

Determinação de sucralose em néctares de frutas “light” por CLAE-IR

Determination of sucralose in light nectars by HPLC-RI

RIALA6/1135

Iracema A. KIMURA^{1*}, Cristiane B.CANO², Maristela S. MARTINS¹, Letícia A.F. NAGATO²

*Endereço para correspondência: ¹ Seção de Aditivos, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP/Brasil. CEP 01246-902. E-mail: irkimura@ial.sp.gov.br

² Seção de Bebidas, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP/Brasil. CEP 01246-902.

Recebido: 25/06/2007 – Aceito para publicação: 19/09/2007

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo propor uma metodologia analítica de determinação de sucralose em amostras de néctares de frutas “light” utilizando extração em fase sólida (EFS) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de índice de refração (IR). Quatorze amostras de néctares de frutas “light” de diferentes marcas e sabores (uva, pêssego, morango, manga, goiaba e maracujá) foram centrifugadas a 3000rpm e extraídas em cartuchos de EFS, C18 (500mg, 3mL). Os limites de detecção e quantificação foram respectivamente de 1,7 mg.100mL⁻¹ e de 5,9 mg.100mL⁻¹, e os valores de recuperação foram satisfatórios, em torno de 100%. A correção do efeito da matriz foi necessária apenas para os néctares de uva. A simplicidade, o pouco volume de solventes empregados e a facilidade de processar várias amostras de néctares ao mesmo tempo fazem com que este método possa ser utilizado na rotina dos laboratórios.

Palavras-chave. sucralose, extração em fase sólida, edulcorantes, CLAE, néctar de frutas “light”

ABSTRACT

This paper describes a methodology for performing the sucralose determination in light nectar samples, by using solid phase extraction (SPE) and HPLC with refractive index detection. Fourteen samples of grape, peach, strawberry, mango, guava and passion fruit light nectars from different manufacturers were centrifuged at 3000rpm and cleaned up on C18 SPE cartridges (500mg, 3mL). The detection and quantification limits were 1.7mg. 100mL⁻¹ and 5.9mg.100mL⁻¹, respectively, and the recoveries of sucralose were satisfactory, being around 100%. The matrix effect correction was needed for light grape nectars only. The simplicity of the presented method, the minimal solvent volume requirements, and the easiness in extracting many samples at the same time make this methodology suitable for laboratory routine analyses.

Key words. sucralose, solid phase extraction, sweetener, HPLC, light nectar

INTRODUÇÃO

A sucralose é um edulcorante artificial obtido a partir da sacarose em um processo que substitui três grupos hidroxila por três átomos de cloro e é utilizada em alimentos e bebidas de baixa caloria e adoçantes. Devido à sua grande estabilidade térmica e estabilidade no alimento durante o seu armazenamento é normalmente empregada isolada ou associada com outros edulcorantes^{1,2,3,4}.

Foi descoberta em 1976, através de um estudo colaborativo entre o Queen Elizabeth College da Universidade de Londres e uma companhia de açúcar da Inglaterra, a Tate & Lyle². O primeiro grupo científico a avaliar a segurança da sucralose e o seu uso em alimentos e bebidas foi o Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) o qual, em 1990, estabeleceu como Ingestão Diária Aceitável (IDA) o valor de 0-15mg.kg⁻¹ de peso corpóreo^{2,5}. O Canadá foi o primeiro país a aprovar o uso da sucralose em 1991; em 1993 foi a vez da Austrália^{2,3}. Em 1998 os Estados Unidos, através da Food and Drug Administration (FDA), aprovou o seu emprego em 15 categorias de alimentos e bebidas e posteriormente (1999) estendeu o seu uso em outras categorias^{3,5}. Em março de 2002 a sucralose foi aprovada para uso em alimentos pela UK's Food Standards Agency da Inglaterra e em janeiro de 2004 a União Européia publicou a Directiva 2003/115/CE que alterou a Directiva de Edulcorantes (94/35/CE) para permitir o uso da sucralose em alimentos e bebidas, principalmente aqueles com reduzido teor calórico e sem adição de açúcar^{5,6,7,8}.

No Brasil o uso da sucralose em alimentos dietéticos e de baixa caloria está aprovado desde novembro de 1995⁹. A Resolução/RDC nº 3, de 2-01-01 da ANVISA/MS estabelece os limites máximos para algumas categorias de alimentos e bebidas, entre eles, bebidas com reduzido teor de açúcares e bebidas para dietas com restrição de açúcares¹⁰.

Estas bebidas com reduzido teor de açúcares e para dietas com restrição de açúcares são bastante consumidas no Brasil, havendo no comércio uma ampla variedade de bebidas formuladas com edulcorantes. Nos néctares de frutas “light” pode-se encontrar apenas a sucralose ou associada com outro edulcorante, o acesulfame-K.

Os padrões de identidade e qualidade de néctares de frutas são fixados pelo Ministério da Agricultura através do Decreto nº 2314/97 e Instrução Normativa nº 12, de 21-09-03, o qual não permite a associação de açúcares e edulcorantes hipocalóricos e não calóricos na fabricação de néctar^{11,12}.

Na análise da sucralose em alimentos e bebidas algumas técnicas analíticas têm sido aplicadas, tais como a eletroforese capilar (EC)^{13,14,15}, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV ou índice de refração (IR)^{16,17}, a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE)¹⁸ e a cromatografia de íons (CI) com detector amperométrico (PAD)^{19,20}.

O método oficial proposto pelo Food Chemicals Codex (FCC) e JECFA para a determinação da sucralose pura emprega a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração (CLAE-IR)^{21,22}. No Brasil, Kimura et al.²³ realizaram um estudo da determinação da sucralose empregando o método oficial em refrigerantes dietéticos e adoçantes de mesa. Para matrizes mais complexas, existem na literatura trabalhos que utilizam a técnica da extração em fase sólida (EFS) para a purificação e concentração deste analito em alimentos, antes da utilização de um método analítico^{15,17,20}.

Neste estudo viu-se a necessidade de se determinar o conteúdo de sucralose nos néctares de frutas “light”, visto que não existem métodos oficiais já estabelecidos para este tipo de produto.

Este trabalho teve como objetivo propor uma metodologia para separar o edulcorante sucralose das demais substâncias presentes em amostras de néctares de frutas “light” empregando-se um pré-tratamento da amostra com extração em fase sólida e posterior quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração (CLAE-IR).

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foram analisadas 14 amostras de néctares de frutas “light”, adquiridas no comércio da cidade de São Paulo, sabores: goiaba (2), manga (3), maracujá (2), morango (1), pêssego (3) e uva (3) de diferentes marcas e 6 amostras de néctares de frutas sem a adição de sucralose nos mesmos sabores de diferentes marcas.

Reagentes e padrão

O padrão de sucralose foi fornecido pelo fabricante “Johnson & Johnson” (pureza acima de 99%). Todos os solventes utilizados (metanol, acetonitrila e acetona) foram grau CLAE (min. 99% de pureza, marcas Merck e J. T. Baker) e a água foi purificada em equipamento “Milli-Q”.

Equipamentos utilizados

Cromatógrafo a líquido Shimadzu modelo LC10A, bomba (LC-10AD); forno (CTO 10 A); detector de índice de refração (RID-10 A), injetor Rheodyne com Loop de 20µL; desgaseificador DGU 12A; coluna C18 (Lichrospher 100, Merck), 125 mm de comprimento x 4mm de diâmetro, com partículas de 5µm, pré-coluna de mesma fase, 4 X 4mm. Aquisição de dados: software Class LC10, versão 1.63, Shimadzu Corporation (1996); centrífuga (CELM LS-3); suporte para cartucho de EFS (Manifold) e colunas prontas de EFS (500 mg, 3mL) de C18 da J. T. Baker.

Condições cromatográficas: temperatura do detector IR: 35,5 °C; temperatura do forno: 30°C; vazão de fluxo da fase

móvel: 0,6mL.min⁻¹²³. Fase móvel: água/acetonitrila (85:15 v/v), desgaseificada e filtrada com membrana filtrante de 0,45µm (Millipore, tipo HV-PVDF).

Preparo das soluções-padrão

Foram preparadas soluções de sucralose nas concentrações de 5, 10, 15 e 20mg.100mL⁻¹, diluídas na fase móvel e filtradas com membranas filtrantes Durapore HV de 0,45µm (Millipore), para a curva analítica. Em seguida, foram feitas duas extrações para cada solução-padrão e por dois analistas conforme o procedimento descrito abaixo para as amostras, sem a etapa de centrifugação.

Preparo das amostras

Foram centrifugadas 10mL das amostras a 3000rpm por 30 minutos para a decantação total da polpa. O sobrenadante (1mL) foi transferido para a coluna de EFS, previamente condicionada com 3mL de metanol, seguida de 3ml de acetonitrila. A seguir, para a eliminação das impurezas, efetuou-se a lavagem com 6mL de água e fez-se a eluição da sucralose com 2mL de acetona, a qual foi evaporada em corrente de N₂ e o extrato foi dissolvido em água até um volume final de 1mL. Foram feitas duas extrações em fase sólida para cada amostra (n=2), realizadas por dois analistas (R=2).

Estas amostras assim purificadas foram filtradas em unidades filtrantes Durapore HV de 0,45µm (Millipore) e analisadas por CLAE-IR. As injeções de cada extração foram realizadas em triplicata tanto para as amostras como para as soluções-padrão.

Recuperação

Foi feito o estudo de recuperação adicionando-se quantidade conhecida de sucralose em dois néctares, sendo um de manga e um de goiaba que já continham este edulcorante em sua formulação, o valor adicionado foi de 4,5mg.100mL⁻¹ a cada néctar. Foi também adicionado 8 mg.100mL⁻¹ de sucralose ao néctar de uva que não continha edulcorante. As amostras utilizadas no estudo de recuperação também foram centrifugadas, extraídas e purificadas nas colunas de EFS conforme já descrito, e efetuadas por dois analistas.

Para a quantificação da sucralose foi adotado o método de padronização externa, calculando-se a sua concentração através da curva analítica dos padrões de 5 a 20mg.100mL⁻¹.

Análise estatística

Na construção da curva analítica entre área dos picos cromatográficos e concentração das soluções padrão, aplicou-se a análise de regressão linear simples, onde foi realizada uma análise de variância (ANOVA) e construídos os intervalos de confiança e predição no nível de 95% de confiança. Para a análise estatística empregou-se o pacote estatístico Minitab for Windows, v. 13.31 (2000)^{24, 25}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método adotado para as condições cromatográficas foi o de Kimura et al.²³. Para as amostras de néctares de fruta “light” houve a necessidade de se realizar uma centrifugação prévia para que fosse retirada a parte insolúvel, seguida da passagem do sobrenadante no cartucho de EFS C18 que complementaria a remoção de outras impurezas.

Os trabalhos que mencionam o emprego de cartuchos de EFS C18 em outros tipos de matrizes de alimentos não incluem o néctar^{15,17,20}, sendo assim, na utilização dos cartuchos de EFS C18 foram otimizadas as condições de eluição com os solventes acetonitrila, água e acetona, e volumes de lavagens 3mL, 6mL e 2mL, respectivamente.

Para a construção da curva analítica foram realizadas as mesmas condições de preparo de amostra, ou seja, as soluções-padrão foram passadas em cartuchos de EFS, porém sem a etapa da centrifugação. A curva analítica estabelecida foi linear na faixa de trabalho escolhida, de 0 a 20mg.100mL⁻¹. Isto pode ser observado pelo alto valor do coeficiente de determinação R²= 0,993 e os intervalos de confiança e predição, no nível de 95% de confiança, com limite de detecção (LOD) de 1,7mg.100mL⁻¹ e limite de quantificação (LQ) de 5,9mg.100mL⁻¹, indicando homogeneidade de variância em toda a faixa estudada (Tabela 1 e Figura 1), sugerindo que o método por EFS foi eficaz.

Para a verificação da existência de possíveis substâncias interferentes no mesmo t_R da sucralose (o tempo de retenção médio foi de 6,8min) foram analisadas 6 amostras de néctares com os mesmos sabores que não continham sucralose na sua formulação (branco). Os cromatogramas destas amostras não apresentaram picos interferentes neste tempo de retenção mostrando que não houve efeito de matriz, com exceção do néctar de uva que teve um composto eluído no mesmo t_R da sucralose, sugerindo que devido à sua composição, o método proposto de extração não permitiu eliminar este componente (Figura 2).

Tabela 1. Análise estatística empregada na regressão linear no nível de 95% de confiança e equação da reta.

Edulcorante	F _{reg} *	p	R ²	Equação da reta	LOD (mg.100mL ⁻¹)	LQ (mg.100mL ⁻¹)
Sucralose	2882,5	0,000	0,993	y= 22761,0 x	1,7	5,9

*- Valor do F de regressão F_(1;18;0,05) = 4,41

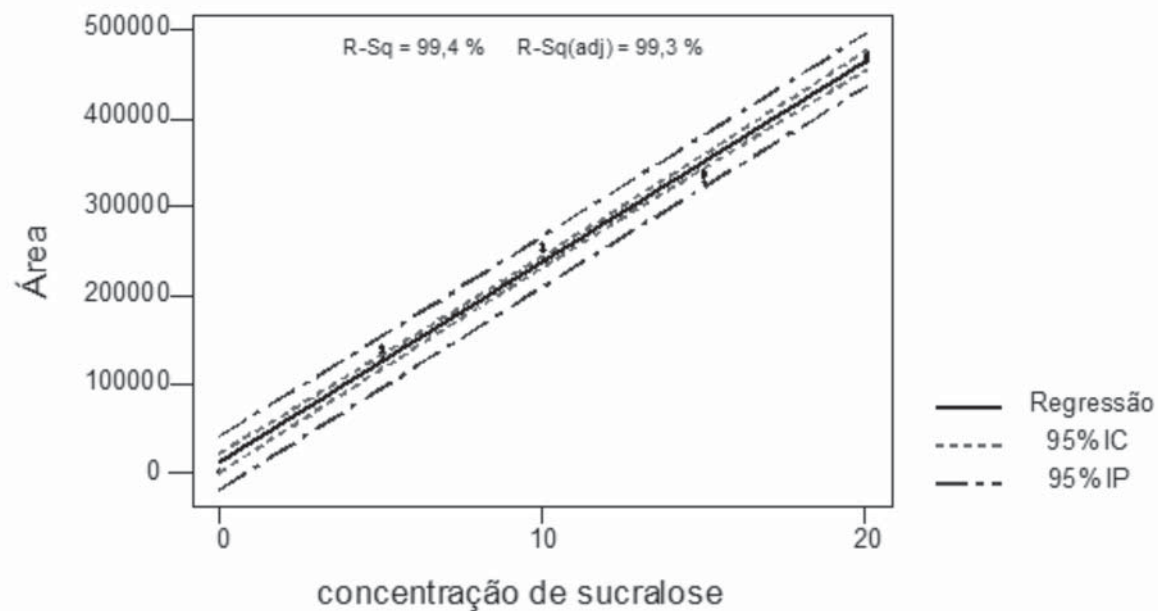


Figura 1. Curva analítica da sucralose ($\text{mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) obtida por CLAE-IR. Cada ponto é a média de três medidas. IC - intervalo de confiança e IP – intervalo de predição a 95% de confiança.

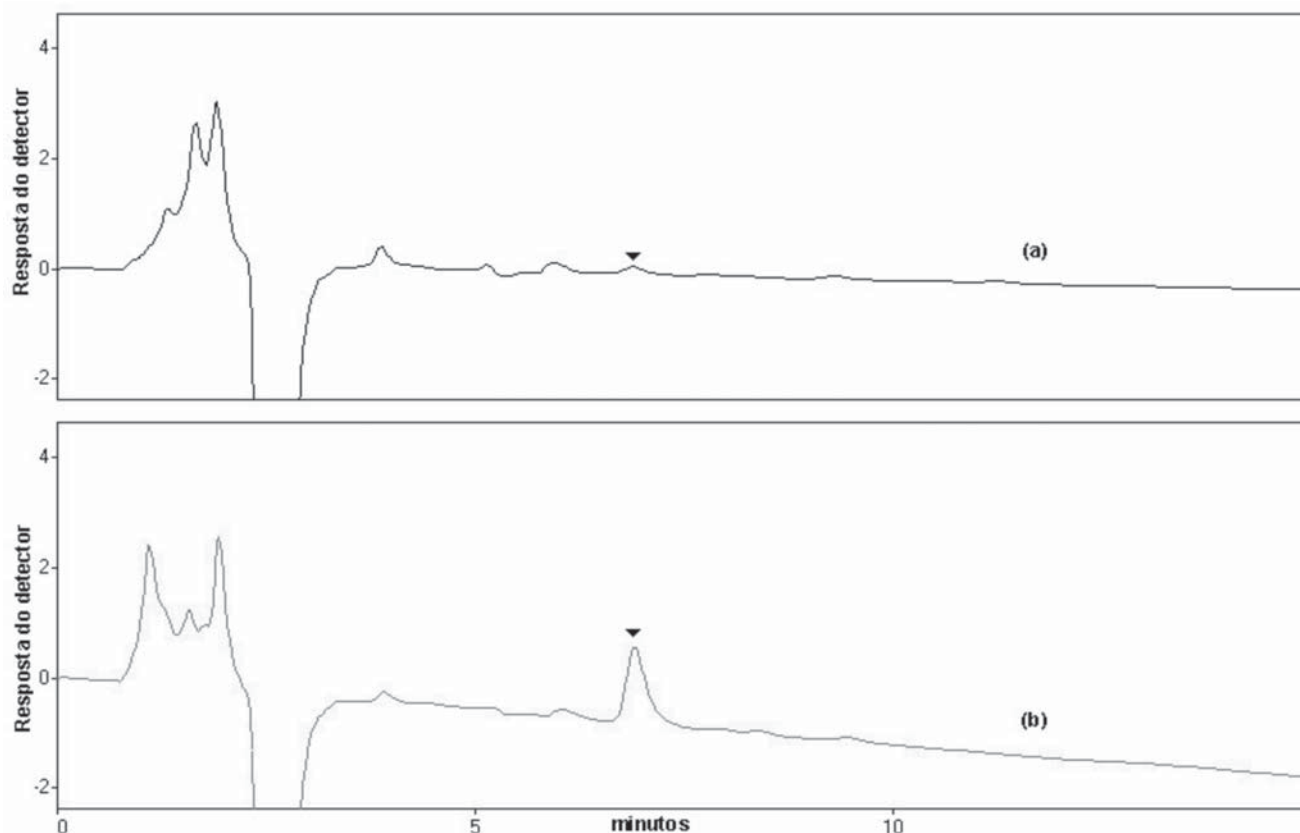


Figura 2. Cromatogramas obtidos por CLAE-IR do néctar de uva, após centrifugação e extração em cartuchos de EFS: (a) sem adição de sucralose (o símbolo ▼ indica o composto que tem o mesmo t_R da sucralose), (b) com adição de sucralose (o mesmo símbolo indica a sucralose).

Para verificar a eficiência do método proposto para a determinação de sucralose em néctar “light” foi realizado o estudo da recuperação deste edulcorante, sendo escolhidas duas matrizes contendo sucralose (manga e goiaba) e uma de uva que não continha sucralose (Tabela 2).

Tabela 2. Dados de recuperação (%) de sucralose

Néctar “light”	Recuperação (%)*
Manga	105 ± 2
Goiaba	105 ± 2
Uva	103 ± 2

*Média ± Desvio Padrão (nxR=4), n=n° de replicas e R=n° de analistas

Observando-se a Tabela 2 verifica-se que os valores de recuperação variaram de 103 a 105 % e apresentaram baixo desvio padrão, indicando que tanto o preparo da amostra como as condições cromatográficas adotadas para este trabalho foram eficientes e tiveram boa reprodutibilidade, e que não foram afetadas por erros proporcionais ou constantes significativos em relação à curva analítica obtida. Para o néctar de uva que apresentou um composto no mesmo t_r da sucralose foi efetuada uma correção nos cálculos, subtraindo-se a área obtida do

branco. Este procedimento deve ser feito para todas as marcas de néctar de uva.

A seguir efetuou-se a análise das amostras dos néctares de frutas “light”. Na Figura 3 podemos observar os cromatogramas para cada sabor.

Verificam-se nos cromatogramas das diversas matrizes de néctares de frutas “light” (Figura 3) que, através da prévia centrifugação da parte polposa do néctar seguida da EFS houve uma melhora no perfil cromatográfico, ou seja, os picos dos compostos interferentes que apareceram na frente do solvente diminuíram indicando que as etapas empregadas foram satisfatórias na limpeza das amostras dos diversos néctares.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados encontrados do edulcorante sucralose em 14 amostras de néctares “light” discriminados por sabor de diversas marcas adquiridas no comércio.

Apesar de existirem marcas com formulações diversas os resultados de sucralose obtidos estão coerentes com os declarados nos respectivos rótulos, indicando que a faixa de concentração estudada está de acordo com a variação encontrada nos néctares de frutas “light” comercializados.

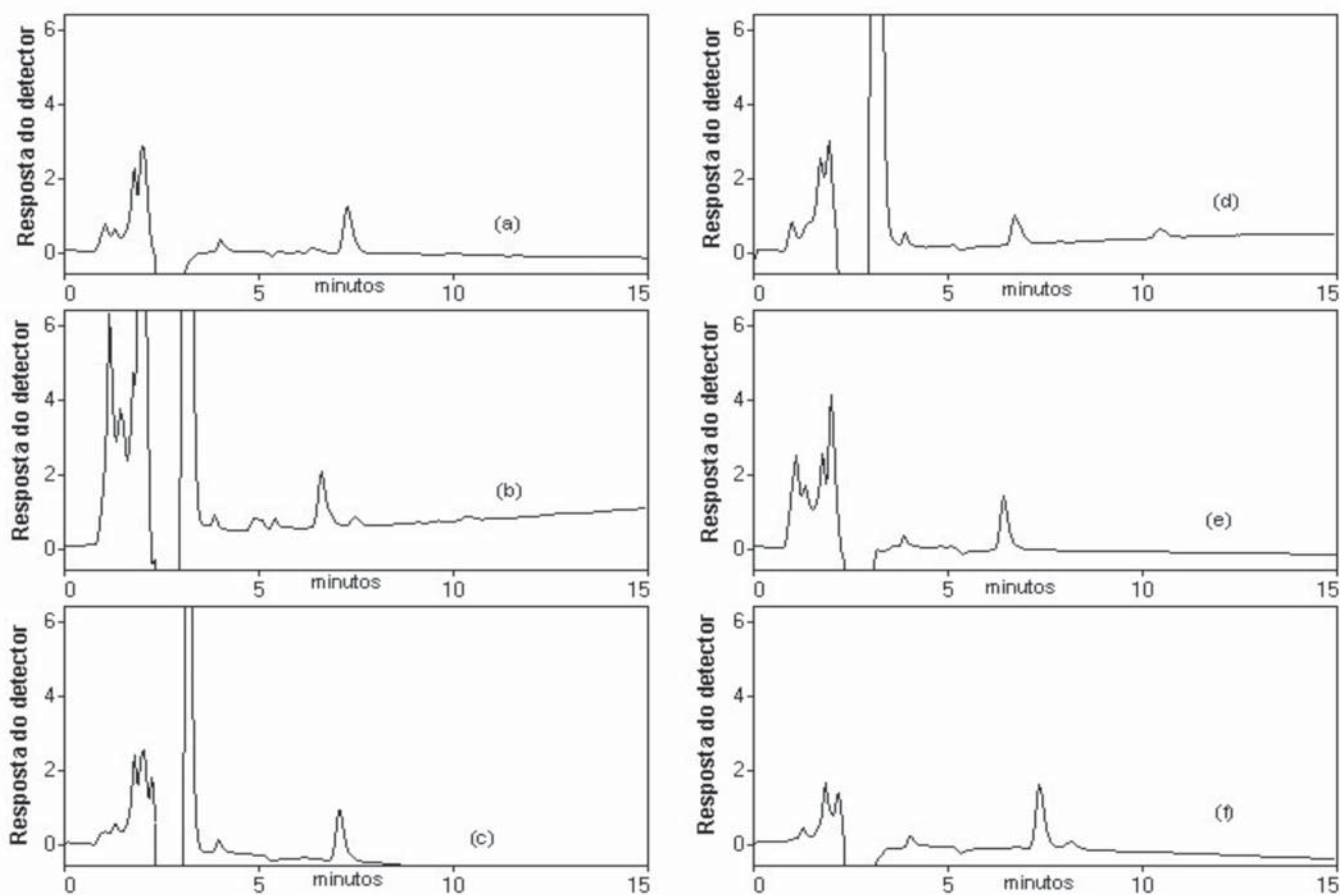


Figura 3. Cromatogramas obtidos por CLAE-IR das diversas matrizes de néctar “light”, após centrifugação e extração em cartuchos de EFS, t_r médio da sucralose, 6,84min: (a) uva, (b) pêssego, (c) morango, (d) manga, (e) goiaba, (f) maracujá.

Tabela 3. Teores médios de sucralose (mg.100mL⁻¹) encontrados nas amostras de néctares “light”.

Néctar “light”	Sucralose*	Teor declarado
Goiaba marca 1	10,3 ± 0,1	9
Goiaba marca 2	9,9 ± 0,4	8,03
Manga marca 1	9,5 ± 0,4	9
Manga marca 2	5,8 ± 0,1	5,6
Manga marca 4	13,3 ± 0,1	13
Maracujá marca 2	14,8 ± 0,1	16,6
Maracujá marca 4	12,8 ± 0,2	14
Morango marca 3	10,7 ± 0,9	12
Pêssego marca 1	11,2 ± 0,2	9
Pêssego marca 2	5,7 ± 0,2	6
Pêssego marca 4	9,9 ± 0,4	10
Uva marca 1	9,2 ± 0,2	9
Uva marca 2	5,8 ± 0,1	5,7
Uva marca 4	12,5 ± 0,8	12

* Média ± Desvio Padrão (nR=4) , n=nº de replicas e R=nº de analistas

CONCLUSÕES

Como as amostras de néctares “light” de diversas frutas possuem matrizes diferenciadas e complexas verificou-se a necessidade do emprego de duas etapas no preparo das amostras (centrifugação e extração em fase sólida) para a análise de sucralose. No caso das amostras de néctar “light” sabor uva foi necessário efetuar uma correção da quantidade de sucralose em relação ao branco, devido à presença de um composto eluído no mesmo tempo de retenção. Para amostras de sabores diferentes aos estudados neste trabalho recomenda-se um estudo prévio da matriz.

Através dos valores obtidos na curva analítica dos padrões de sucralose, observou-se que o modelo gerado foi linear em toda a faixa de trabalho estudada quando se empregou a extração em fase sólida.

A extração em fase sólida utilizada neste trabalho mostrou ser uma técnica relativamente simples empregando pequenos volumes de solventes e pequenas quantidades de amostra e foi seletiva para este edulcorante.

Os valores de recuperação foram satisfatórios, em torno de 100%, indicando que este método é adequado para a análise de sucralose em néctares de frutas “light”.

O método proposto mostrou-se eficiente, sensível e rápido, uma vez que permite a extração de várias amostras simultaneamente, podendo ser aplicada na rotina dos laboratórios.

REFERÊNCIAS

1. Miller GA. *Alternative Sweeteners*, New York: Marcel Dekker, Inc.;1991. p.173-95.
2. Wallis KJ. Sucralose: features and benefits. *Food Australia* 1993;45(12):578-80.
3. Frank G. Sucralose: an overview. Disponível em: <http://www.kon.org/urc/frank.html>. Acesso em jan 2006.
4. Sälzer K, Manczyk C. Reformulando as regras: novas opções em sistemas edulcorantes. *Food Ingredients*. 2003;24:50-2.
5. International Food Information Council Foundation. Everything you need to know about sucralose. Disponível em: <http://ific.org/publications/brochures/sucralosebroch.cfm>. Acesso em jan 2006.
6. Binns NM. Sucralose - all sweetness and light. *Nutrition Bulletin* 2003; 28(1):53–58. Disponível em: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1046/j.1467-3010.2003.00307.x?journalCode=nbu&volume=28&issue=1>. Acesso em jul 2005.
7. European Parliament and Council Directive 94/35/EC of 30 June 1994 on sweeteners for use in foodstuffs. *OJ L* 237, 10.9.1994;3–12. Disponível em: <http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/lvb/l21069.htm>. Acesso em jan 2006.
8. Scientific Committee on Food. Opinion of the Scientific Committee on Food on Sucralose. SCF/CS/ADDS/EDUL/190 Final. Disponível em: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out68_en.pdf. Acesso em jan 2006.
9. 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 União*, Brasília, DF, 28 nov. 1995. Seção 1, no 227, 19406.
10. 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 União*, Brasília, DF, 5 jan. 2001. Seção 1, no 4, p.39-40.
11. Brasil. Decreto nº 2314, de 04/09/1997. Regulamenta a Lei nº 8918, de 14/07/1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 5 set. 1997. Seção 1, p.19549-19560.
12. Brasil. Instrução Normativa nº 12, de 04/09/2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [Aprova o Regulamento Técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade gerais para suco tropical e os padrões dos néctares]. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 9 set. 2003. Seção 1, p. 2-5.
13. Zhao RR., Johnson BP. Capillary electrochromatography: analysis of sucralose and related carbohydrate

- compounds. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2000; 23(12): 1851-7.
14. Stroka J, Dossi N, Anklam E. Determination of the artificial sweetener sucralose by capillary electrophoresis. *Food Addit Contam.*2003;20(6):524-7.
 15. McCourt J, Stroka J, Anklam E. Experimental design-based development and single laboratory validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of the artificial sweetener sucralose in food matrices. *Anal Bioanal Chem.* 2005; 382: 1269-78.
 16. 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.
 17. Quinlan ME, Jenner MR. Analysis and stability of the sweetener sucralose in beverages. *J Food Sci.*1990; 55(1):244-6.
 18. Spangenberg B, Stroka J, Arranz I, Anklam E. A simple and reliable HPTLC method for the quantification of the intense sweetener sucralose. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2003; 26(16):2729-39.
 19. Hanko VP, Rohrer JS. Determination of sucralose in Splenda and a sugar-free beverage using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J Agric Food Chem.* 2004; 52: 4375-9.
 20. Kishi H, Kawana K. Determination of sucralose in foods by anion-exchange chromatography and reverse-phase chromatography. *Shokuhin-Eiseigata-Zasshi.*2001; 42(2):133-8.
 21. Committee on Food Chemicals Codex – Food Chemicals Codex. 4^a ed. Washington D. C.: National Academic Press; 1996. p. 398-400.
 22. JECFA-Joint Fao/Who Expert Committee on Food Additives - Compendium of Food Additive Specifications. Rome, 1992. p. 1535-6.
 23. Kimura IA, Cano CB, Nagato LAF., Martins MS. Análise de sucralose por cromatografia líquida de alta eficiência em refrigerante dietético e adoçante de mesa. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2005;64(2):200-4.
 24. MINITAB for windows,[Minitab- Inc, USA.] Versão. 13.31 .2000. CD-rom.
 25. Barros Neto B, Scarminio IS, Bruns RE. Planejamento e Otimização de Experimentos. Campinas: Unicamp; 2002.401 p.