1 Seleção do padrão interno e verificação do ajuste do modelo

Foram inicialmente testados o ácido 3,5-dinitrobenzóico (DNB), nitrato de sódio (NaNO_3), ácido ftálico (AF) e ácido salicílico (AS), todos a 100 mg L^{-1} . Os eletroferogramas obtidos podem ser observados no Gráfico 12.

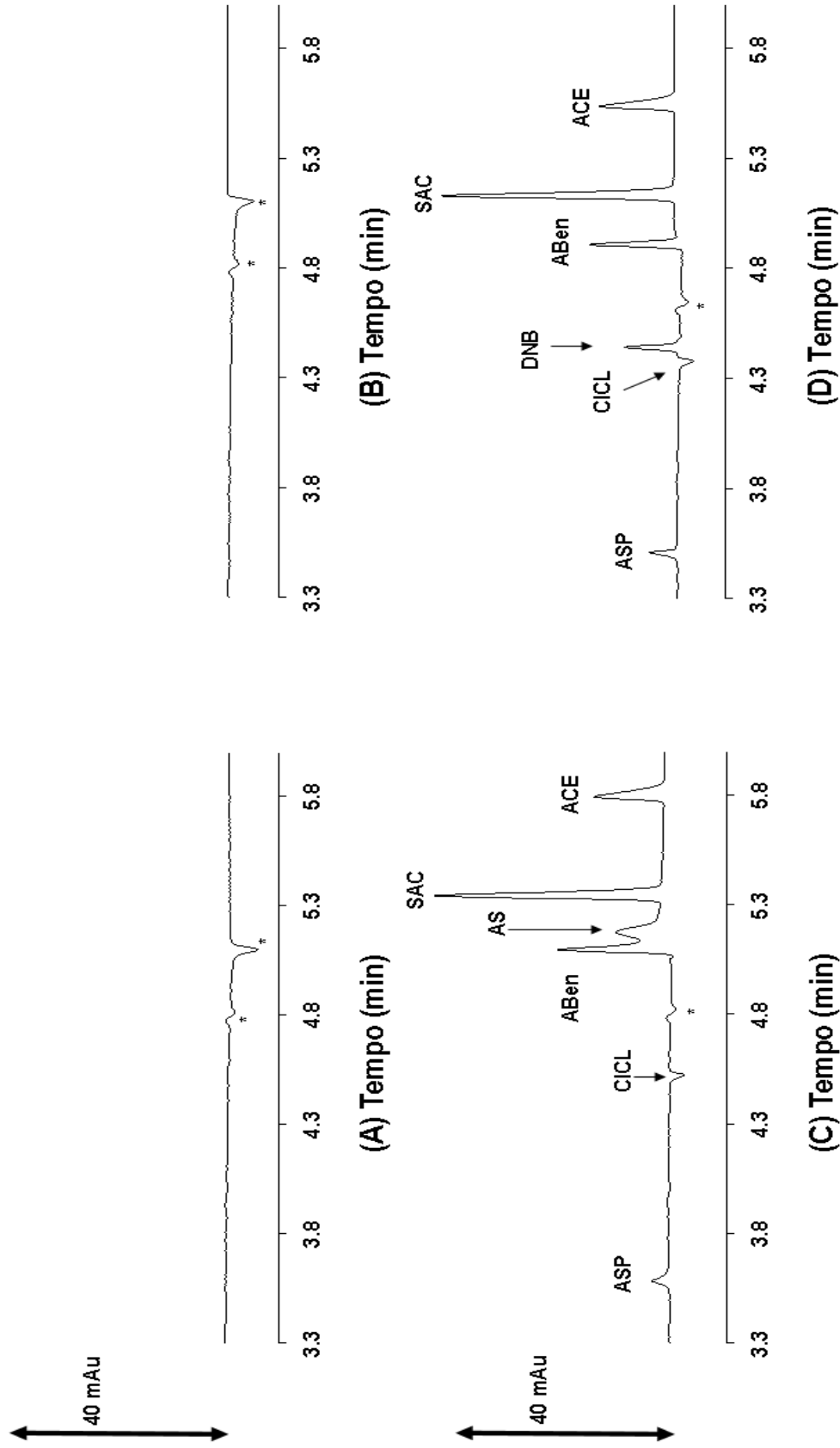


Gráfico 12- Eletroferogramas de seleção de PI. A- 100,0 mg L⁻¹ de NaNO₃; B- 100,0 mg L⁻¹ de AF; C- Separação de mistura de padrões contendo: ASP, CICL, SAC, ACE e AS, todos a 100,0 mg L⁻¹ e ABen a 50,0 mg L⁻¹ D- Separação de mistura de padrões contendo: ASP, CICL, SAC, ACE e DNB, todos a 100,0 mg L⁻¹ e ABen a 50,0 mg L⁻¹. Composição do eletrólito: 20,0 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio e 15,0 mmol L⁻¹ tampão Tris-ABen (pH 9,15). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho 30 °C, detecção a 215 nm e capilar (50µm) de 48,5 cm 40,0 cm de comprimento efetivo). (*=Pico de sistema).

Fonte- O autor (2010).

Como se pode observar, os eletroferogramas contendo NaNO_3 e AF não apresentaram qualquer sinal relativo a estes compostos. O DNB apresentou bom sinal, no entanto, sua saída foi muito próxima ao CICL. O cálculo da resolução, conforme equação (2), para este par de picos adjacentes foi 1,08, menor que 1,5 recomendado como mínimo, sendo indicativo de baixa eficiência de separação, havendo sido, portanto desprezado seu uso. O ácido salicílico, citado como PI por Cantarelli e outros (2008), apresentou co-eluição com o ácido benzóico, que apesar de não ser analito de interesse, faz parte da formulação de vários alimentos.

Foram testadas duas fluoroquinolonas, gatifloxacina (GATI) e levofloxacina (LEVO), que já tiveram bom histórico de separação em eletrólito semelhante (FARIA et al., 2006).

Conforme o Gráfico 13, tanto a GATI quanto a LEVO apresentaram um bom sinal, não co-eluindo com os edulcorantes. Contudo, pode-se observar que a GATI tem seu pico em uma região sujeita a picos de sistema. Logo, a LEVO foi escolhida como a melhor opção para PI do sistema.

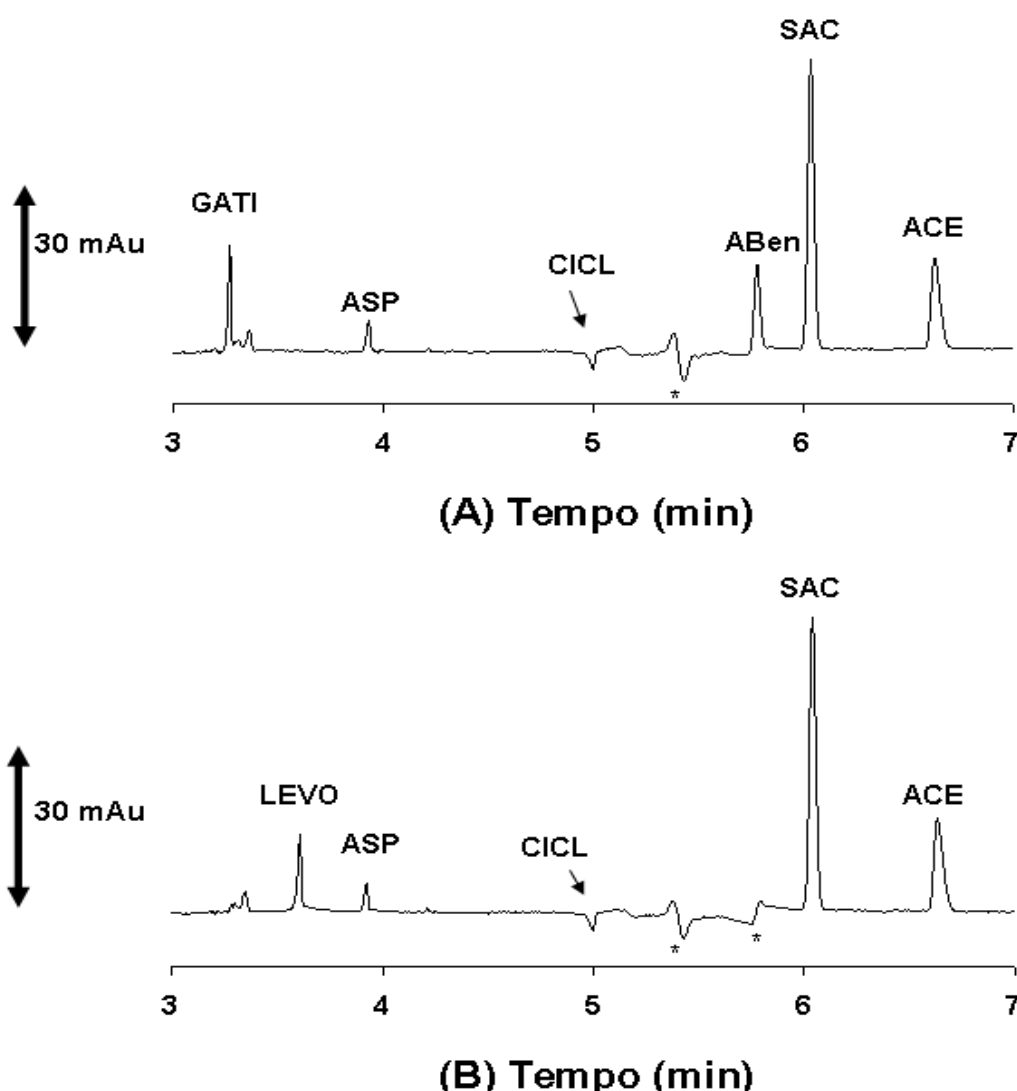


Gráfico 13- Eletroferogramas de seleção de PI. Mistura de padrões contendo: Aspartame, Ciclamato, Sacarina, Acesulfame-K, todos a 100 mg L^{-1} e ainda: A- 100 mg L^{-1} GATI e ABen a 50 mg L^{-1} ; B- 100 mg L^{-1} de LEVO. Composição do eletrólito: $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tetraborato de sódio e $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tampão Tris-ABen (pH 9,15). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20 kV, temperatura do cartucho $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, detecção a 215 nm e capilar ($50\mu\text{m}$) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo). (* = Pico de sistema).

Fonte- O autor (2010).

Um novo estudo de linearidade foi realizado utilizando o padrão interno selecionado, visando observar a existência ou não de falta de ajuste do modelo. Para tanto, foram testados os mesmos intervalos de concentração citado na Tabela 7, porém cada intervalo foi regularmente dividido em 11 níveis de concentração e foram preparados em duplicata autêntica. Foi feita a inclusão da curva de calibração do ácido benzóico, para avaliar a possibilidade de sua quantificação, uma vez que

este analito está presente em amostras de alimentos. A faixa de concentração testada para o ácido benzóico foi de 25 a 150 mg L⁻¹, também em 11 níveis de concentração. Neste novo estudo a concentração do PI foi fixado em 50 mg L⁻¹.

A Tabela 10 demonstra que não há evidência, com 95% de confiança, de falta de ajuste para os modelos, dentro do intervalo trabalhado, para os analitos, exceto ácido benzóico. Isso indica que o padrão interno foi útil para correções de variações introduzidas nas corridas. Apenas uma avaliação qualitativa poderá ser feita para o ácido benzóico na amostra, uma vez que a resposta deste analito não pode ser considerada linear dentro da faixa avaliada de concentração. No entanto, se avaliássemos o ácido benzóico com 99% de confiança, $F_{0,01;9;10} = 4,94$, poderíamos considerar não haver evidência de falta de ajuste.

Tabela 10- Valores calculados para análise de variância e R².

Analito	Teste de falta de ajuste		Teste da significância da regressão		R ²
	F _{0,05;9;10}	F _{calculado}	F _{0,05;1;19}	F _{calculado}	
ASP	3,02	1,57	4,38	1378,3	0,9864
CICL	3,02	1,04	4,38	885,1	0,9790
SAC	3,02	2,02	4,38	2690,7	0,9930
ACE	3,02	1,05	4,38	3089,9	0,9939
ABen	3,02	4,61	4,38	58,8	0,9121

Fonte- O autor (2010).

5.5.2. Avaliação da metodologia

Apesar da metodologia analítica não ter sido validada, algumas figuras de mérito foram avaliadas: linearidade, sensibilidade, limites de detecção, limite de quantificação e recuperação.

5.5.2.1. Teste de conformidade do sistema

Antes de realizar experimentos de validação ou mesmo análises de amostras, deve-se avaliar se o sistema utilizado para a análise é capaz de fornecer dados de

qualidade aceitável. Esta avaliação é alcançada com experimentos de conformidade do sistema (“system suitability”), que pode ser definida como um conjunto de testes para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis (RIBANI et al., 2004).

Neste trabalho, a conformidade do sistema foi obtida pela avaliação da resolução dos picos de pares adjacentes, calculado pela equação (2) e pelo desvio padrão relativo (RSD), equação (10), para repetibilidade na área e tempo de migração. A conformidade foi calculada após dez injeções consecutivas de uma mistura de padrões e padrão interno (Tabela 11). O RSD foi satisfatório para 10 repetições em área e tempo de migração; a resolução foi maior que 1,5 para todos os picos adjacentes. Sendo assim, o sistema foi considerado conforme para a avaliação das figuras de mérito.

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (10)$$

Onde:

RSD (%) = Desvio padrão relativo

s = Desvio padrão

\bar{x} = Média

Tabela 11- Repetibilidade (RSD %) e resolução obtida na conformidade do sistema.

Edulcorantes	Razão área do pico (RSD %)	Tempo de migração (RSD %)	Resolução
LEVO ¹	-		4,2 R _{1,2}
ASP ²	2,5	0,28	12 R _{2,3}
CICL ³	3,1	0,32	4,5 R _{3,4}
SAC ⁶	1,8	0,34	3,9 R _{5,6}
ACE ⁷	2,7	1,7	4,4 R _{6,7}

4 e 5 = pico de sistema.

Fonte- O autor (2010).

5.5.2.2 Seletividade e Linearidade

A seletividade em um método analítico é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas. (RIBANI et al., 2004)

O método de adição padrão foi utilizado para testar a seletividade, uma vez que a matriz trabalhada é complexa, não sendo possível obter a matriz isenta dos edulcorantes de interesse. Sendo assim, foi feita uma curva analítica com adição dos padrões de edulcorantes e comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz (curva de calibração externa). A semelhança entre os coeficientes angulares das curvas de calibração (retas paralelas) sugere que a matriz não interfere na determinação dos analitos, sendo considerado o método seletivo.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004), e, conforme já discutido, pode ser avaliado pelo coeficiente de correlação na e pela análise de variância.

Os resultados obtidos quanto à seletividade e linearidade foram considerados satisfatórios, e encontram-se resumidos na Tabela 12.

Tabela 12- Resultados estatísticos obtidos para avaliação da seletividade e linearidade.

Edulcorante	Coeficiente angular	Intercepto	Teste de falta de ajuste		Teste da significância da regressão		R ²
			F _{0,05;4;23}	F _{calc}	F _{0,05;1;27}	F _{calc}	
ASP ^a	0,019 ± 0,0002	-0,020 ± 0,0398	2,82	0,65	4,21	9404,9	0,9971
ASP ^b	0,018 ± 0,0710	1,869 ± 0,0004	-	-	-	-	0,9852
CICL ^a	0,006 ± 0,0001	0,052 ± 0,0303	2,82	1,73	4,21	1768,4	0,9858
CICL ^b	0,005 ± 0,0001	0,034 ± 0,0200	-	-	-	-	0,9883
SAC ^a	0,149 ± 0,0015	-0,028 ± 0,1118	2,82	0,50	4,21	8768,4	0,9969
SAC ^b	0,134 ± 0,0013	0,773 ± 0,0884	-	-	-	-	0,9965
ACE ^a	0,046 ± 0,007	-0,002 ± 0,0309	2,82	1,68	4,21	2509,3	0,9924
ACE ^b	0,043 ± 0,0007	1,826 ± 0,0439	-	-	-	-	0,9942

^a Curva de calibração externa de padrão (n=5); ^b Curva de adição de padrão (n=5)

Fonte- O autor (2010).

5.5.2.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. (RIBANI et al., 2004). É a menor concentração de analito presente na matriz que pode ser detectada, independentemente do ruído, nas condições de ensaio. Pode ser calculada através da relação sinal/ruído, conforme a equação (11).

$$LD = \frac{3S_b C_s}{H_{\max} - H_{\min}} \quad (11)$$

Onde:

S_b = Desvio padrão da linha base;

C_s = Concentração do analito;

H_{máx} = Altura máxima do pico

H_{min} = Altura da linha base

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Pode ser calculado

da mesma maneira que o limite de detecção, porém utilizando a relação 10:3 através da equação (12).

$$LQ = \frac{10S_b C_s}{H_{\max} - H_{\min}} \quad (12)$$

Onde:

S_b = Desvio padrão da linha base;

C_s = Concentração do analito;

H_{\max} = Altura máxima do pico

H_{\min} = Altura da linha base

A Tabela 13 apresenta os valores de LD e LQ obtidos para ASP, CICL, SAC e ACE no preparado sólido para bebida de chá.

Tabela 13- Valores de LD e LQ.

Edulcorante	LD (mg L ⁻¹) ^a	LQ (mg L ⁻¹) ^a
ASP	6,8	22
CICL	12	40
SAC	0,50	1,6
ACE	3,3	10

^an=5

Fonte- O autor (2010).

Comparado ao estudo de Frazier e outros (2000) que descreve LD de 10 mg L⁻¹ em amostras, podemos considerar os resultados satisfatórios, principalmente considerando que em amostras de alimentos a concentração destes analitos é bem superior aos limites estabelecidos.

5.5.2.4 Precisão

Para avaliar o grau de dispersão dos resultados entre os ensaios independentes e repetidos da mesma amostra foi utilizado o desvio padrão relativo. A repetibilidade do método foi testada através da avaliação do RSD de medidas entre corridas sucessivas, considerando-se o tempo de migração e área do pico utilizando padrão interno para padrão e amostra (Tabela 14).

Tabela 14- RSD (%) em área e tempo de migração de padrões e amostra obtidos no estudo de repetibilidade.

Edulcorante	Concentração (mg L ⁻¹)	Razão da área dos picos (RSD %)		Tempo de migração (RSD %)	
		Padrão ^a	Amostra ^b	Padrão ^a	Amostra ^b
ASP	0	-	3,3	-	0,91
	50	2,0	2,1	0,73	0,57
	100	1,6	3,8	0,72	0,64
	150	0,52	3,2	0,73	0,006
	200	1,0	2,8	0,52	0,66
	250	1,2	1,8	0,75	0,50
	300	1,8	4,2	0,74	0,67
	CICL	0	-	4,4	-
50		0,68	2,9	0,76	0,62
100		2,5	1,5	0,72	0,69
150		4,3	1,9	0,73	0,007
200		1,5	0,8	0,58	0,77
250		0,48	2,8	0,78	0,60
300		1,1	4,7	0,77	0,83
SAC		0	-	4,1	-
	10	3,1	2,5	0,89	0,72
	30	1,1	2,1	0,77	0,79
	50	2,6	4,3	0,76	0,008
	70	1,2	1,5	0,60	0,85
	90	0,65	1,5	0,84	0,68
	110	1,6	3,4	0,86	0,94
	ACE	0	-	1,3	-
10		0,98	2,4	0,96	0,76
20		4,9	-	0,80	-
30		2,1	1,7	0,78	0,84
40		1,1	-	0,62	-
50		1,0	3,2	0,87	0,009
60		3,4	-	0,47	-
70		-	1,2	-	0,90
90		-	1,8	-	0,72
110		-	4,4	-	1,02

^a n=3; ^b n=4.

Fonte- O autor (2010).

O RSD para áreas dos padrões e amostra foi menor que 5,00%, representando um valor aceitável (RIBANI et al., 2004), sendo menor que 2% para o tempo de migração. No trabalho de revisão sobre edulcorantes, proposto por Zyglar; Wasik; Namiesnik (2009), os desvios padrão relativo para ensaios, contemplando várias metodologias, para determinação de edulcorantes estão relatados variações de 0,86% a 10,9%.

5.5.2.5 Exatidão

A exatidão representa o nível de conformidade entre os resultados individuais obtidos e o valor de referência. Neste trabalho, a exatidão foi avaliada através da recuperação.

Seguindo recomendação da literatura para testes de recuperação com adição de padrão (RIBANI et al., 2004), deve-se adicionar 25, 50 e 100% da concentração esperada do analito na matriz para o cálculo da porcentagem de recuperação (Rec %). Os resultados estão descritos na Tabela 15, assim como as concentrações encontradas. Os cálculos foram realizados utilizando a equação (13).

$$\text{Rec\%} = \frac{A_{a+s} - A_a}{A_s} 100 \quad (13)$$

Onde:

Rec % = Recuperação

A_{a+s} = Área do pico com adição de padrão

A_a = Área do pico do padrão

A_s = Área do pico do analito

Tabela 15- Porcentagem de recuperação encontrada para ASP, CICL, SAC e ACE.

Concentração adicionada (mg L⁻¹)	Concentração encontrada^a (mg L⁻¹)	Recuperação (%)
ASP		
0,0	96,0 ± 5,3	-
50,0	146,2 ± 2,1	100,4
100,0	199,2 ± 2,7	103,2
150,0	246,1 ± 7,4	100,1
		101,2^b
CICL		
0,0	45,3 ± 4,6	-
50,0	95,1 ± 2,8	99,6
100,0	147,9 ± 2,4	102,6
150,0	202,1 ± 6,9	104,5
		102,2^b
SAC		
0,0	4,8 ± 0,12	-
10,0	14,0 ± 0,38	92,0
30,0	32,2 ± 0,70	91,3
50,0	51,0 ± 1,9	92,4
		91,9^b
ACE		
0,0	40,0 ± 0,51	-
30,0	68,7 ± 1,1	95,6
50,0	86,4 ± 2,5	92,8
70,0	106,4 ± 1,25	94,9
		94,4^b

^a média ± d.p. (n=3). ^b média.

Fonte- O autor (2010).

A recuperação média para os analitos foi 101,2%, 102,2%, 91,9% e 94,4% para ASP, CICL, SAC e ACE, respectivamente. Considerando-se que as

determinações foram feitas com a amostra praticamente nas condições de consumo, os resultados podem ser considerados satisfatórios.

Foi feita a comparação entre as concentrações rotuladas para os edulcorantes e as médias das concentrações encontradas aplicando-se a metodologia otimizada, aplicando-se um teste t (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007). A verificação do pressuposto da normalidade foi realizada através do teste de Shapiro-Wilk (Anexo 1). Como $W_{\text{calculado}}$ foi maior que o W_{tabelado} , aceitou-se a hipótese de distribuição normal, com 95% de significância. Após cálculo da estatística, comparando-se os valores obtidos para cada edulcorante com o valor declarado no rótulo, pode-se afirmar que não há evidências no intervalo de 95 e 99% de confiança entre os valores encontrados e o declarado para os edulcorantes analisados, conforme apresentado na Tabela 16.

Tabela 16- Comparação entre valor rotulado e valor encontrado.

Edulcorante	Valor rotulado (mg L⁻¹)	Valor encontrado^a (mg L⁻¹)	W_{cal}	t_{cal}
ASP	196	194 ± 3,32	1,310	1,05
CICL	119	143,07 ± 10,56	1,294	4,60
SAC	12	11,58 ± 0,83	1,155	1,01
ACE	84	85,40 ± 2,76	1,321	1,01

^a média (n=4) ± d.p.; $t(3;0,05) = 3,182$; $t(3;0,01) = 5,84$; $W_{(0,05)} = 0,748$.

Fonte- O autor (2010).

5.5.2.6 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberado em seus parâmetros. A robustez foi testada utilizando um planejamento de experimento, para simplificar a investigação de alterações simultâneas dos parâmetros. Quando um fator não é robusto pode-se decidir por alterar o método ou manter sob maior controle o parâmetro em questão. No presente caso, a robustez foi considerada através do uso de um planejamento fatorial 2⁴, a fim de avaliar o comportamento da resposta levando-se em consideração os seguintes fatores: voltagem, temperatura, comprimento de onda e

concentração do tampão tetraborato/Tris-ABen. Variáveis como tempo de injeção, dimensões do capilar e quantidade de amostra permaneceram constantes. A Tabela 17 mostra a matriz de planejamento com os níveis experimentais e a resposta (altura do pico do ciclamato pelo tempo de saída do acesulfame-K) avaliada.

Tabela 17- Planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central para avaliação da robustez.

Experimento	Ordem de corrida					Resposta
		A	B	C	D	
1	16	-	-	-	-	0,4966
2	17	+	-	-	-	0,6660
3	19	-	+	-	-	0,5507
4	3	+	+	-	-	0,7289
5	12	-	-	+	-	0,4968
6	18	+	-	+	-	0,6828
7	8	-	+	+	-	0,5559
8	15	+	+	+	-	0,7369
9	10	-	-	-	+	0,3837
10	11	+	-	-	+	0,5559
11	13	-	+	-	+	0,4643
12	1	+	+	-	+	0,6323
13	9	-	-	+	+	0,4464
14	4	+	-	+	+	0,5962
15	2	-	+	+	+	0,4982
16	14	+	+	+	+	0,6735
17	5	0	0	0	0	0,5493
18	6	0	0	0	0	0,5449
19	7	0	0	0	0	0,5105
Média						0,5668
Desvio padrão						0,0979
RSD (%)						19,1796

A- Voltgem (kV): (-) 18; (0) 20; (+) 22

B- Temperatura (°C): (-) 28; (0) 30; (+) 32

C- Comprimento de onda (nm): (-) 213; (0) 215; (+) 217

D- Concentração Tetraborato de sódio/ Tris-Ácido benzóico (mmol L⁻¹/ mmol L⁻¹): (-)18/13; (0) 20/15; (+) 22/17

Fonte- O autor (2010).

O RSD foi de aproximadamente 19%, o quê poderia ser considerado uma variação alta para o experimento. Devemos verificar que o intervalo de variação dos

fatores foi bem grande ($\pm 2000 \text{ V}$, $\pm 2^\circ\text{C}$; $\pm 2 \text{ nm}$; $\pm 2 \text{ mmol L}^{-1}$), extrapolando pequenas variações que ao acaso poderiam ocorrer no equipamento ou em preparações de um analista bem treinado. Sendo assim, pode-se inferir que o sistema comportou-se robustamente.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS

Levando-se em conta o que foi exposto, acredita-se na exploração do método para determinação de aspartame, ciclamato, sacarina e acesulfame-K como análise de rotina para controle de qualidade de produção ou fiscalização em matriz de preparado sólido para chá, havendo potencial de aplicação em bebidas carbonatadas, suco, sobremesas, entre outras.

Uma próxima etapa seria a análise de outras matrizes, como balas e sobremesas para expandir a aplicabilidade do método, mediante adequada validação, e melhorar o pré-tratamento das amostras.

Um próximo trabalho seria aprimorar a metodologia de tal forma a se obter em uma única corrida, além dos edulcorantes já conseguidos, também a sucralose, edulcorante em expansão no mercado alimentício por suas vantagens quanto a sabor e manipulação industrial, além de produtos de degradação do aspartame.

REFERÊNCIAS

ADOÇANTES de mesa e Adoçante dietéticos. **Portal do consumidor**. Paraná, 17 set. 2006. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/adocantes.asp>> Acesso em: 29 jun. 2009.

ARMENTA, Sergio; GARRIGUES, Salvador; LA GUARDIA, Miguel de. FTIR Determination of Aspartame and Acesulfame-K in Tabletop Sweeteners. **J. Agric. Food Chemistry**, v. 52, n.26, p. 7798–7803, Dec. 2004.

BAKER, Dale R. **Capillary Electrophoresis – Techniques in Analytical Chemistry**. Nova Iorque: Wiley Interscience Publication, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 16 jan. 1998. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=97&word=>>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 30 mar. 1998. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=17213&word=>>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 38, de 13 de janeiro de 1998. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 15 jan. 1998. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=80>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 28 out. 1997. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=880>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RDC nº. 18, de 24 de março de 2008. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 25 mar. 2008. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=30216&word=>>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

BOYCE, Mary C. Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and

sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.847, p. 369–375, 1999.

CÂNDIDO, Lys Mary Bileski; CAMPOS, Adriane Mulinari. **Alimentos para Fins Especiais: Dietéticos**. São Paulo: Varela, 1996.

CANTARELLI, Miguel A. et al. Simultaneous determination of saccharin and aspartame in commercial noncaloric sweeteners using the PLS-2 multivariate calibration method and validation by capillary electrophoresis. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 56, p. 9345–9349, 2008.

CARLONI FILHO, João et al. Potentiometric determination of saccharin in commercial artificial sweeteners using a silver electrode. **Food Chemistry**, v. 83, p. 297–301, 2003.

CASTRO, Adriana G.P.; FRANCO, Laércio J. Caracterização do consumo de adoçantes alternativos e produtos dietéticos por indivíduos diabéticos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**, v. 46, n. 3, p. 280-287, 2002.

CHEN, Qinq-Chuan; WANG, Jing. Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 937, p. 57–64, 2001.

CHEN, Qinq-Chuan et al. Separation and determination of four artificial sweeteners and citric acid by high-performance anion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 771, p. 135-143, 1997.

CHOI, Martin M.F.; HSU, Mei Ying; WONG, Siu Lanl. Determination of cyclamate in low-calorie foods by high-performance liquid chromatography with indirect visible photometry. **Analyst**, v. 125, p. 217–220, 2000.

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

DINCKAYA, E; CAGIN, M.; TELEFONCU A. Enzymatic method for the spectrophotometric determination of aspartame. **Food Chemistry**, v. 50, p. 95-97, 1994.

ELMOSALLAMY, Mohamed. A. F. et al. Potentiometric membrane sensor for Determination of saccharin. **Microchim Acta**, v.151, p. 109–113, 2005.

FARIA, A.F. et al. Simultaneous separation of five fluoroquinolone antibiotics by capillary zone electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 579, p. 185-192, 2006.

FATIBELLO-FILHO, Orlando et al. Adoçantes artificiais. **Química Nova**, v. 19(3), p. 248-260, 1996.

FRAZIER, Richard A. et al. Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks. **Journal of Chromatography A**, v. 876, p. 213–220, 2000.

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

HARA, Celso Minoru; HORITA, Adriana Cristina; ESCANHUELA, Maria Fernanda. **A influência do marketing no consumo de light e diet**. São Paulo: Alínea, 2003.

HERRMANNOVÁ, Michaela et al. Direct simultaneous determination of eight sweeteners in foods by capillary isotachopheresis. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1132-1137, 2006.

HORIE, Masao et al. Rapid determination of cyclamate in foods by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 423–428, 2007.

HUANG, Ziqiang et al. Determination of cyclamate in foods by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, p. 233–237, 2006.

ITO, Mitsuo; TSUKIOKA, Hideo; IMANISH, Sunao. Effect of Temperature on Ultraviolet Absorption Spectra of Benzoic Acids and its Relation to Hydrogen Bonding. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 82, p. 1559-1564, 1960.

KOYAMA, M. et al. Analysis of nine kinds of sweeteners in foods by LC/MS. **Journal of Food Hygienic Society of Japan**, v. 46(3), p. 72-78, June. 2005.

KROGER, M. et al. Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: A review of the safety issues. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 35-47, 2006.

LLAMAS, Natalia E. et al. Automated turbidimetric determination of cyclamate in low calorie soft drinks and sweeteners without pre-treatment. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, p. 301-304, 2005.

NETO, Benício de Barros; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como fazer experimentos**. Campinas: Unicamp Ed, 2007.

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

NOBREGA, J.D. et al. Flow injection spectrophotometric determination of aspartame in dietary products. **Analyst**, v. 119, p. 2101-2104, Sept. 1994.

ODACI, Dilek; TIMUR, Suna; TELEFONCU, Azmi. Carboxyl esterase-alcohol oxidase based biosensor for the aspartame determination. **Food Chemistry**, v. 84, p. 493–496, 2004.

PEÑA, Rosa M.; LIMA, José L.F.C.; SARAIVA, Maria Lucia M.F.S. Sequential injection analysis-based flow system for the enzymatic determination of aspartame. **Analytica Chimica Acta**, v. 514, p. 37–43, 2004.

PEREIRA, Airton Vicente; MARCOLINO-JUNIOR, Luiz Humberto; FATIBELLO-FILHO, Orlando. Determinação espectrofotométrica de aspartame em adoçantes por injeção em fluxo usando um reator em fase sólida contendo fosfato de zinco imobilizado. **Química Nova**, v. 23, n.2, p. 167-172, 2000.

PEREIRA, Conceição Angelina dos Santos et al. **Alimentos Diet e Light – Informação Nutricional**. Viçosa: UFV, 2003.

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

PESQUISA do Idec constata: adoçantes e bebidas light desrespeitam o Código de Defesa do Consumidor. **IDEC em ação**. 26 jun. 2006. Disponível em: <<http://www.idec.org.br/emacao.asp?id=1153>>. Acesso em: 29 jun. 2009.

RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, 771-780, 2004.

RENWICK, A.G.; WILLIAMS, R.T.. **Biochem. J.**, v. 129. p. 869-879, 1972.

ROCHA, Fábio R.P. et al. A clean method for flow injection spectrophotometric determination of cyclamate in table sweeteners. **Analytica Chimica Acta**, v. 547, p. 204-208, 2005.

SKWIEREZYNSKI, Raimond D.; CONNORS, Kenneth A. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n.8, p. 1174-1180, 1993.

TAVARES, Marina F.M. Eletroforese capilar: Conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, p. 173-181, 1996.

_____. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, p. 493-511, 1997.

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

_____. Determination of cyclamate in low joule foods by capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 704, p. 203-210, 1995.

TOMIOKA, Yasushi. et al. Electronic Spectra of Benzoic Acid in a Supersonic Free Jet. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 88, p. 2263-2270, 1984.

TSANG, W.S. et al. Determination of aspartame and its breakdown products in soft drinks by reverse-phase chromatography with UV detection. **J. Agricultural Food Chemistry**, v. 33, p. 734-738, 1985.

VALENCIA, M.C. et al. Resolution of an intense sweetener mixture by use of a flow injection sensor with on-line solid-phase extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385(2), p. 385-391, May. 2006.

VILLARTA, Rhodora L.; SULEIMAN, Ahmad A.; GUILBAULT, George G. Amperometric enzyme electrode for determination of aspartame in diet food. **Microchemical Journal**, v. 48, p. 60-64, 1993.

WALKER, J.C. et al. Analysis of beverages by capillary electrophoresis. **Journal Chromatography A**, v. 781, p. 481-485, 1997.

WALTERS, Eric. **All about sweeteners: Taste receptors where?!**. Disponível em: <<http://www.sweetenerbook.com/index.html>>. Acesso em: 11 Apr. 10.

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

YANG, Da Jin; CHEN, Bo. Simultaneous Determination of Nonnutritive Sweeteners in Foods by HPLC/ESI-MS. **J. Agric. Food Chem**, v. 57, p.3022–3027, 2009.

ZHU, Yan et al. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, p. 143–146, 2005.

ZYGLER, Agata; WASIK, Andrzej; JACEK, Namiesnik. **Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs**. Trends in Analytical Chemistry, v. 28, p. 1082-1102, 2009.

APÊNDICE A – Eletroferograma de outras amostras

Buscando demonstrar o potencial do método, serão demonstrados dois eletroferogramas de amostras de refrigerante a base de cola, composto por aspartame, ciclamato e acesulfame-K, e a base de guaraná, composto por aspartame, ciclamato e sacarina. Em todos foi feita a adição de padrão, LEVO – $50,0 \text{ mg L}^{-1}$. O pré-tratamento das amostras consistiu em banho de ultra-som por 15 minutos, e então foram injetadas.

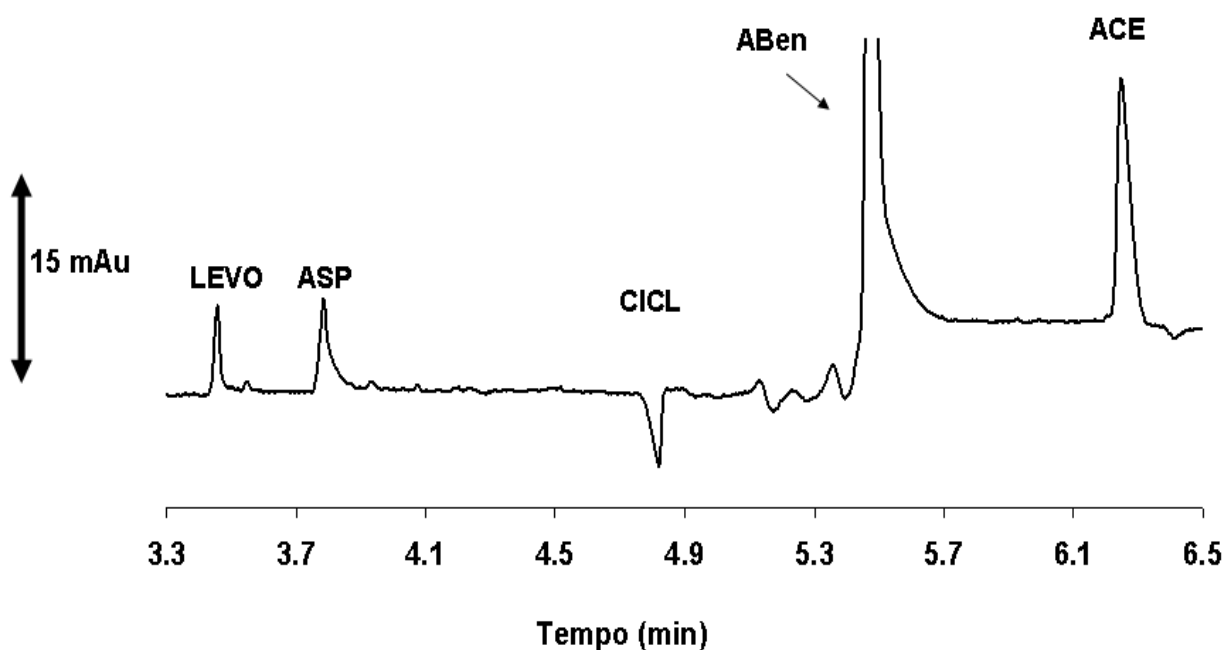


Gráfico – Eletroferograma de amostra de refrigerante a base de cola. Composição do eletrólito: $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tetraborato de sódio e $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tampão Tris-ABen (pH 9,15). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20kV, temperatura 30°C , 215 nm e capilar ($50\mu\text{m}$) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo).

Fonte- O autor (2010).

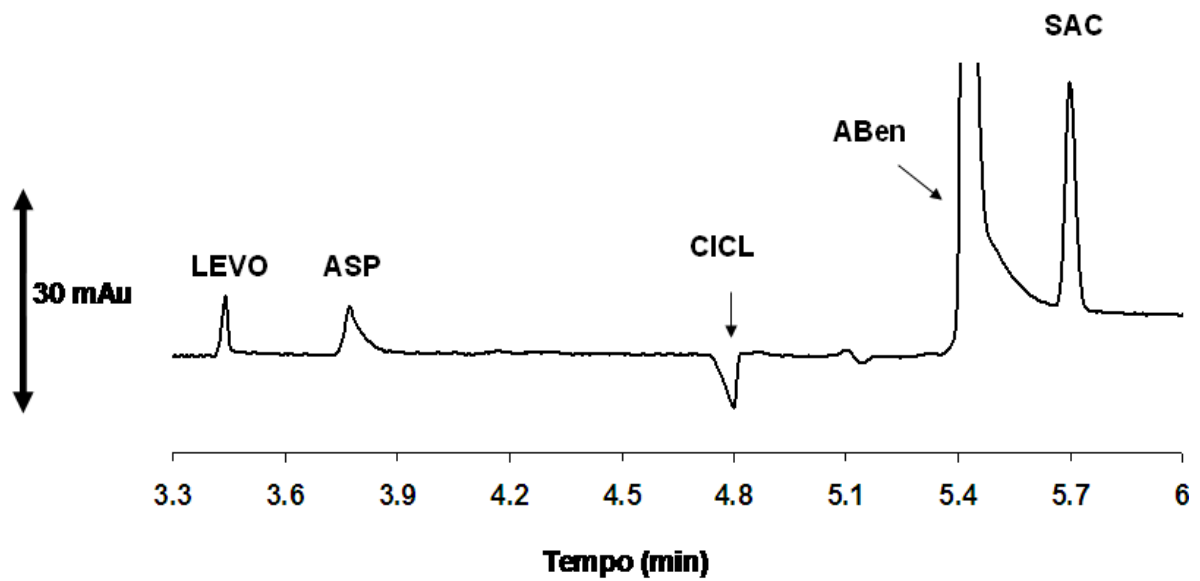


Gráfico – Eletroferograma de amostra de refrigerante a base de guaraná. Composição do eletrólito: 25,0 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio e 15,0 mmol L⁻¹ tampão Tris-ABen (pH 9,15). Condições de operação: 4s de injeção a 50 mbar, voltagem aplicada +20kV, temperatura 30°C, 215 nm e capilar (50µm) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo).

Fonte- O autor (2010).

APÊNDICE B – Curriculum Vitae

VÍVIAN NAZARETH OLIVEIRA

Brasileira, casada, 28 anos
vivianazareth@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Ago 2007/ Fev 2010: Mestrado em Química pela Universidade Federal de Juiz de Fora. Desenvolvimento e otimização de metodologia para análise de edulcorantes por eletroforese capilar.
- 2002-2005: Graduação em Farmácia pela Universidade Federal de Juiz de Fora
- 1998-2001: Curso Técnico em Leite e Derivados, formada pelo Instituto de Laticínios Cândido Tostes.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

- Abr 2008/ presente data: Bioquímica da Companhia de Saneamento de Juiz de Fora (CESAMA).

- Fev 2006/ Mar 2008: Responsável Técnica da Drogeria DrogaNorte – Benfica – Juiz de Fora/MG.
 - Trabalhos desenvolvidos:
 - Regularização do cadastro da drogeria junto a ANVISA;
 - Elaboração e implantação do Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde;
 - Prestação de Atenção Farmacêutica;
 - Atendimento no balcão.

- Fev 2005/Jul 2005: Professora de Físico-Química de Leite no Instituto de Laticínios Cândido Tostes
 - Ministrante de “Cursos de Reciclagem em Físico-Química de Leite e Derivados”;

- Maio 2002 /Maio 2004: Professora de Microbiologia no Instituto de Laticínios Cândido Tostes
- Ministrante de aulas práticas de Microbiologia para as turmas do 1ºano e 2ºano do ensino técnico;
- Ministrante de “Cursos de Reciclagem em Microbiologia de Leite e Derivados” e “Curso de Técnicas Básicas em Microbiologia de Leite e Derivados”.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Cursos

- 18 a 21 de Ago 2004: Participação do Curso dos Antiinflamatórios Não-Esteróides, ministrado durante o III Congresso de Farmácia de Juiz de Fora
- 18 a 21 de Ago 2004: Participação do Curso de Biotecnologia Aplicada, ministrado durante o III Congresso de Farmácia de Juiz de Fora

Participações em congressos

- 2 a 6 de Dez 2005: Participação do 11º Simpósio Latinoamericano em Aplicaciones de la Electroforesis Capilar y Tecnología Del Microchip em Biotecnologia, Biomedicina, Biofarmacia e Industria. Painel apresentado “Determination of short fatty acids in butter by Capillary Electrophoresis”.
- 3 a 5 de Nov 2004: Participação do XVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química. Painel apresentado: “Análise qualitativa de ácidos graxos de cadeia curta por eletroforese capilar em amostras de manteiga”.

Produção de artigos

- Artigo submetido a Analytica Chimica Acta, com título “Simultaneous analysis of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K by capillary zone electrophoresis under UV detection”.

ANEXO I - TESTE DE SHAPIRO-WILK

O teste Shapiro-Wilk, proposto em 1965, é baseado na estatística W , calculada como a seguir:

$$W = \frac{b^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

onde x_i são os valores da amostra ordenados (x_1 é o menor). Menores valores de W são evidências de que os dados são normais. A constante b é determinada da seguinte forma

$$b = \sum_{i=1}^{n/2} a_{n-i+1} \times (x_{n-i+1} - x_i)$$

onde a_i são constantes geradas pelas médias, variâncias e covariâncias das estatísticas de ordem de uma amostra de tamanho n de uma distribuição Normal. Seus valores, tabelados, são dados abaixo.

$i \setminus N$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0.7071	0.7071	0.6872	0.6646	0.6431	0.6233	0.6052	0.5888	0.5739	
2		0.0000	0.1677	0.2413	0.2806	0.3031	0.3164	0.3244	0.3291	
3				0.0000	0.0875	0.1401	0.1743	0.1976	0.2141	
4						0.0000	0.0561	0.0947	0.1224	
5								0.0000	0.0399	
$i \setminus N$	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0.5601	0.5475	0.5359	0.5251	0.5150	0.5056	0.4968	0.4886	0.4808	0.4734
2	0.3315	0.3325	0.3325	0.3318	0.3306	0.3290	0.3273	0.3253	0.3232	0.3211
3	0.2260	0.2347	0.2412	0.2460	0.2495	0.2521	0.2540	0.2553	0.2561	0.2565
4	0.1429	0.1586	0.1707	0.1802	0.1878	0.1939	0.1988	0.2027	0.2059	0.2085
5	0.0695	0.0922	0.1099	0.1240	0.1353	0.1447	0.1524	0.1587	0.1641	0.1686
6	0.0000	0.0303	0.0539	0.0727	0.0880	0.1005	0.1109	0.1197	0.1271	0.1334
7			0.0000	0.0240	0.0433	0.0593	0.0725	0.0837	0.0932	0.1013
8					0.0000	0.0196	0.0359	0.0496	0.0612	0.0711
9							0.0000	0.0163	0.0303	0.0422
10									0.0000	0.0140

Para realizar o teste de Shapiro-Wilk, devemos:

1. Formulação da Hipótese:

$$\begin{cases} H_0 : \text{A amostra provém de uma população Normal} \\ H_1 : \text{A amostra não provém de uma população Normal} \end{cases}$$

2. Estabelecer o Nível de significância do teste (α), normalmente 0,05;

3. Calcular a estatística de teste:

- Ordenar as n observações da amostra: $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$;
- Calcular $\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$;
- Calcular b ;
- Calcular W .

4. Tomar a decisão: Rejeitar H_0 ao nível de significância α se $W_{\text{calculado}} < W_{\alpha}$ (os valores críticos da estatística W de Shapiro-Wilk são dados na Tabela abaixo).

		Nível de significância α								
		0.01	0.02	0.05	0.10	0.50	0.90	0.95	0.98	0.99
Tamanho da Amostra, n	3	0.753	0.756	0.767	0.789	0.959	0.998	0.999	1.000	1.000
	4	0.687	0.707	0.748	0.792	0.935	0.987	0.992	0.996	0.997
	5	0.666	0.715	0.762	0.806	0.927	0.979	0.986	0.991	0.993
	6	0.713	0.743	0.788	0.826	0.927	0.974	0.981	0.986	0.989
	7	0.730	0.760	0.803	0.838	0.928	0.972	0.979	0.985	0.988
	8	0.749	0.778	0.818	0.851	0.932	0.972	0.978	0.984	0.987
	9	0.764	0.791	0.829	0.859	0.935	0.972	0.978	0.984	0.986
	10	0.781	0.806	0.842	0.869	0.938	0.972	0.978	0.983	0.986
	11	0.792	0.817	0.850	0.876	0.940	0.973	0.979	0.984	0.986
	12	0.805	0.828	0.859	0.883	0.943	0.973	0.979	0.984	0.986
	13	0.814	0.837	0.866	0.889	0.945	0.974	0.979	0.984	0.986
	14	0.825	0.846	0.874	0.895	0.947	0.975	0.980	0.984	0.986
	15	0.835	0.855	0.881	0.901	0.950	0.975	0.980	0.984	0.987
	16	0.844	0.863	0.887	0.905	0.952	0.976	0.981	0.985	0.987
	17	0.851	0.869	0.892	0.910	0.954	0.977	0.981	0.985	0.987
	18	0.858	0.874	0.897	0.914	0.956	0.978	0.982	0.986	0.988
	19	0.863	0.879	0.901	0.917	0.957	0.978	0.982	0.986	0.988
	20	0.868	0.884	0.905	0.920	0.959	0.979	0.983	0.986	0.988
	21	0.873	0.888	0.908	0.923	0.960	0.980	0.983	0.987	0.989
	22	0.878	0.892	0.911	0.926	0.961	0.980	0.984	0.987	0.989
	23	0.881	0.895	0.914	0.928	0.962	0.981	0.984	0.987	0.989
	24	0.884	0.898	0.916	0.930	0.963	0.981	0.984	0.987	0.989
	25	0.888	0.901	0.918	0.931	0.964	0.981	0.985	0.988	0.989
	26	0.891	0.904	0.920	0.933	0.965	0.982	0.985	0.988	0.989
	27	0.894	0.906	0.923	0.935	0.965	0.982	0.985	0.988	0.990
	28	0.896	0.908	0.924	0.936	0.966	0.982	0.985	0.988	0.990
	29	0.898	0.910	0.926	0.937	0.966	0.982	0.985	0.988	0.990
	30	0.900	0.912	0.927	0.939	0.967	0.983	0.985	0.988	0.990

Exemplo: Avaliar a normalidade dos dados referente a medição de 10 peças.

8; 9; 10; 10; 10; 12; 12; 16; 19; 24

Em seguida, calculamos $\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = 236$ e a constante b:

i	$N-i+1$	a_{N-i+1}	X_{N-i+1}	x_i	$a_{N-i+1}(X_{N-i+1}-x_i)$
1	10	0,5739	24	9	9,1824
2	9	0,3291	19	9	3,2910
3	8	0,2141	16	10	1,2846
4	7	0,1224	12	10	0,2448
5	6	0,0399	12	10	0,0798
					b=14,0826

e por fim, W :

$$W = \frac{b^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} = \frac{14,0826^2}{236} = 0,840$$

Pela regra de decisão do teste, $W_{\text{calculado}}=0,840 < W_{(0,05;10)}=0,842$, com o p-valor calculado por $P[W > W_{\text{calculado}}]=0,0443 < \alpha$. Assim, podemos afirmar com nível de significância de 5% que a amostra não provém de uma população normal. Esse fato é confirmado pela aleatoriedade dos pontos em torno da reta.

(Portal action. Teste de Shapiro-Wilk. Disponível em: <<http://www.portaction.com.br/content/64-teste-de-shapiro-wilk>>. Acessado em: 30 mar. 10.)