

Análise de sucralose por cromatografia líquida de alta eficiência em refrigerante dietético e adoçante de mesa

Analysis of sucralose by high performance liquid chromatography in diet soft drink and table top sweetener

RIALA6/1040

Iracema de Albuquerque KIMURA^{1*}; Cristiane Bonaldi CANO²; Letícia Araújo Farah NAGATO²; Maristela Satou MARTINS¹

* Endereço para correspondência: Seção de Aditivos, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, S. Paulo / SP, telefone (11) 3068-2944.

¹ Seção de Aditivos, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz.

² Seção de Bebidas, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz..

Recebido: 04/04/2005 – Aceito para publicação: 30/09/2005

RESUMO

A sucralose é obtida a partir da sacarose em um processo que substitui 3 grupos hidroxilas por 3 átomos de cloro, aumentando assim o poder adoçante em até 600 vezes, quando comparado ao açúcar. Nos produtos “light” e “diet” o edulcorante sucralose pode ser utilizado isoladamente ou associado a outros edulcorantes. A técnica comumente empregada para a determinação de sucralose é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de índice de refração. O objetivo deste trabalho foi aplicar o método recomendado pelo Food Chemicals Codex (FCC) e pelo JECFA (FAO/OMS) para o edulcorante sucralose puro, em amostras de refrigerante dietético e adoçante de mesa. A técnica utilizada foi a CLAE com coluna C18, fase móvel água/acetonitrila (85:15 v/v) e detector de índice de refração. Para a quantificação foi adotado o método de padronização externa. A curva de calibração obtida foi linear a 95 % de confiança com $R^2_{\text{ajust}} = 1,00$. A recuperação variou de 96 a 101 %. Os resultados de sucralose encontrados variaram de 0,1 a 7 g. 100g⁻¹ para os adoçantes e de 6,1 e 16,2 mg. 100mL⁻¹ para os refrigerantes. A aplicação desta metodologia mostrou ser eficiente na separação e quantificação desse composto, nas amostras testadas.

Palavras-Chave. sucralose, edulcorantes, adoçante de mesa, refrigerante dietético, CLAE

ABSTRACT

Sucralose is derived from sucrose in a process that substitutes three hydroxyl groups by three chlorine atoms, resulting in a high intensity sweetener, approximately 600 times sweeter than sugar. For light and diet products the sucralose sweetener can be used either isolated or associated to other sweeteners. The most suitable technique for sucralose determination is the high performance liquid chromatography (HPLC) with refractive index detection. The present study aimed to use a technique recommended by Food Chemical Codex (FCC) and by JECFA (FAO/WHO) for analysis of pure sucralose in diet soft drinks and table top sweeteners samples. The employed technique was HPLC on a C-18 reverse-phase column, with a mobile phase water/acetonitrile (85:15 v/v), and refractive index detection; the external standard method was used for quantification. The obtained calibration curve was linear at 95 % confidence level with $R^2_{\text{adjust}} = 1.00$. The recoveries varied from 96 to 101 %. Sucralose concentrations ranged from 0.1 to 7 g. 100 g⁻¹ for table top sweeteners, and from 6.1 to 16.2 mg. 100 mL⁻¹ for soft drinks samples. The application of this methodology proved to be very efficient for processing the sucralose separation and its quantification in analyzed samples.

Key Words. sucralose, sweeteners, table top sweetener, diet soft drink, HPLC.

INTRODUÇÃO

Entre os edulcorantes artificiais de uso em alimentos e bebidas para dietas com ingestão controlada de açúcares e controle de peso, destaca-se a sucralose, cujo uso foi aprovado pela legislação brasileira em novembro/95¹. Alguns anos após esta data houve um crescimento significativo do emprego deste edulcorante em adoçantes e em vários tipos de alimentos, tais como: refrigerantes, néctares, sucos, bebidas lácteas, iogurtes, geléias, achocolatados, bolos, etc.

A sucralose é obtida a partir da sacarose em um processo que substitui 3 grupos hidroxilas por três átomos de cloro, aumentando assim o poder adoçante em até 600 vezes, quando comparado ao açúcar^{2,3,4,5}.

A Figura 1 apresenta a estrutura da sucralose (4, 1', 6' - triclorigalactosacarose), cuja fórmula molecular é $C_{12}H_{19}Cl_3O_8$ ^{2,6}.

Segundo a Resolução RDC nº 3/01 que aprova o uso de aditivos edulcorantes, a sucralose é permitida em alimentos com limites máximos de 0,033 a 0,045 g .100g⁻¹, em bebidas de 0,019 a 0,025 g . 100mL⁻¹ e em goma de mascar até 0,25 g . 100g⁻¹. Em adição, para os adoçantes de mesa não há limite na legislação⁷.

A sua ingestão diária aceitável (IDA) foi estabelecida pelo Comitê Conjunto de Experts sobre Aditivos Alimentícios (JECFA) da FAO/OMS em 0-15 mg . Kg⁻¹ de peso corpóreo⁸.

Nos produtos “light” e “diet” o edulcorante sucralose pode ser utilizado isoladamente ou associado a outros edulcorantes. Essa combinação geralmente permite uma melhor estabilidade e aceitação pelo consumidor do sabor doce do produto³.

Uma das técnicas mais usadas para a análise de sucralose é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A detecção deste analito pode ser feita por ultravioleta (UV) ou por índice de refração (IR). A detecção por UV é realizada a 190 - 200 nm; nesta região são absorvidos muitos compostos presentes nas amostras que podem interferir na análise. Como a sucralose tem o mesmo comportamento que os carboidratos, o detector de índice de refração é o mais comumente utilizado^{2,4,5,9}.

Neste trabalho o objetivo foi aplicar o método recomendado pelo Food Chemicals Codex (FCC) e JECFA (FAO/OMS)^{6,10}, para o edulcorante sucralose puro, em amostras de refrigerantes “light” e “diet” e adoçantes de mesa.

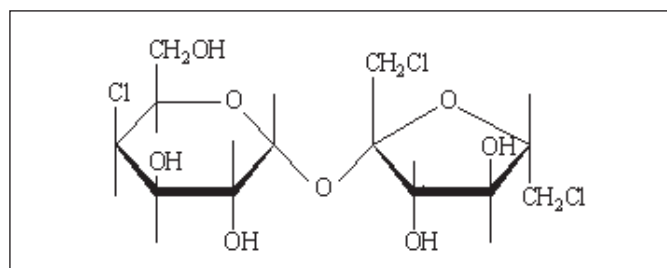


Figura 1. Fórmula estrutural da sucralose – P.M. 397,64.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram adquiridas no comércio três amostras de adoçantes de mesa contendo sucralose, dois refrigerantes “light” de sabor cola e dois refrigerantes “diet”, sabores laranja e guaraná, nos quais foi adicionada quantidade conhecida de sucralose.

Método

Utilizou-se o método recomendado pelo FCC e JECFA (FAO/OMS) que emprega a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração^{6,10}. O método descrito utiliza uma coluna RadPak C18 de 10 cm x 8 mm, 5 µm e vazão de fluxo de 1,5 mL min⁻¹. Este método prevê que podem ser feitos ajustes nas condições cromatográficas de modo que o tempo de retenção da sucralose fique próximo de 9 min.

Equipamento e condições cromatográficas: cromatógrafo a líquido (Shimadzu), bomba (LC-10AD); forno (CTO 10 A); detector de índice de refração (RID-10 A), temperatura de 35,5 °C; injetor Rheodyne de 20 µL; desgaseificador; coluna C18 (Lichrospher 100), 125 mm de comprimento x 4 mm de diâmetro, com partículas de 5 µm, pré-coluna de mesma fase, 4 X 4 mm, temperatura do forno: 30 °C; vazão de fluxo: 0,6 mL . min⁻¹. Aquisição de dados: software Class LC10, versão 1.63, Shimadzu Corporation (1996).

Reagentes e solventes:

Padrão de sucralose: fornecido pelo fabricante “Johnson & Johnson” (pureza acima de 99%).

Fase móvel: água/acetoneitrila (85:15 v/v), desgaseificada e filtrada com membrana filtrante de 0,45µm (Millipore, tipo HVPVDF). O solvente utilizado para cromatografia foi grau CLAE e a água foi purificada em equipamento “Milli-Q”.

Preparação do padrão e amostras:

Padrão: foi preparada uma solução estoque de sucralose na concentração de 50 mg .100mL⁻¹, diluída na fase móvel. Para a curva de calibração foram preparadas quatro soluções de trabalho diluídas na fase móvel, nas concentrações de sucralose de 5, 10, 15 e 20 mg . 100mL⁻¹.

Recuperação: foi realizado um estudo de recuperação em uma amostra de adoçante (amostra sólida) e uma de refrigerante, adicionando-se duas soluções-padrão de sucralose nas concentrações de 5 e 10 mg . 100mL⁻¹, injetadas em triplicata. As amostras usadas neste teste foram: adoçante 1 e refrigerante cola 1.

Amostras

Adoçantes de mesa (sachets e tabletes): foram homogeneizados e pesados em quantidades próximas às concentrações das soluções do padrão, diluídos na fase móvel e filtrados. Estas concentrações foram baseadas nas formulações declaradas na rotulagem.

Refrigerantes: as amostras foram previamente degaseificadas no ultra-som por 20 minutos. Nos refrigerantes que continham sucralose, alíquotas de 50 mL foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL, completados os volumes com a fase móvel e filtrados. Nos outros dois refrigerantes “diet”, que não continham sucralose, sabores guaraná e laranja, foi adicionado este edulcorante nas concentrações de 101,4 mg. 100mL⁻¹ e 100,4 mg. 100mL⁻¹, respectivamente, em seguida foram pipetados 10 mL para um volume de 100 mL, completados o volume com a fase móvel e filtrados.

As soluções de trabalho e as amostras preparadas foram filtradas com unidade filtrante HV, membrana Durapore, 0,45µm (Millipore) e injetadas diretamente no cromatógrafo, em triplicata. Para a quantificação de sucralose foi utilizado o método de padronização externa.

Análise estatística: para gerar a curva de calibração foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) que corresponde à regressão linear simples entre as variáveis área do pico cromatográfico e concentração das soluções do padrão no nível de 95% de confiança. Para testar a significância dos coeficientes da calibração (intercepto e sensibilidade do método) foram aplicados o teste-*t* e intervalos de confiança e de predição no nível de 95 % de confiança. Toda a análise estatística foi realizada usando o pacote estatístico Minitab for Windows, v. 13.31 (2000)¹¹. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram realizados através da distribuição t-student dos valores do intercepto e sensibilidade do método obtidos na regressão linear¹².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 ilustra o cromatograma obtido por CLAE-IR, de uma solução padrão de sucralose a 10 mg 100mL⁻¹. O método oficial recomenda que o tempo de retenção da sucralose fique em torno de 9 min; como foi utilizada uma coluna de 12,5 cm x 4mm, 5µm, foram realizados alguns ajustes nas condições cromatográficas, tais como: redução da vazão de fluxo para 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura na coluna de 30 °C, obtendo um tempo de retenção variando de 6,45 a 7,89 min

A curva de calibração conforme os resultados da ANOVA foi extremamente significativa para o modelo linear ($F_{obs(1;13;0,05)} = 205028, p = 0,000$) e com $R^2_{ajust} = 1,00$, o que sugere que toda a faixa estudada de concentração (0 a 20 mg 100mL⁻¹, medida em triplicata) possui homogeneidade de variância (Figura 3). A equação da reta foi $y = 24110 x$, onde $y = \text{área}$ e $x = \text{concentração de sucralose}$. O limite de detecção (LOD) foi de 1,65 mg 100mL⁻¹ e o limite de quantificação (LOQ) foi de 4,95 mg 100mL⁻¹.

A Tabela 1 mostra os dados de recuperação feitos em uma amostra de adoçante e uma amostra de refrigerante.

Nas duas faixas de concentração estudadas houve uma recuperação elevada de 96 a 101 %, mostrando que o método é aplicável diretamente a essas matrizes, sem a necessidade de se fazer uma extração prévia da amostra. Como até o presente

momento não foi relatado um método de análise para a determinação de sucralose em amostras de adoçantes e refrigerantes pelos órgãos regulamentadores e pela literatura nacional, este método poderia ser aplicado na rotina, devido à sua simplicidade, rapidez e precisão.

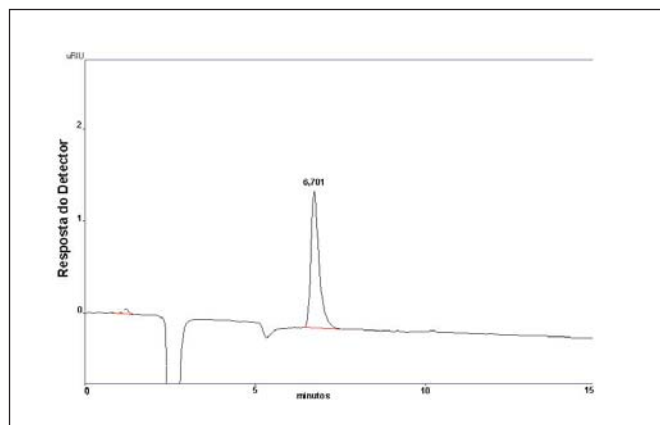


Figura 2. Cromatograma por CLAE-IR de uma solução padrão de sucralose (10 mg.100 mL). Coluna C18 (Lichrospher 100), 5 µm, 125x4 mm, temperatura do forno: 30 °C; fase móvel: água/ acetonitrila (85:15 v/v), vazão de fluxo: 0,6 mL.min⁻¹, detector de índice de refração, temperatura de 35,5 °C.

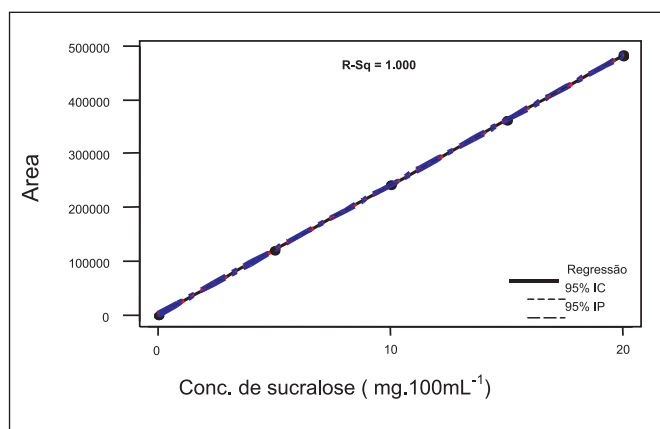


Figura 3. Curva de calibração da sucralose (mg.100 mL) obtida por CLAE-IR. Cada ponto é a média de três medidas. IC - intervalo de confiança e IP – intervalo de predição a 95 % de confiança.

Tabela 1. Dados de recuperação (%) de sucralose

Concentração de sucralose adicionada (mg 100mL ⁻¹)	Adoçante*	Refrigerante*
5	96,9 ± 0,5	98,1 ± 0,7
10	96,8 ± 0,6	101,2 ± 1

* Média ± desvio padrão de triplicatas

Foram injetadas no cromatógrafo, amostras de adoçante de mesa e refrigerante “light” que não continham sucralose e verificou-se pelos cromatogramas que não houve nenhum pico no intervalo do tempo de retenção deste composto, tanto para o adoçante, quanto para o refrigerante, quando comparadas com os mesmos tipos de amostras contendo sucralose, conforme Figuras 4 e 5. Estes resultados estão de acordo com os elevados valores obtidos na recuperação, não havendo o efeito de matriz sobre a determinação deste composto.

Os resultados encontrados dos teores de sucralose em amostras de adoçantes e refrigerantes estão descritos na Tabela 2.

No caso das amostras de adoçantes, observou-se valores muito diferentes de sucralose entre as marcas analisadas. Esses teores variaram devido à formulação de cada produto bem como as formas de apresentação (sachet e tablete). O adoçante 1 apresentou um teor menor de sucralose por ser do

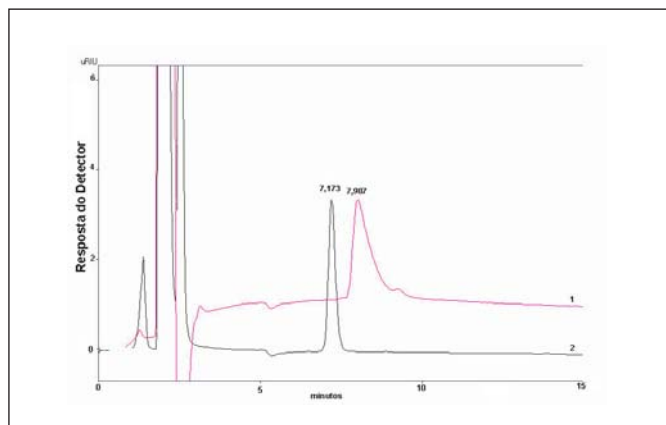


Figura 4. Cromatogramas de adoçantes obtidos por CLAE-IR: (1) adoçante de mesa sem sucralose; (2) adoçante de mesa contendo sucralose. Mesmas condições cromatográficas da solução padrão de sucralose.

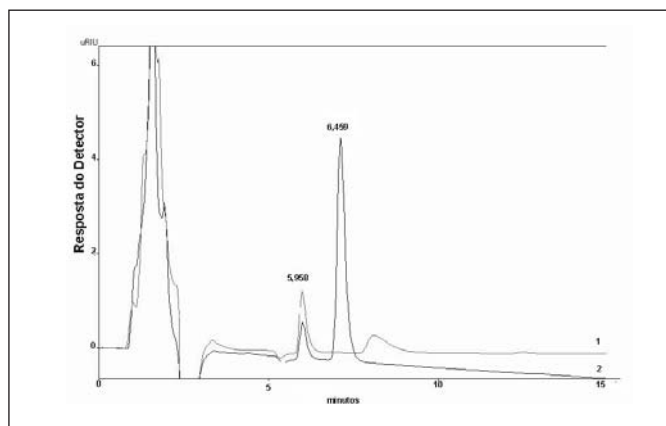


Figura 5. Cromatogramas de refrigerantes obtidos por CLAE-IR: (1) refrigerante “light” sem sucralose; (2) refrigerante “light” contendo sucralose. Mesmas condições cromatográficas da solução padrão de sucralose.

Tabela 2. Teores médios de sucralose encontrados nas amostras de refrigerante e adoçante de mesa

Amostras	Sucralose (mg. 100g ⁻¹ ou 100 mL ⁻¹)*	Teor adicionado (mg. 100 mL ⁻¹)
Adoçante 1	153 ± 1	-
Adoçante 2	1298 ± 6	-
Adoçante 3	7558 ± 52	-
Refrigerante cola 1	6,1 ± 0,1	-
Refrigerante cola 2	16,2 ± 0,1	-
Refrigerante guaraná	108 ± 2	101,4
Refrigerante laranja	103 ± 2	100,4

* Média ± desvio padrão de triplicatas

tipo “light” e conter sacarose em sua composição. O adoçante 2 continha o edulcorante acessulfame-K associado e o adoçante 3 (tablete) continha somente a sucralose como edulcorante.

As amostras dos adoçantes identificadas como 1 e 2 não apresentavam na rotulagem qual era a quantidade exata de edulcorante sucralose utilizada na sua composição. Quanto à amostra do adoçante 3, o teor obtido de sucralose foi concordante com o declarado em sua formulação (teor declarado = 7800 mg. 100g⁻¹).

No comércio foi encontrado somente refrigerante de cola contendo sucralose, devido à dificuldade de se encontrar refrigerantes de outros sabores contendo este composto, foi adicionada uma quantidade conhecida deste edulcorante em refrigerantes “diet”, sabores guaraná e laranja, onde se verificou a aplicabilidade do método utilizado nestas matrizes.

Os valores do edulcorante encontrados em amostras de refrigerantes de cola 1 e 2 foram concordantes com os declarados na rotulagem.

CONCLUSÕES

A técnica de cromatografia líquida com detector de índice de refração recomendado pelo Food Chemicals Codex (FCC) e JECFA (FAO/OMS) para o edulcorante sucralose puro mostrou ser aplicável em amostras de adoçantes de mesa e refrigerantes.

O método empregado mostrou-se muito rápido, simples e preciso, sem necessidade de extração prévia nestes tipos de amostra sendo satisfatório para a determinação de sucralose nas análises de rotina.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Portaria nº 318 de 24 de nov de 1995, da DTEN do Ministério da Saúde. [Aprova o uso do aditivo sucralose, com a função de edulcorante em alimentos e bebidas dietéticas]. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 28 nov. 1995. Seção 1, nº 227, 19406.

2. Miller GA. Alternative Sweeteners, New York: Marcel Dekker, Inc., 1991. p. 173-95.
3. Katrin S, Manczyk C. Reformulando as regras: novas opções em sistemas edulcorantes. *Food Ingredients* 2003; 24: 50-2.
4. Quinlan ME, Jenner MR. Analysis and stability of the sweetener sucralose in beverages. *J Food Sci* 1990; 55(1): 244-6.
5. Wallis KJ. Sucralose: features and benefits. *Food Australia* 1993; 45(12): 578-80.
6. JECFA-Joint Fao/Who Expert Committee on Food Additives - Compendium of Food Additive Specifications. Rome, 1992. p. 1535-6.
7. Brasil. Resolução RDC nº 3, de 2 de jan. de 2001 da ANVISA do Ministério da Saúde [Aprova o uso de aditivos edulcorantes, estabelecendo seus limites máximos para os alimentos]. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 5 jan. 2001. Seção 1, nº 4, p. 39-40.*
8. JECFA. Joint Fao/Who Expert Committee on Food Additives - Disponível em www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_1914.htm. Acesso em: 11 fev 2005.
9. Lawrence JF, Charbonneau CF. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse-phase liquid chromatography with absorbance detection. *J Assoc Off Anal Chem* 1988; 71(5): 934-7.
10. Committee on Food Chemicals Codex – Food Chemicals Codex. 4ª ed. Washington D. C.: National Academic Press; 1996. p. 398-400.
11. MINITAB for windows, [Minitab- Inc, USA.] Versão. 13.31 .2000. CD-rom.
12. Currie L A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Analytica Chimica Acta* 1999, 391: 127-34.