



ISEL

**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA**

Otimização e validação de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para a determinação do edulcorante ciclamato. Ocorrência em adoçantes de mesa.

BRUNO RUELA SARGAÇO
(Licenciado)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

(Documento Provisório)

Orientadores:

Doutora Elsa Reis Vasco
Doutora Maria Celeste Serra

Júri:

Doutor José Augusto Paixão Coelho
Doutor Manuel José Matos
Doutora Sónia Alexandra Martins

DEZEMBRO DE 2013



ISEL

**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**Otimização e validação de um método de
cromatografia líquida de alta resolução
(HPLC) para a determinação do edulcorante
ciclamato. Ocorrência em adoçantes de
mesa.**

BRUNO RUELA SARGAÇO
(Licenciado)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

(Documento Provisório)

Orientadores:

Doutora Elsa Reis Vasco
Doutora Maria Celeste Serra

Júri:

Doutor José Augusto Paixão Coelho
Doutor Manuel José Matos
Doutora Sónia Alexandra Martins

DEZEMBRO DE 2013

RESUMO

Atualmente o ciclamato constitui um dos edulcorantes intensos mais consumidos na União Europeia. A não existência de um limite máximo de utilização deste edulcorante em adoçantes de mesa realça a importância de desenvolver métodos analíticos robustos para a determinação do seu teor, e de perceber se o seu consumo pode ter um impacto negativo na saúde humana.

O presente trabalho teve por objetivo a otimização e validação de um método analítico de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para a determinação de ciclamato em adoçantes de mesa, tendo por base o procedimento da Norma Europeia, EN 12857. O método validado foi depois aplicado na determinação do edulcorante em diferentes tipos de adoçantes de mesa (líquidos, granulado e em comprimidos).

Tanto as soluções padrão como as soluções das amostras foram sujeitas a um procedimento de derivatização que converteu o ciclamato em N,N-diclorociclohexilamina. Este produto derivatizado foi separado e quantificado utilizando uma coluna de fase reversa, uma fase móvel composta por água (20%) e metanol (80%), eluição isocrática, fluxo de 1mL/min, e uma deteção por espectrofotometria ultravioleta (UV) a um comprimento de onda de 314 nm.

O método analítico foi validado internamente de acordo com os seguintes parâmetros de validação: gama de trabalho, linearidade, especificidade, sensibilidade, precisão (repetibilidade e precisão intermédia), limite de deteção e de quantificação.

O método provou ser específico e seletivo para a determinação deste edulcorante nas amostras em estudo, apresentando uma repetibilidade, $CV_r \leq 3\%$, e precisão intermédia, $CV_R \leq 3,3\%$, e taxas de recuperação que variaram entre os 92 e 108% para os diferentes adoçantes de mesa analisados.

Os teores de ciclamato variaram significativamente, tendo-se situado no intervalo de 2,9 a 73,9%, o que permitiu verificar que um consumo excessivo de um dos adoçantes analisados pode traduzir-se no incumprimento da dose diária admissível deste edulcorante.

Palavras-chave: Ciclamato de sódio, adoçantes de mesa, validação, cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

ABSTRACT

Nowadays cyclamate is one of the most consumed intense sweeteners in the European Union. The absence of a maximum limit for the use of this sweetener in tabletop sweeteners and the growing demand for this type of products highlights the importance of developing robust analytical methods for the determination of their content, and to understand if their consumption may have a negative impact on human health.

The present work aimed at the optimization and validation of an analytical method of high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of sodium cyclamate in tabletop sweeteners, based on the procedure of the European Standard EN 12857. The validated method was, after, applied to the determination of this sweetener in different types of tabletop sweeteners (liquid, powder and tablets).

Both standards and samples solutions were submitted to a derivatization procedure which converted cyclamate in N,N-dichlorocyclohexilamine. The derivatized product was separated and quantified using a reversed phase column, a mobile phase composed of water (20%) and methanol (80%), isocratic flow of 1mL/min, and detection by ultraviolet spectrophotometry (UV) to a wavelength of 314 nm.

The analytical method was internally validated according to the following validation parameters: working range, linearity, sensitivity, precision (repeatability and intermediate precision), limit of detection and of quantitation.

This method proved to be specific and selective for the determination of this sweetener, showing a repeatability, $RSD_r \leq 3\%$, and intermediate precision, $RSD_R \leq 3.3\%$, and recovery rates from 92 to 108% for the different tabletop sweeteners.

The concentration of cyclamate varied significantly, from 2.9 to 73.9%, which has shown that a possible excessive consumption of one of the analyzed sweeteners can lead to the exceeding of the acceptable daily intake for cyclamate.

Key-words: sodium cyclamate, tabletop sweeteners, validation, High performance liquid chromatography (HPLC).

AGRADECIMENTOS

Este trabalho esteve inserido no Projeto Nacional MONITADITIVES, financiado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP, ao qual devo um enorme agradecimento por me ter proporcionado esta experiência que tanto me enriqueceu a nível pessoal e profissional.

Ao longo do seu desenvolvimento e dos vários meses de estágio envolvidos foram várias as pessoas que tiveram um contributo importante para que se concretizasse da melhor forma possível, e às quais são dirigidos os meus grandes agradecimentos.

Gostaria de começar por agradecer às minhas orientadoras, Doutora Elsa Reis Vasco e Doutora Maria Celeste Serra, cujo apoio, aconselhamento, disponibilidade e preciosas orientações foram, não só, fundamentais mas também motivadoras e amigas.

Queria igualmente deixar uma palavra de apreço à Doutora Maria Antónia Calhau, Coordenadora do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do INSA, IP, a quem agradeço pela forma afável como me recebeu.

Por último, mas sem menor importância, não podia também deixar de transmitir um pequeno, grande obrigado à minha colega e melhor amiga Diana Parreira, que me apoiou sempre, independentemente do meu humor, receios e indecisões. De igual modo, o meu afeto especial vai para o apoio dado pelos meus pais e irmão que, embora esteja sempre presente, nunca deixou de ser menos importante e que sempre me ajudou nos momentos bons e maus da vida.

ÍNDICE

Resumo	i
Abstract	ii
Agradecimentos	iii
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Termos.....	x
1. Enquadramento do Tema	1
2. Introdução.....	2
2.1. Edulcorantes.....	2
2.2. Edulcorantes Intensos	5
2.2.1. Vantagens e benefícios	5
2.2.2. O edulcorante ideal.....	6
2.3. Regulamentação de Edulcorantes Intensos.....	8
2.3.1. Processo de aprovação	9
2.3.2. Estabelecimento da dose diária admissível	9
2.4. Ciclamato (E952): Caracterização e Aplicações	10
2.4.1. Processo de produção.....	12
2.4.2. Caracterização físico-química e sensorial.....	12
2.4.3. Potencial de mistura	16
2.4.4. Principais aplicações	17
2.4.5. Metabolismo do ciclamato	18
2.4.6. Efeitos toxicológicos do ciclamato e seus derivados.....	20
2.4.7. Aspetos da regulamentação do ciclamato	21
2.5. Avaliação da Ingestão de Edulcorantes	23
2.6. Métodos de Análise do Ciclamato.....	24
2.7. Fundamentos de HPLC	27
2.7.1. Modos de separação	28
2.8. Validação do Método de Análise.....	29
3. Objetivos do Trabalho.....	38
4. Materiais e Métodos	39
4.1. Equipamento	39
4.2. Reagentes	40
4.3. Soluções.....	41
4.4. Amostras	42

4.5.	Procedimento Analítico	42
4.5.1.	Preparação das amostras.....	42
4.5.2.	Procedimento de derivatização.....	44
4.5.3.	Preparação das soluções padrão de calibração	45
4.5.4.	Diluição das amostras	45
4.5.5.	Condições cromatográficas	47
4.5.6.	Identificação e quantificação do analito	47
4.6.	Etapas de Validação do Método	48
4.7.	Estudos de Precisão	49
4.8.	Exatidão.....	50
4.9.	Testes Estatísticos.....	50
5.	Resultados e Discussão	51
5.1.	Otimização do Procedimento Analítico	52
5.1.1.	Preparação das soluções padrão	52
5.1.2.	Tempo de corrida cromatográfica	53
5.1.3.	Volume de injeção	54
5.1.4.	Fluxo de fase móvel.....	55
5.1.5.	Composição da fase móvel.....	56
5.1.6.	Temperatura da coluna.....	56
5.1.7.	Comprimento de onda de deteção.....	57
5.2.	Validação do Método	58
5.3.	Estabilidade das Soluções Derivatizadas.....	71
5.4.	Análise das Amostras de Adoçantes de Mesa	74
5.4.1.	Estudo da homogeneidade	80
5.5.	Impacto na Exposição Alimentar.....	83
6.	Conclusão.....	86
7.	Sugestões de Trabalho Futuro.....	88
8.	Referências Bibliográficas	89
ANEXOS.....		99
Anexo 1.....		100
Anexo 2.....		101
Anexo 3.....		102
Anexo 4.....		104
Anexo 5.....		105
Anexo 6.....		106
Anexo 7.....		107

Anexo 8.....	108
Anexo 9.....	109
Anexo 10.....	110
Anexo 11.....	111
Anexo 12.....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Classificação dos edulcorantes.....	3
Figura 2.2 - Exemplo de esquema reacional da produção de ácido ciclâmico.....	12
Figura 2.3 - Esquema reacional da conversão do ácido ciclâmico em ciclohexilamina.	19
Figura 2.4 - Reação de derivatização do ácido ciclâmico.....	26
Figura 2.5 - Esquema representativo dos principais componentes de um sistema de HPLC.....	27
Figura 4.1 - Representação do procedimento para a análise das amostras em triplicado	43
Figura 4.2 - Fluxograma do procedimento analítico de preparação de soluções para introdução no sistema de HPLC.....	46
Figura 5.1 - Cromatograma de uma solução padrão com um volume de injeção de 10 μ L	54
Figura 5.2 - Cromatograma de uma solução padrão com um volume de injeção de 20 μ L	54
Figura 5.3 - Cromatograma de uma solução padrão com um fluxo de fase móvel de 1,4 mL/min.....	55
Figura 5.4 - Curvas de calibração para a validação do método.....	61
Figura 5.5 – Percentagem dos resíduos nos diferentes pontos das curvas de calibração	62
Figura 5.6 – Procedimento esquemático para a verificação do LQ	65
Figura 5.7 - Cromatograma de uma amostra sem ciclamato.....	67
Figura 5.8 - Cromatograma de uma amostra com adição padrão de ciclamato.....	67
Figura 5.9 - Cromatograma de uma amostra de adoçante de mesa granulado	74
Figura 5.10 - Teor de ciclamato de sódio nos diferentes adoçantes de mesa	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Poder adoçante e teor calórico de edulcorantes nutritivos e não nutritivos.	4
Tabela 2.2 - Comparação entre o conteúdo calórico de produtos alimentares com açúcar e com edulcorantes intensos.....	5
Tabela 2.3 - Poder adoçante cumulativo e sinérgico obtido em adoçantes de mesa através da combinação de edulcorantes intensos.....	7
Tabela 2.4 - Propriedades do ácido ciclâmico e respetivos sais.....	13
Tabela 2.5 - Perda de ciclamato em solução aquosa durante uma hora a 100°C consoante a variação do pH	14
Tabela 2.6 - Sinergia resultante da mistura de ciclamato com outros edulcorantes	17
Tabela 4.1 - Reagentes utilizados e especificações do fabricante	40
Tabela 4.2 - Adoçantes de mesa analisados e respetiva composição	42
Tabela 4.3 - Procedimento de derivatização e respetivos volumes de reagentes e tempos de agitação para as soluções padrão de calibração e amostras.....	44
Tabela 4.4 - Condições cromatográficas na análise de ciclamato	47
Tabela 4.5 - Parâmetros de validação do método e respetivos procedimentos.....	49
Tabela 5.1 - Gamas de trabalho testadas	58
Tabela 5.2 - Intensidade do sinal das dez réplicas de cada padrão e respetiva variância (S_i^2).....	59
Tabela 5.3 - Valores de PG para as três réplicas da curva de calibração	60
Tabela 5.4 - Valores da sensibilidade do método, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV). U_a – unidades de absorvância	62
Tabela 5.5 - Concentração média, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) do primeiro padrão definido como LQ, em dez ensaios realizado.	64
Tabela 5.6 - Valores dos ensaios de recuperação para verificação do LQ e LD	66
Tabela 5.7 - Limites do método para cada matriz de amostra analisada.....	66
Tabela 5.8 - Valores das concentrações médias obtidas e respetivos coeficientes de variação para a repetibilidade e precisão intermédia	69
Tabela 5.9 - Valores da intensidade do sinal para as dez réplicas de cada padrão, média, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV).....	70
Tabela 5.10 - Concentração de ciclamato de sódio e taxas de recuperação determinadas no ensaio interlaboratorial	71
Tabela 5.11 - Estabilidade das soluções padrão derivatizada.....	72
Tabela 5.12 - Concentração das soluções <i>stock</i> adicionais preparadas e respetivos volumes adicionados à solução de recuperação para cada amostra	75

Tabela 5.13 - Teores e taxas de recuperação de ácido ciclâmico e de ciclamato de sódio	76
Tabela 5.14 - Teor (%) em ciclamato de sódio dos adoçantes de mesa analisados....	78
Tabela 5.15 - Valores de F e $F_{\text{crítico}}$ para a homogeneidade no mesmo lote	81
Tabela 5.16 - Valores de F e $F_{\text{crítico}}$ para a homogeneidade entre lotes.....	82
Tabela 5.17 - Quantidade de adoçante de mesa necessário para atingir a DDA de ciclamato	84

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E TERMOS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BCR	<i>Bureau Communautaire de Références</i>
CE	Comissão Europeia
CEN	Comité Europeu de Normalização
CV	Coeficiente de Variação
DDA	Dose Diária Admissível
DMU	Doses Máximas utilizáveis ou teor máximo de utilização
EFSA/AESA	European Food Safety / Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
EN	<i>European Norm</i>
EUA	Estados Unidos da América
F	Valor estatístico determinado
FAPAS	<i>Food Analysis Performance Assessment Scheme</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization /</i> Organização para a Agricultura e Alimentação
FDA	Food and Drug Administration
FIA	Análise por Injeção em Fluxo
GRAS	Generally Recognized As Safe
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Resolução Comité Conjunto de Peritos da FAO/OMS para os Aditivos Alimentares
JECFA	Joint expert Committee from the Food and Agriculture Organization and the World Health Organization on Food Additives
LQ	Limite de Quantificação
LD	Limite de Detecção
MS	Espectrometria de Massa
MRC	Materiais de Referência Certificados
NOAEL	No Observed Adverse effect Level / Nível de Efeito Adverso não Observado
NP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Resolução em Fase Normal
RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Resolução em Fase Reversa
OMS	Organização Mundial de Saúde
PG	Valor estatístico determinado
EU	União Europeia
SCF	Scientific Committee on Food (of the European Commission)

1. ENQUADRAMENTO DO TEMA

Atualmente existe uma ampla oferta de diferentes produtos alimentares contendo edulcorantes intensos não calóricos que constituem uma alternativa atrativa ao consumo de açúcar. As bebidas aromáticas à base de água e os adoçantes de mesa constituem as suas principais aplicações ^[1].

De todas as categorias alimentares aprovadas para a incorporação de ciclamato e outros edulcorantes intensos, os adoçantes de mesa são a única categoria para a qual não existe um limite máximo de utilização nem uma obrigatoriedade de inclusão do respetivo teor na rotulagem ^[2,3].

Os produtores alimentares podem, assim, utilizar as quantidades que acharem necessárias e vantajosas para a formulação de um determinado adoçante de mesa. Este tipo de produtos tem como princípio de aplicação o seu uso em pequenas quantidades para a obtenção de uma elevada doçura em alimentos e bebidas. Consequentemente, os edulcorantes intensos encontram-se em concentrações substancialmente superiores nos adoçantes de mesa comparativamente com qualquer outro tipo de produto alimentar.

Este facto pode gerar riscos indiscutíveis para a saúde humana uma vez que a dose diária admissível (mg/kg de peso corporal/dia), estabelecida pelas entidades reguladoras para a ingestão dos diferentes edulcorantes intensos, corre o risco de ser ultrapassada em caso de consumo excessivo ou não adequadamente informado.

A ingestão excessiva de ciclamato através deste tipo de produtos constitui uma situação real, uma vez que este é o edulcorante intenso mais produzido a nível mundial e é utilizado em quantidades mais elevadas nas misturas em que é adicionado, em relação a outros edulcorantes presentes ^[4,5].

Deste modo, a otimização e validação de métodos analíticos fiáveis e robustos que permitam a determinação de ciclamato neste tipo de produtos alimentares possui uma elevada importância. Permitem determinar com precisão e rigor o seu teor e avaliar a sua variação em diferentes marcas e em diferentes lotes da mesma marca, o que se torna necessário devido à “liberdade” que os produtores alimentares têm na formulação de adoçantes de mesa.

Estas determinações são essenciais para os estudos de avaliação da exposição ao ciclamato e à reavaliação da respetiva legislação pelas entidades reguladoras.

2. INTRODUÇÃO

2.1. Edulcorantes

Desde meados do século XX até à atualidade tem vindo a aumentar de forma gradual uma conscientização por parte da sociedade relativa à manutenção da sua saúde e qualidade de vida. Este comportamento tem sido, em grande parte, motivado por um maior acesso à informação sobre os efeitos prejudiciais que os maus hábitos alimentares podem ter e pelo aumento “epidémico” da obesidade e do desenvolvimento de doenças crónicas, como os diabetes ^[6,7].

Os consumidores são aconselhados e têm vindo a procurar, cada vez mais, reduzir ou evitar o consumo excessivo de determinados ingredientes, como o açúcar. Embora este comportamento de consumo seja especialmente verificado em subgrupos populacionais com restrições alimentares específicas (ex: diabéticos), atualmente e já há muitos anos que começou a ser um comportamento característico do consumidor comum ^[8].

A indústria alimentar, também responsável por esta alteração nos hábitos alimentares, tem investido significativamente na formulação de alimentos e bebidas com propriedades funcionais que possibilitem obter um produto final sem adição ou com baixo teor de açúcar, mas com um sabor doce equivalente. Estes produtos são geralmente designados por “light” ou “diet” ^[6].

Estes novos produtos vêm ao encontro da vontade do consumidor em reduzir a sua ingestão de energia sem que deixe de usufruir do sabor doce. A não utilização ou redução de açúcar nos produtos “light” apenas é possível através da sua substituição por aditivos alimentares que compensem as propriedades perdidas pela ausência de açúcar, nomeadamente a doçura. Estes substitutos do açúcar são designados por edulcorantes ^[9].

A crescente procura deste tipo de produtos tem motivado a indústria alimentar a investir na investigação e formulação destes ingredientes, tendo nas últimas três décadas havido um aumento significativo do número de edulcorantes aprovados para consumo ^[10,11].

Os edulcorantes podem ser divididos em dois grupos principais: nutritivos e não nutritivos. A Figura 2.1 apresenta a classificação de alguns dos principais edulcorantes existentes, efetuada de acordo com o seu teor calórico, nutritivos (calóricos) e não nutritivos (não calóricos), e com a sua origem, química (sintéticos) ou natural ^[6,12].

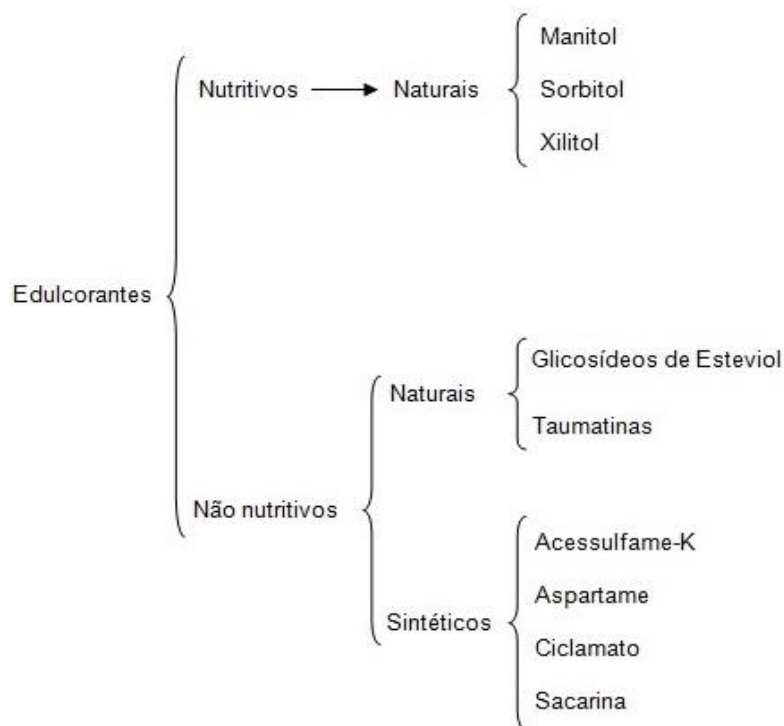


Figura 2.1 - Classificação dos edulcorantes ^[6,12].

Estes dois grupos para além de diferirem a nível do seu teor calórico diferem significativamente ao nível do seu poder adoçante (doçura relativa). Devido ao facto da sacarose ser o açúcar mais utilizado pela indústria, a sua doçura é normalmente utilizada como o padrão de comparação do poder adoçante de edulcorantes ^[6]. Este parâmetro é determinado numa base de peso/massa e é um múltiplo da doçura da sacarose com um poder adoçante igual a um ^[11].

Na Tabela 2.1 é possível observar as diferenças do poder adoçante e teor calórico entre alguns dos edulcorantes nutritivos e não nutritivos.

Tabela 2.1 - Poder adoçante e teor calórico de edulcorantes nutritivos e não nutritivos ^[6,13].

Edulcorantes	Poder adoçante (sacarose = 1)	Teor calórico (Kcal/g)
Nutritivos		
Manitol	0,7	1,6
Xilitol	1	2,4
Sorbitol	0,6	2,6
Não nutritivos		
Sacarina	300	-
Ciclamato	30	-
Aspartame	180	-
Acessulfame-K	200	-
Glicosídeos de esteviol	300	-
Taumatina	3000	-

(-) = Valor pouco relevante.

Os valores do poder adoçante de diferentes edulcorantes presentes na tabela apresentam um carácter relativo. A doçura que é percebida pode depender de vários fatores:

- a composição físico-química do meio no qual o adoçante está presente;
- a concentração em que o adoçante é utilizado;
- a temperatura e pH do produto;
- outros ingredientes presentes;
- a sensibilidade, idade e cultura do consumidor ^[11,14,15].

Os edulcorantes nutritivos embora forneçam calorias ao organismo apresentam algumas características vantajosas, como por exemplo o facto de não promoverem a cárie dentária, possuírem um baixo índice glicémico e fornecerem algumas das propriedades funcionais do açúcar ao alimento (ex: textura). Por outro lado, os edulcorantes não nutritivos para além de possuírem poucas ou nenhuma calorias possuem um poder adoçante muito superior ao da sacarose e por isso são usualmente designados por edulcorantes intensos ^[4].

2.2. Edulcorantes Intensos

Os edulcorantes intensos, embora sejam por vezes considerados como ingredientes modernos pelo consumidor, têm sido utilizados e consumidos há mais de um século. São substâncias que podem ser produzidas sinteticamente a partir de compostos químicos (ex: ciclamato) ou a partir de substâncias naturais (ex: glicosídeos de esteviol) ^[16].

Devido ao seu poder adoçante ser várias vezes superior ao da sacarose, são utilizados em concentrações muito reduzidas nos alimentos e bebidas, permitindo obter um corte significativo nos custos de produção ao mesmo tempo que o seu contributo calórico para o produto alimentar final é praticamente nulo. Deste modo mesmo que possuam algum teor calórico este torna-se irrelevante no produto final no qual foram incorporados ^[4,17].

2.2.1. Vantagens e benefícios

A adição de edulcorantes intensos, isoladamente ou em combinação com outros edulcorantes (ex: nutritivos), resulta numa redução substancial no teor calórico do produto final, como é possível verificar na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Comparação entre o conteúdo calórico de produtos alimentares com açúcar e com edulcorantes intensos ^[18].

Tipo de alimento ou bebida	Conteúdo calórico	
	Alimento ou bebida com açúcar (kcal)	Alimento ou bebida com edulcorante (s) intenso (s) (kcal)
Coca-Cola (330ml)	139	0,7
Bebida frutada (250ml)	184	27
logurte líquido	180	105
logurte de morango	118	84
Geleia de framboesa	80	5
Polpa de laranja	110	5
Chá/café	16 (1 colher de chá)	1 (1 comprimido)

A capacidade de reduzirem substancialmente teor calórico, mas mantendo o sabor doce em diversas aplicações, oferece uma série de vantagens para a saúde do consumidor final, nomeadamente:

- auxiliam no controlo da cárie dentária, uma vez que não são fermentados pelas bactérias presentes na boca, não sendo cariogénicos;
- melhoram a palatabilidade de produtos farmacêuticos, pastas de dentes, loções dentárias e suplementos de flúor, entre outros produtos;
- permitem que o consumidor tenha a possibilidade de controlar o seu peso e a sua dieta de uma forma mais versátil sem que tenha de abdicar da ingestão de alimentos e bebidas doces;
- possibilitam o controlo do teor de açúcar no sangue, resultando numa redução da pressão sanguínea e nos níveis de colesterol e triglicéridos no sangue;
- funcionam como adjuvantes no tratamento da diabetes, permitindo a pessoas que sofrem desta condição usufruírem do sabor doce ^[11,18,19].

2.2.2. O edulcorante ideal

Tendo em conta que a principal propriedade funcional dos edulcorantes intensos num alimento ou bebida, é o sabor doce, a investigação na produção destas substâncias tem por objetivo principal a obtenção de um edulcorante cujo perfil de sabor seja o mais semelhante possível ao da sacarose ^[11]. Para além da importância do perfil, os edulcorantes intensos devem igualmente reunir um conjunto de propriedades que permitam a sua aplicação em diferentes produtos alimentares, em várias condições de fabrico e armazenamento vantajosas e atrativas para os produtores alimentares. Deste modo, o edulcorante intenso ideal deveria apresentar as seguintes características:

- possuir o mesmo perfil de sabor do açúcar;
- possuir teor calórico baixo ou nulo;
- ser fisiologicamente e quimicamente inerte, não tóxico e não carcinogénico;
- possuir uma boa solubilidade aquosa e estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura ^[11,21].

Embora alguns dos edulcorantes atualmente disponíveis possuam algumas destas características, o edulcorante intenso ideal ainda não foi desenvolvido. Esta classe de edulcorantes apresenta ainda algumas limitações, principalmente:

- um atraso na perceção da doçura, um sabor residual desagradável persistente e um perfil de sabor limitado;

- problemas de estabilidade durante o processamento alimentar e/ou armazenagem^[20,21].

Neste contexto, embora possam ser utilizados individualmente, são maioritariamente encontrados em combinações nos produtos alimentares. Isto é justificado, em parte, pelas limitações descritas anteriormente, principalmente a persistência de sabores residuais desagradáveis. A preparação de uma mistura de dois ou mais edulcorantes permite ao produtor alimentar melhorar a solubilidade, a estabilidade e personalizar o sabor e as características da doçura final do produto podendo deste modo responder mais eficazmente às exigências do consumidor^[22].

O facto de cada edulcorante intenso possuir o seu próprio perfil organolético característico, assim como propriedades técnicas e vantagens distintas, permite que a sua combinação, em proporções diferentes, resulte na obtenção das características funcionais e sensoriais desejadas para cada tipo de produto, de acordo com as especificidades dos diversos géneros alimentícios e dos respetivos métodos de processamento^[18].

Outra vantagem importante da realização de misturas consiste numa redução dos custos de produção, comparativamente ao uso de edulcorantes individualmente^[20]. Esta redução nos custos é devida a um efeito sinérgico de doçura criado na junção de dois ou mais destes edulcorantes. Este efeito sinérgico é verificado quando o poder adoçante resultante da mistura é superior à doçura cumulativa de todos os edulcorantes presentes^[11]. Na Tabela 2.3 está apresentado o sinergismo resultante de algumas das principais misturas atualmente realizadas.

Tabela 2.3 - Poder adoçante cumulativo e sinérgico obtido em adoçantes de mesa através da combinação de edulcorantes intensos^[23].

Misturas de edulcorantes	Poder adoçante cumulativo	Poder adoçante obtido
Sacarina + Ciclamato (1:10)	82	114
Aspartame + Acessulfame-K (10:1)	200	303
Sacarina + Aspartame (10:1)	275	500
Sacarina + Ciclamato + Aspartame (2:15:5)	114	227

O sinergismo verificado permite utilizar menores quantidades de cada edulcorante para obter uma determinada intensidade de doçura^[22]. Além de ser benéfico para o

produtor, este sinergismo também permite ao consumidor ingerir, em média, doses mais reduzidas de cada edulcorante. Isto é um facto importante uma vez que, e muito embora todos os benefícios inerentes ao uso de edulcorantes intensos, a sua ingestão em quantidades muito elevadas pode resultar em alegados efeitos adversos para a saúde humana ^[21].

2.3. Regulamentação de Edulcorantes Intensos

Todos os aditivos alimentares são avaliados e reavaliados por várias entidades reguladoras em todo o mundo, antes de serem usados em alimentos ou bebidas. Os edulcorantes intensos, em particular, constituem um dos grupos de ingredientes mais estudados da cadeia alimentar ^[24]. Num contexto internacional os aditivos alimentares são avaliados pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) através do seu Comitê conjunto de peritos, JECFA, e da sua Comissão do *Codex Alimentarius*. Ambos os organismos trabalham em conjunto na definição e harmonização da legislação de segurança de aditivos alimentares de e outras substâncias, aconselhando os Estados Membros das Nações Unidas ^[25].

Na União Europeia (UE) entre 1974 e Março de 2003, a segurança do uso de aditivos alimentares foi regulada pelo Comité Científico da Alimentação Humana (SCF), tendo a partir de Abril de 2003 até à atualidade sido da responsabilidade da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) ^[26].

Esta entidade é responsável por fornecer informação, recomendações científicas e suporte técnico à Comissão da UE e por todas as políticas que direta e indiretamente influenciam a segurança alimentar ^[24].

A legislação relativa ao uso de edulcorantes intensos em produtos alimentares foi pela primeira vez harmonizada em 1994 através da publicação da diretiva 94/35/CE ^[2]. Desde então esta diretiva tem sido regularmente revista tendo sofrido até hoje três alterações, com as diretivas 96/83/CE, 2003/115/CE e 2006/52/CE ^[27,28,29].

Estas diretivas estipulam quais os edulcorantes que podem ser comercializados, a sua quantidade máxima de utilização nos alimentos e fornecem os critérios de pureza que têm de ser cumpridos pelos produtores, assim como informação adicional que tem de constar na sua rotulagem ^[2,27,28,29]. Em 2008 o Parlamento e Conselho Europeu definiram um quadro regulamentar (Regulamento 1333/2008) que visou consolidar

todas as autorizações dos edulcorantes intensos e outros aditivos alimentares num só documento legal^[4].

2.3.1. Processo de aprovação

Os produtores alimentares podem apenas requerer a aprovação de um determinado edulcorante intenso depois de ter sido sujeito a vários testes científicos que assegurem a sua segurança e utilidade. No *dossier* final enviado à EFSA devem constar todos os detalhes técnicos dos resultados obtidos pelos testes realizados^[24].

Deste modo, o processo regulatório para a aprovação de um determinado edulcorante intenso é um processo moroso e de elevados custos associados, tendo um período médio de duração de dez anos^[18].

Durante o processo de aprovação é definido o valor da dose diária admissível (DDA) para cada edulcorante. Após a publicação do parecer científico da EFSA, a Comissão Europeia (CE) elabora uma proposta de autorização para o uso do edulcorante em alimentos e bebidas produzidas nos Países da UE. Só após todas as entidades reguladoras estarem satisfeitas e em concordância acerca da segurança do edulcorante é que a aprovação é promulgada através de uma Diretiva Comunitária Europeia^[18].

Ao aditivo aprovado é atribuído um número “E” (Europa) que atesta a sua segurança para o consumo humano em toda a União Europeia, auxilia a ultrapassar fronteiras linguísticas num mercado tão diverso como o da União Europeia e deve estar discriminado no rótulo de qualquer bebida ou alimento que o contenha. Aos edulcorantes intensos estão atribuídos códigos entre E900-999. Ainda durante este processo é estabelecida a dose máxima utilizável (DMU) em que o edulcorante pode ser utilizado nos diferentes alimentos e bebidas para o qual o seu uso foi aprovado^[16]. Posteriormente são realizadas revisões regulares à segurança dos edulcorantes aprovados, à medida que vão sendo publicados novos pareceres científicos de relevo^[18].

2.3.2. Estabelecimento da dose diária admissível

O valor da DDA de cada edulcorante intenso representa a quantidade que pode ser ingerida diariamente ao longo de toda a vida sem quaisquer riscos para a saúde. Este

valor é expresso em miligrama por quilograma de peso corporal por dia ^[26]. A sua determinação é feita com base na dose máxima que pode ser administrada em animais de laboratório durante toda a sua vida sem que se verifique qualquer tipo de efeito tóxico, “nível de efeito adverso não observado” (NOAEL). Este valor é dividido por um fator de segurança de 100 de modo a cobrir possíveis diferenças entre espécies (ex: rato e homem) e entre grupos populacionais da mesma espécie mais sensíveis à ingestão de edulcorantes, como é o caso de crianças (baixo peso corporal) e idosos ^[30].

Os níveis de utilização máximos estabelecidos para um edulcorante aprovado em cada categoria de alimentos são definidos com o objetivo de que o seu consumo não atinja o valor da DDA. Devido ao facto do valor da DDA de um edulcorante intenso estar relacionado com o tempo de vida humano, existe uma margem de segurança que permite excluir qualquer tipo de problema caso o valor seja excedido durante um curto período de tempo por um determinado indivíduo ou grupo populacional. Esta margem é aceitável desde que o consumo médio durante longos períodos de tempo não ultrapasse a DDA ^[24,31].

Atualmente na UE estão aprovados para uso geral os seguintes edulcorantes intensos: acessulfame-K (E950), aspartame (E951), sal de aspartame-acessulfame-K (E962), ciclamato (E952), neohesperidina DC (E959), sacarina (E954), sucralose (E955), taumatina (E957), neotame (E961) e glicosídeos de esteviol (E960) ^[26].

O ciclamato é o nome do grupo de edulcorantes, que inclui os seguintes compostos: ácido ciclâmico ou ciclohexilsulfâmico, ciclamato de sódio e ciclamato de cálcio. Juntamente com o acessulfame-K, aspartame e sacarina constituem os edulcorantes mais consumidos na UE ^[11].

2.4. Ciclamato (E952): Caracterização e Aplicações

O ciclamato foi descoberto acidentalmente em 1937 por Michael Sveda, um estudante graduado da Universidade do Illinois nos EUA. Em 1939, Sveda obteve a patente deste edulcorante, tendo vendido pouco tempo depois à *DuPont*. Mais tarde em 1947, a patente foi vendida à empresa farmacêutica *Abbot laboratories*, que tinha como objetivo inicial “disfarçar” o sabor amargo de alguns dos seus antibióticos ^[32].

Nos anos seguintes a *Abbot* realizou uma série de estudos toxicológicos em animais para determinar a segurança do produto para consumo humano, de modo a poder submeter a sua aprovação para comercialização às entidades reguladoras. Estes

estudos preliminares concluíram que a ingestão de quantidades razoáveis de ciclamato não apresentava qualquer efeito nocivo à saúde humana ^[33].

Após a análise dos resultados da petição submetida pela *Abbot*, a entidade reguladora *Food Drugs and Administration* (FDA) requereu novos estudos, tendo aprovado o ciclamato para consumo como aditivo alimentar em 1951 nos Estados Unidos da América (EUA). Esta aprovação foi no entanto limitada uma vez que o seu consumo estava apenas indicado para pessoas que necessitassem de restringir a quantidade de açúcar ingerido ^[34].

Antes da comercialização do ciclamato, o único edulcorante disponível no mercado era a sacarina que embora contendo um poder adoçante significativamente superior possuía um sabor residual metálico significativo o que desencorajava muitos produtores alimentares a utilizarem-na nas suas fórmulas alimentares ^[8].

A descoberta do potencial da mistura do ciclamato com a sacarina, e o facto de em 1958 o ciclamato ter sido aprovado e incluído na lista de ingredientes alimentares GRAS (“*generally recognized as safe*”) pela FDA resultou num enorme desenvolvimento de mercado para este edulcorante numa vasta gama de produtos dietéticos nos EUA e posteriormente na UE. A utilização deste edulcorante deixou de apresentar qualquer tipo de limitação após ter sido aprovado para consumo geral ^[35].

O ciclamato contribuiu decisivamente para o impulsionar deste segmento de mercado e para a mudança de perceção por parte do consumidor em relação ao consumo de produtos alimentares dietéticos, que até à data eram maioritariamente vistos como apenas úteis e atrativos para pessoas com problemas de diabetes ^[36].

Não obstante os vários estudos realizados ao longo dos anos que atestaram a segurança da ingestão de ciclamato, um estudo controverso relativo à sua toxicidade em ratos, publicado em 1969, originou a interdição do edulcorante nos EUA nesse mesmo ano. Nessa altura as suas vendas e aplicações em diversos produtos alimentares registavam um crescimento muito significativo ^[35].

A interdição nos EUA não afetou significativamente a continuação da produção de ciclamato no resto do mundo, tendo continuado a ser utilizado em misturas com diferentes edulcorantes intensos, e sido o seu consumo várias vezes definido como seguro ao longo dos anos por diferentes entidades reguladoras, nomeadamente pelo JECFA e pelo SCF na União Europeia ^[37].

Atualmente, sobretudo devido ao seu poder adoçante reduzido, comparativamente ao de outros edulcorantes intensos, e ao seu baixo custo de produção o ciclamato é o edulcorante com maior volume de produção em todo o mundo, sendo igualmente o mais consumido ^[5].

2.4.1. Processo de produção

Os ciclamatos são sintetizados a partir da ciclohexilamina através de uma reação de sulfatação, desenvolvida por Sveda e Audrieth em 1944, que pode ser dividida em duas etapas, conforme esquematizado na Figura 2.2.

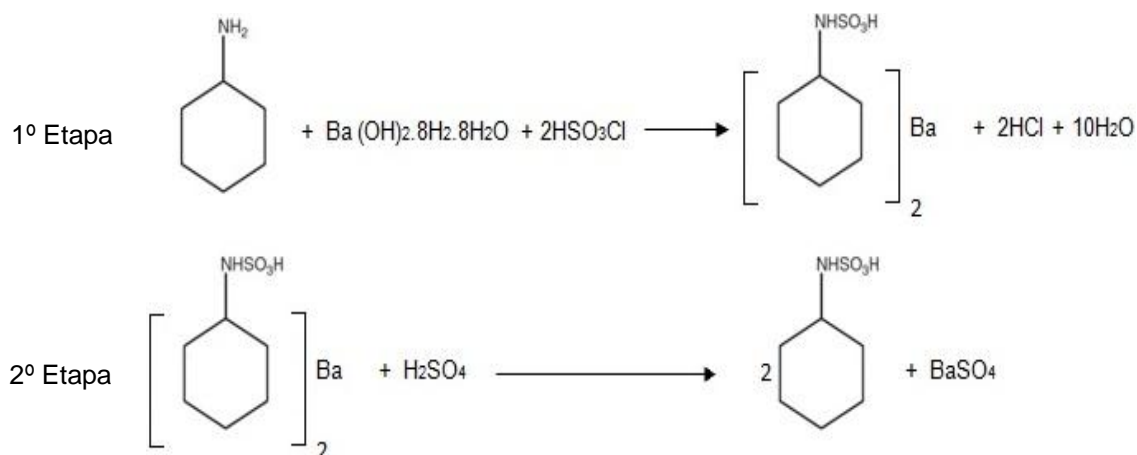


Figura 2.2 - Exemplo de esquema reacional da produção de ácido ciclâmico ^[12].

Na primeira etapa ocorre a formação de ciclohexilsulfamato de bário através da reação entre a ciclohexilamina e o hidróxido de bário ao mesmo tempo que se procede a uma lenta adição de ácido clorosulfónico. O excesso de ciclohexilamina é depois evaporado a pressão reduzida.

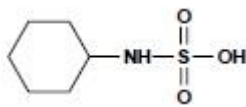
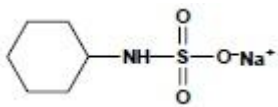
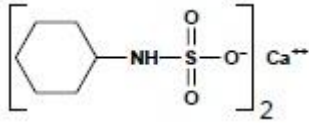
Na segunda etapa é adicionado ácido sulfúrico à solução contendo ciclohexilsulfamato de bário ocorrendo a formação do ácido ciclâmico. Esta adição é realizada a frio de modo a que o ácido livre possa ser hidrolisado. Posteriormente o sulfato de bário resultante é removido através de sucessivas filtrações e lavagens, ocorrendo por fim a formação dos cristais de ácido ciclâmico ^[38].

2.4.2. Caracterização físico-química e sensorial

Michael Sveda e Audrieth verificaram também que alguns dos sais do ácido ciclâmico possuíam um sabor doce. A obtenção dos diferentes tipos de sais pode ser realizada através da neutralização do ácido ciclâmico com a base do catião pretendido. Existe a necessidade de converter o ácido num dos seus sais devido ao facto do ciclamato no seu estado ácido possuir um valor de pK_a muito baixo, 1.71, sendo as suas soluções muito ácidas, o que torna a sua utilização direta como adoçante em alimentos inviável.

Por outro lado, os seus sais de sódio e de cálcio, de caráter neutro, são perfeitamente adequados para o uso alimentar ^[39,40]. A Tabela 2.4 resume as principais propriedades do ácido ciclâmico e respetivos sais.

Tabela 2.4 - Propriedades do ácido ciclâmico e respetivos sais ^[35,41,42].

Propriedades	Ácido Ciclâmico	Ciclamato de sódio	Ciclamato de cálcio
Estrutura química			
Fórmula química	$C_6H_{13}NO_3S$	$C_6H_{12}NO_3S Na$	$(C_6H_{12}NO_3S)_2 Ca$
Massa molecular	179.24	201.22	396.54
Descrição	Pó branco cristalino	Pó branco cristalino	Pó branco cristalino
Odor	Inodoro	Inodoro	Inodoro
pH de uma solução aquosa a 10%	0.8-1.6	5.5-7.5	5.5-7.5

Ambos os tipos de sais reúnem um conjunto de características muito favoráveis, nomeadamente a nível da sua solubilidade, estabilidade, perfil de sabor e a facilidade de mistura com outros edulcorantes, que lhes conferem elevada utilidade como aditivos alimentares não calóricos.

➤ Solubilidade

Embora possuam uma solubilidade limitada em solventes não polares (ex: etanol, clorofórmio e óleos) os sais de ciclamato são muito solúveis em água, bastando entre 4 a 5 mililitros para dissolver uma grama destes compostos, o que por si só já constitui uma concentração muito superior à necessária para uma utilização normal nas mais diversas aplicações pela indústria alimentar ^[35]. A sua solubilidade pode ser ainda incrementada caso sejam utilizados em misturas binárias com outros edulcorantes, podendo tornar-se até 180 vezes superior à que seria necessária para a maioria das aplicações ^[43].

➤ Estabilidade

As condições necessárias para a degradação dos ciclamatos constituem um aspeto de elevada importância, na medida em que o subproduto resultante da sua eventual degradação hidrolítica é a ciclohexilamina. Este metabolito, de acordo com vários estudos toxicológicos, possui um potencial nocivo para a saúde animal, e consequentemente humana. No entanto é conhecido que a degradação não ocorre, nem pelo seu processamento alimentar, nem durante o tempo de vida útil do alimento processado, uma vez que este edulcorante possui uma elevada estabilidade numa alargada gama de pH ^[44,45].

Alguns estudos realizados sob condições extremas de pH permitiram concluir que os ciclamatos são muito estáveis, não sofrendo perdas significativas. Na Tabela 2.5 é possível observar a perda de ciclamato resultante da sua hidrólise num intervalo alargado de pH durante o período de uma hora a 100°C.

Tabela 2.5 - Perda de ciclamato em solução aquosa durante uma hora a 100°C consoante a variação do pH ^[46].

pH	0,9	1,6	2,5	4,5	5,3	6,5
Perda de ciclamato (%)	13,7	8,1	0,98	0,1	0,52	0,58

Mesmo nas condições mais ácidas (ex: bebidas de cola *light*), os níveis deste subproduto não variaram significativamente num período de quatro meses em condições de temperatura ambiente ^[47].

Os ciclamatos quer no seu estado sólido, quer em solução, possuem igualmente elevada estabilidade na presença de luz, oxigénio e vários químicos alimentares. São estáveis a elevadas temperaturas, sendo que a decomposição do ácido ciclâmico e respetivos sais apenas ocorre a partir dos 169 e 260°C, respetivamente. Não são hidrocópicos (não absorvem água) mesmo em contacto prolongado com humidade e não suportam o crescimento bacteriano ou de bolor ^[35,48].

De facto, este edulcorante apresenta uma validade extremamente longa, tendo sido verificado que amostras de comprimidos contendo uma mistura de ciclamato e sacarina fabricados em 1969, ou anos anteriores, não demonstraram qualquer diminuição na sua doçura ou qualquer tipo de deterioração física e química após um período de pelo menos sete anos ^[49].

Os dados relativos à estabilidade do ciclamato parecem comprovar que não existe necessidade de indicar uma data de validade que garanta a qualidade e pureza deste

edulcorante quer na sua forma pura de aditivo alimentar ou em alimentos e bebidas que o contenham ^[35].

➤ Perfil de sabor

Uma das desvantagens de alguns dos edulcorantes intensos é o facto de serem incapazes de reproduzir o comportamento temporal da sacarose. Este parâmetro inclui o tempo, que após ingestão, o sabor doce demora a ser percecionado e o tempo que esse sabor demora a desaparecer. Ambos os sais de ciclamato possuem um sabor com um perfil temporal muito semelhante ao da sacarose o que contribui para a sua aceitação pelos consumidores ^[43,50].

O ciclamato é definido e geralmente aceite como sendo trinta vezes mais doce do que a sacarose, no entanto o seu poder adoçante tende a diminuir com o aumento da concentração utilizada ^[51]. Esta tendência é justificada pelo ligeiro sabor residual amargo e salgado resultante dos iões de sódio ou de cálcio e que se torna mais evidente quando se utilizam concentrações muito elevadas deste edulcorante ^[43].

No entanto, este sabor residual resultante da adição de ciclamato é raramente perceptível na gama de concentração utilizada nos produtos alimentares. Os teores utilizados não são suficientemente elevados para proporcionar este sabor residual e as misturas de adoçantes nas quais o ciclamato é utilizado ajudam a “camuflar” qualquer sabor residual possível ^[52].

O ciclamato de cálcio possui um poder adoçante ligeiramente inferior ao do sal de sódio, e o sabor residual amargo começa a ser perceptível para menores valores de concentração. Isto, juntamente com o facto do ciclamato de cálcio ser um pouco menos solúvel em água, constitui o principal motivo pelo qual o ciclamato de sódio é o sal mais utilizado comercialmente ^[53].

Como referido anteriormente o poder adoçante varia também consoante o meio, ou seja consoante o tipo de alimento ou bebida em que é aplicado. Deste modo, o verdadeiro poder adoçante do ciclamato deve ser determinado em cada tipo de produto alimentar em que esteja presente ^[51].

2.4.3. Potencial de mistura

Devido ao sabor residual e reduzido poder adoçante (Tabela 2.4), os sais de ciclamato são frequentemente utilizados em misturas. Uma das grandes vantagens da utilização de ciclamato consiste no facto de poder ser misturado praticamente com todos os outros edulcorantes disponíveis, quer nutritivos ou não nutritivos, com a obtenção de um incremento sinérgico na doçura^[43].

Entre todas as misturas possíveis, a mais usualmente utilizada pela indústria alimentar inclui o ciclamato e a sacarina na proporção de 10:1, respetivamente. A proporção é justificada pelo facto da sacarina ser 10 vezes mais doce que o ciclamato e desta forma, ambos os edulcorantes contribuem aproximadamente com a mesma doçura para o produto final. Esta mistura foi usada pela primeira vez em 1957 sendo atualmente ainda muito popular devido, não só, ao sinérgismo criado mas também ao incremento significativo que se obtém na solubilidade da combinação e na estabilidade do produto alimentar ou bebida onde é utilizada^[35].

Ao longo das décadas e com a descoberta e produção de novos edulcorantes intensos começaram a ser realizadas novas misturas, nomeadamente com o aspartame e acessulfame-K. Para além da mistura binária de ciclamato e sacarina, outras misturas ternárias muito utilizadas incluem o ciclamato com o aspartame e sacarina e com o aspartame e acessulfame-K^[43].

De uma forma geral uma mistura, contendo as proporções ideais de cada edulcorante intenso, possui um poder adoçante que é equitativamente fornecido por cada edulcorante presente, ou seja cerca de 50 e 33% em misturas binárias e ternárias, respetivamente. No entanto, a proporção ideal nem sempre é possível de ser aplicada devido aos limites máximos de utilização estabelecidos pela legislação em vigor para a adição de ciclamato em diferentes alimentos^[43,51].

Num estudo realizado por Schiffman *et al.* foi avaliada a sinergia entre o ciclamato e outros edulcorantes intensos em três diferentes concentrações, equivalentes a soluções de sacarose com teores de 6%, 10% e 14%, estando os resultados presentes na Tabela 2.6. Neste estudo foram utilizadas concentrações de ciclamato e de outros edulcorantes adequadas para que o poder adoçante cumulativo de cada mistura fosse o equivalente ao dos três teores percentuais de sacarose referidos, originando diferentes incrementos sinérgicos na doçura obtida.

Tabela 2.6 - Sinergia resultante da mistura de ciclamato com outros edulcorantes^[54].

Mistura	Percentagem da sinergia de doçura em função da intensidade de doçura do aditivo (% equivalente de sacarose)		
	6	10	14
Sacarina + Ciclamato	+24	0	-10
Aspartame + Ciclamato	+26	0	0
Acessulfame-K + Ciclamato	+36	+11	-9

É possível concluir que o máximo de sinergia obtida, nas diferentes misturas de ciclamato com outros edulcorantes, é verificado a uma percentagem equivalente de sacarose de 6%, sendo que para percentagens superiores ocorre uma redução na sinergia obtendo-se mesmo uma sinergia negativa para uma intensidade de doçura equivalente a 14% de sacarose. Ou seja, à medida que se aumenta a concentração dos edulcorantes na mistura, de modo a se obter uma doçura equivalente a maiores percentagens de sacarose, a doçura sinérgica resultante diminui^[54].

2.4.4. Principais aplicações

O ciclamato é utilizado nos mais diversos produtos alimentares e bebidas, maioritariamente em misturas com outros edulcorantes. A sua aplicação, no entanto, tem maior predominância em bebidas (ex: refrigerantes “light”) e em adoçantes de mesa^[1,33,42]. Estas aplicações são as mais fáceis de realizar com ciclamato e outros edulcorantes uma vez que a única propriedade funcional requerida é o sabor doce. Ou seja, basta substituir o açúcar pelos edulcorantes intensos pretendidos, não sendo necessário adicionar outros ingredientes que forneçam propriedades funcionais adicionais (ex: textura)^[43].

No caso das bebidas o principal aspeto a ter em conta é um possível sabor residual do edulcorante utilizado ou a obtenção de uma intensidade de doçura superior à pretendida, bastando regular o nível de acidez ou de carbonatação até obter o equilíbrio pretendido^[51].

Contudo, o ciclamato é utilizado noutros alimentos mais complexos, como em produtos de panificação, iogurtes, molhos para saladas, gelatinas, entre outros. Nestas aplicações é necessário fazer uma reformulação do produto uma vez que são

necessárias propriedades físicas adicionais, fornecidas pela sacarose, mas inexistentes com a substituição por ciclamato e/ou outros edulcorantes intensos. A título de exemplo, em produtos panificados a sacarose aumenta o ponto de gelatinização do amido, fornece textura e é alvo de hidrólises o que lhe confere a estrutura e aparência pretendida. Por outro lado, em sobremesas congeladas a sacarose reduz o seu ponto de congelamento e contribui para a sua textura^[55].

Deste modo, para produzir este tipo de produtos alimentares usando ciclamato é necessário combiná-lo com outros substitutos de baixas calorias que forneçam estas propriedades, como por exemplo o manitol e alguns agentes espessantes^[43,55].

Existem também outros alimentos nos quais a formulação das propriedades físicas não constitui um processo tão complexo, como é o caso de produtos hortofrutícolas. O ciclamato sempre foi particularmente útil neste tipo de produtos porque mesmo quando utilizado em baixas concentrações melhora significativamente o seu sabor, podendo mascarar a acidez natural de algumas frutas cítricas^[51,56].

Além disso, as soluções de ciclamato possuem menor densidade e pressão osmótica do que os xaropes de sacarose, por isso ao serem usadas em conservas de frutas é menos provável que ocorra a remoção de água do fruto. Assim, frutos conservados em soluções de edulcorantes contendo ciclamato tendem a ter um maior peso do que os que são embalados em sacarose, conservando melhor as suas características^[51].

O ciclamato pode também ser aplicado em produtos de higiene oral e fármacos. É particularmente bom para mascarar o sabor amargo e gosto desagradável de muitos medicamentos sendo especialmente útil em formulações de xaropes e comprimidos mastigáveis. É também usado como adoçante em películas de revestimento de comprimidos, e devido ao facto de não ser cariogénico é adequado para uso em pastas de dentes e soluções de limpeza oral^[57].

2.4.5. Metabolismo do ciclamato

O ciclamato é alvo de uma absorção lenta e parcial por parte do intestino delgado na sua forma ácida ou na forma de um dos seus sais. Esta fração absorvida é posteriormente excretada inalterada na urina. No entanto, o metabolismo da fração não absorvida e respetivo mecanismo constituem os principais aspetos mais polémicos associados à segurança do consumo deste edulcorante e que menor consenso obtém por parte da comunidade científica em todo o mundo^[6,35].

Esta polémica deve-se sobretudo ao facto do principal subproduto resultante do seu metabolismo ser a ciclohexilamina, um metabolito que pode causar efeitos adversos na saúde animal e humana. Este metabolito está presente em quantidades muito pequenas no ciclamato e pode ser produzido pela ação de microrganismos presentes na microflora intestinal sob a sua fração não absorvida ^[35]. Na Figura 2.3 está representado o esquema reacional genérico desta conversão que pode decorrer em todas as espécies mamíferas, catalisada por enzimas, hidrolases. Ao contrário do ciclamato a ciclohexilamina é completamente absorvida pelo organismo ^[12].

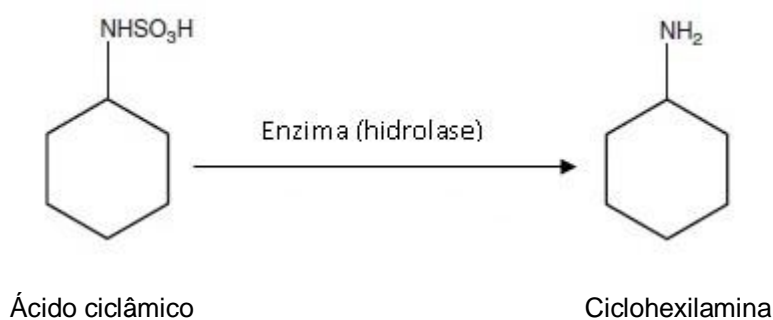


Figura 2.3 - Esquema reacional da conversão do ácido ciclâmico em ciclohexilamina ^[12].

Desde a década de 1960 que inúmeros estudos têm sido realizados em animais de laboratório e em humanos com o objetivo de melhor perceber alguns aspetos deste metabolismo, nomeadamente conhecer a capacidade máxima que o corpo humano tem em converter ciclamato em ciclohexilamina e a variabilidade de conversão entre diferentes indivíduos sujeitos a várias dosagens e em diferentes períodos de tempo, tendo-se chegado às seguintes conclusões:

- apenas o ciclamato não absorvido está disponível para ser metabolizado pela microflora intestinal;
- a maioria dos indivíduos (cerca de 80% da população) não converte ciclamato em ciclohexilamina, mesmo com uma dosagem diária;
- os restantes 20% da população apresentam uma capacidade variável de metabolização com dosagens repetidas, sendo que uma pequena percentagem da população (3 a 4%) é capaz de metabolizar uma grande proporção (20% ou mais) do ciclamato ingerido diariamente;
- o máximo de conversão de ciclamato não absorvido que foi registado situou-se acima dos 50%, tendo no entanto sido um caso isolado;
- é necessário serem administradas várias doses deste edulcorante de modo a induzir a sua metabolização, mesmo em indivíduos conversores;

- a interrupção ou não assiduidade da ingestão deste edulcorante resulta numa perda de capacidade de metabolização;
- existem grandes variações na taxa de conversão de ciclamato entre os diferentes indivíduos conversores, no mesmo indivíduo ao longo do tempo, e ainda entre indivíduos que apresentam uma capacidade muito elevada de metabolização ^[58,59,60,61].

Estas conclusões permitiram assumir que o metabolismo do ciclamato é um processo que aparenta apresentar uma elevada variabilidade, dependente de vários fatores humanos, temporais e mesmo raciais, difíceis de controlar ou contabilizar com precisão em estudos que envolvam diferentes condições experimentais ^[35].

2.4.6. Efeitos toxicológicos do ciclamato e seus derivados

Desde que o ciclamato começou a ser consumido como aditivo alimentar a sua segurança e impacto na saúde pública têm sido alvo de estudos incidentes não só nos efeitos deste edulcorante por si só mas sobretudo nos efeitos toxicológicos da ciclohexilamina. O facto deste composto apresentar atividade biológica com alegados efeitos cardiovasculares em animais (aumento da pressão sanguínea e do ritmo do batimento cardíaco) motivou a realização de estudos sobre o efeito da ciclohexilamina em seres humanos ^[35].

No entanto, a exposição à ciclohexilamina como metabolito do ciclamato em humanos não conduziu a qualquer efeito na pressão sanguínea ou ritmo cardíaco, nem inclusive em indivíduos que apresentavam elevadas taxas de conversão deste edulcorante ou aos quais foram administradas elevadas doses. Com base nos estudos realizados até ao momento é possível concluir que não existem quaisquer efeitos cardiovasculares em seres humanos ^[62].

Embora tenha sido provado que a ciclohexilamina não origina efeitos adversos no organismo a nível do sistema cardiovascular, vários estudos toxicológicos comprovaram que o sistema reprodutor dos ratos, nomeadamente os testículos, são os órgãos que apresentam maior suscetibilidade aos efeitos adversos deste composto podendo ser alvo de uma atrofia ^[63,64].

Num estudo realizado por Brune *et al.* verificou-se que até à administração de 100 mg/kg peso corporal/dia de ciclohexilamina não se registavam os referidos efeitos

tóxicos em ratos, tendo este sido o valor definido como “nível de efeito adverso não verificado” (NOAEL) pelas entidades reguladoras ^[65].

Alguns estudos posteriores realizados em seres humanos comprovaram que não é possível associar o consumo de ciclamato e ciclohexilamina à infertilidade masculina, uma das consequências diretas da atrofia testicular que foi comprovada em ratos ^[58,66].

Relativamente aos efeitos toxicológicos resultantes da ingestão de ciclamato foram realizados estudos polémicos em condições experimentais não controladas que indicaram um efeito potencialmente carcinogénico ^[67,68]. Um desses estudos, realizado em 1969, no qual foi administrada uma mistura de ciclamato e sacarina na proporção de 10:1 a ratos que posteriormente desenvolveram cancro na bexiga foi provavelmente o mais controverso, uma vez que resultou na interdição deste edulcorante nos EUA ^[67].

Inúmeros estudos realizados até à atualidade em diferentes animais e longos períodos de tempo foram incapazes de comprovar qualquer tipo de carcinogenicidade ^[37,69,70]. De igual modo, nenhum tipo de efeito deteriorante ou mutagénico no ADN que resultasse em alterações hereditárias foi determinado para este edulcorante.

As verdadeiras consequências da ciclohexilamina e da ingestão de ciclamato na saúde humana continuam, ainda hoje, a ser um dos focos de investigação por parte da comunidade científica e das entidades reguladoras competentes ^[6,35].

2.4.7. aspetos da regulamentação do ciclamato

Os sais de ciclamato encontram-se aprovados como edulcorantes para consumo geral em vários produtos alimentares e bebidas, na União Europeia, desde 1994 pela Diretiva 94/35/CE ^[2]. Ao longo dos anos a segurança deste edulcorante foi avaliada e reavaliada pelo JECFA e pelo SCF, à medida que novos estudos foram sendo publicados, tendo sido definidos diferentes valores temporários para a sua DDA. A definição de um valor definitivo e consensual apresentou sempre uma elevada complexidade devido à grande variabilidade na conversão de ciclamato em ciclohexilamina ^[71,72].

Para o cálculo do valor da DDA as entidades reguladoras tiveram como base o valor do NOAEL verificado em estudos relativos aos efeitos prejudiciais da ciclohexilamina no sistema reprodutor de ratos, uma vez que este foi o único efeito adverso provado e revisto cientificamente em vários estudos ^[35].

Em 1982 o JECFA e em 1985 o SCF analisaram a segurança do ciclamato, tendo sido definido um valor temporário para a DDA de 0-11 mg/kg de peso corporal/dia expresso como ácido ciclâmico para os seus sais de sódio e de cálcio. A definição deste valor teve por base o valor do NOAEL de 100 mg/kg de peso corporal/dia verificado no estudo com ratos e uma taxa de conversão em ciclohexilamina de 18,9% do total de ciclamato ingerido diariamente ^[72,73].

O valor da DDA foi definido como temporário devido às incertezas sobre a relevância para o homem do dano testicular encontrado em ratos alimentados com ciclohexilamina ^[58].

Desde então até 2000 o SCF reviu o ciclamato em 1988, 1991 e 1995, tendo sido mantido o valor temporário previamente definido de 11 mg/kg de peso corporal/dia, devido ao facto dos novos resultados científicos serem inconclusivos ^[74,75,76].

Em 2000, após receber resultados relativos a novos estudos epidemiológicos, e relativos à conversão do ciclamato em ciclohexilamina em seres humanos, o SCF concluiu que a taxa de conversão de 18,9% usada para o estabelecimento do valor da DDA temporária de 0-11 mg/kg de peso corporal/dia não era a mais apropriada. Esta conclusão foi baseada no facto dos novos estudos terem demonstrado que podem existir variações inter-individuais nas taxas de conversão, superiores às anteriormente observadas, tendo sido observado um máximo de conversão de 85% ^[77].

No entanto, não permitiram afirmar com certeza o período de tempo mínimo de exposição à ciclohexilamina necessário para que pudessem ocorrer danos testiculares. Embora os novos dados epidemiológicos não mostrassem indicações de efeitos nocivos do ciclamato no ser humano o SCF concluiu que um valor da DDA final de 0-7 mg/kg de peso corporal/dia podia ser estabelecido. Para a determinação deste valor o Comitê utilizou como base o mesmo NOAEL de 100 mg/kg peso corporal/dia para a ciclohexilamina, mas considerou a taxa de conversão total de 85% do ciclamato ingerido diariamente ^[77].

A definição do valor da DDA teve também como justificação a maior suscetibilidade para a ingestão excessiva deste edulcorante por alguns grupos populacionais (ex: obesos, diabéticos e crianças). Este valor encontra-se atualmente em vigor em todos os Estados Membros da UE. Por outro lado o JECFA após avaliação dos mesmos estudos manteve o valor da DDA temporária de 0-11 mg/kg de peso corporal/dia ^[26].

As autorizações para a utilização de ciclamatos foram posteriormente revistas na Diretiva 2003/115/CE, tendo sido feitas alterações às doses máximas de utilização definidas na Diretiva 94/35/CE (ex: bebidas à base de água). Esta alteração foi realizada como medida de precaução e para assegurar que a ingestão de ciclamatos permanecesse abaixo da nova DDA estabelecida ^[28].

Por outro lado, a não existência de um limite máximo de utilização em adoçantes de mesa manteve-se sempre ao longo dos anos com as diferentes diretivas e revisões publicadas. Neste caso o ácido ciclâmico e os seus sais devem respeitar uma utilização de “*quantum satis*”, ou seja: “entende-se que nenhum teor numérico máximo é especificado e que as substâncias são utilizadas em conformidade com as boas práticas de fabrico, em quantidade não superior ao necessário para atingir o objetivo pretendido e desde que o consumidor não seja induzido em erro”^[3].

O ciclamato está atualmente aprovado para consumo em mais de 100 países em todo o mundo. A autorização para uso em alimentos, bebidas, adoçantes de mesa e produtos farmacêuticos varia entre os diferentes países^[43].

2.5. Avaliação da Ingestão de Edulcorantes

A polémica e evidência científica dos efeitos tóxicos do ciclamato e outros edulcorantes intensos obrigam a que o risco do seu consumo seja alvo de uma caracterização constante. Esta caracterização apenas é possível através da comparação do consumo humano dos produtos em questão com a DDA definida para cada edulcorante. A realização de estudos acerca da estimativa do consumo de edulcorantes intensos assume, assim, um carácter de extrema importância, uma vez que permitem avaliar a exposição da população ou de subgrupos populacionais mais sensíveis à ingestão de diferentes edulcorantes intensos. Estes estudos devem ser realizados em intervalos de tempo regulares pelo facto da ingestão poder variar ao longo do tempo devido a possíveis mudanças nos padrões de uso e consumo de alimentos^[78,79].

Teoricamente a avaliação da ingestão de um edulcorante pode ser realizada pela comparação do consumo diário obtido através dos dados de consumo dos participantes no estudo com o teor dos edulcorantes em todos os produtos, quer especificado no rótulo ou determinado analiticamente^[80].

No entanto a enorme variedade de produtos alimentares no mercado e o facto de estes sofrerem alterações constantes, torna difícil esta avaliação. Deste modo, é prática comum nos estudos realizados na UE proceder-se à comparação dos dados de ingestão com o limite máximo de utilização permitido para cada edulcorante, ou seja assumindo-se que todos os produtos possuem o edulcorante na sua quantidade máxima permitida^[79].

Vários estudos têm vindo a ser realizados nos últimos anos em diferentes países Europeus. No entanto, poucos destes estudos envolveram a estimativa da ingestão de ciclamato em adoçantes de mesa e igualmente poucos focaram a estimativa em grupos representativos das populações. A maioria dos estudos chegaram à conclusão que o consumo diário de todos os edulcorantes intensos, permitidos para uso, não ultrapassa nem corre o risco de ultrapassar as doses diárias admissíveis^[78,81].

Porém, em alguns foi relatada alguma preocupação no consumo de ciclamato pela população infantil e adolescente, sendo que existe uma falta de informação mais detalhada para estes subgrupos populacionais que permita tirar conclusões definitivas^[81].

A realização de estudos de estimativa de ingestão destes aditivos torna-se especialmente complexa devido às várias misturas de edulcorantes realizadas e diferentes proporções aplicadas. Os adoçantes de mesa, em particular, são dos produtos para os quais a realização destes estudos é especialmente difícil, devido ao facto destes produtos não apresentarem, em muitos casos, o teor de cada edulcorante no rótulo e por não possuírem um máximo de utilização de edulcorantes que são, conseqüentemente, utilizados em quantidades muito variáveis^[81].

De todos os edulcorantes intensos, a interpretação dos dados relativos á ingestão de ciclamato é ainda mais complexa pelo facto de que apenas 3 a 4 % da população é capaz de produzir quantidades significativas de ciclohexilamina cuja atividade definiu a DDA deste edulcorante^[58].

Em Portugal, até hoje, apenas foi realizado um estudo, que se centrou na estimativa de consumo do acesulfame-K e do aspartame em refrigerantes. Estes dois aditivos e o ciclamato constituem os edulcorantes intensos mais consumidos no País^[82].

2.6. Métodos de Análise do Ciclamato

De modo a assegurar a segurança do consumidor é, não só necessário, mas essencial controlar o conteúdo de edulcorantes nos alimentos. A utilização de métodos analíticos baseados em diferentes princípios de aplicação estão disponíveis para a obtenção de informação do conteúdo dos alimentos, permitindo verificar se os limites máximos de utilização definidos por lei são cumpridos^[83].

A ampla utilização e consumo dos sais de ciclamato e as polémicas relativas ao seu metabolismo no corpo humano e alegados efeitos prejudiciais na saúde obrigam a

desenvolver e validar métodos quantitativos eficientes para a sua determinação nos diferentes tipos de produtos alimentares disponíveis no mercado ^[84].

O processo de desenvolvimento de um determinado método analítico para a determinação de ciclamato depende de uma série de fatores. Nomeadamente do tempo e equipamento disponível, da complexidade da matriz alimentar para a qual se pretende aplicar o método, se é pretendido determinar este edulcorante individualmente ou em simultâneo com outros edulcorantes intensos e se o desenvolvimento do método faz parte de um programa de investigação ou se tem por objetivo ser utilizado em análises de controlo de qualidade de rotina num laboratório ^[83,85].

Embora exista necessidade de desenvolver métodos analíticos para a determinação simultânea de vários edulcorantes intensos presentes em combinações nas mais variadas matrizes alimentares, a maioria dos métodos disponíveis são específicos para cada tipo de edulcorante. Os edulcorantes com décadas de história como o ciclamato podem ser determinados por todas as técnicas analíticas atualmente disponíveis ^[85].

De todos os métodos disponíveis e aplicados para a determinação de ciclamato em diferentes matrizes alimentares, os métodos cromatográficos têm sido alvo de elevado destaque científico, principalmente o método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) ^[44].

A principal dificuldade existente na determinação de ciclamato em matrizes alimentares consiste no facto das suas moléculas não possuírem o cromóforo adequado para a absorção da radiação ultravioleta, o que obriga a que os métodos diretos de HPLC para análise deste edulcorante necessitem de sistemas de deteção específicos ou que incluam um pré-tratamento da amostra ^[85].

Até hoje foram desenvolvidos e aplicados vários métodos analíticos com base na tecnologia de HPLC com diferentes detetores e pré-tratamentos das amostras, quer individualmente quer em simultâneo com outros edulcorantes, nomeadamente com deteção por espectrofotometria indireta ^[86], absorção na gama do visível com a adição de substâncias corantes ^[87], absorção na gama do ultravioleta (UV) e fluorescência com derivatização prévia das amostras ^[88,89], espectrometria de massa (MS) ^[1] e com um detetor evaporativo de dispersão de luz ^[83].

Na UE existem duas normas oficiais publicadas pelo Comité Europeu de Normalização (CEN) com base na utilização de técnicas de HPLC com deteção UV. A EN 12857 que requer um pré-tratamento (derivatização) das soluções e a EN 1379, específica para a aplicação em preparações líquidas de adoçantes de mesa ^[90,91]. A EN 12857, utilizada no presente trabalho, tem por base a reação entre o ciclamato e o cloro ativo presente

no hipoclorito de sódio adicionado, em meio ácido, resultando na formação do produto derivatizado, a N,N-diclorociclohexilamina^[90], como é possível verificar na Figura 2.4.

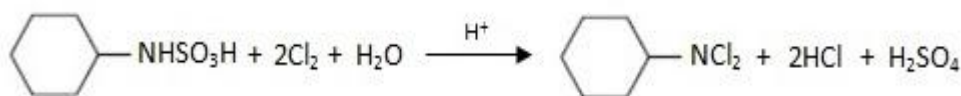


Figura 2.4 - Reação de derivatização do ácido ciclâmico^[88].

Embora vários métodos de HPLC tenham sido desenvolvidos, apenas os que utilizam detetores de MS permitem a identificação e quantificação de múltiplos edulcorantes (até 7 ou 9). No entanto, necessitam de equipamentos mais caros e de analistas com elevada especialização neste tipo de metodologias, podendo tornar a sua aplicação inviável ou pouco atrativa em análises de rotina na indústria alimentar^[1,85].

Para além dos métodos de HPLC, têm sido desenvolvidos outros métodos com o mesmo objetivo. Alguns métodos cromatográficos como é o caso da cromatografia iónica, de camada fina e gasosa têm sido desenvolvidos com sucesso^[85]. A aplicação da cromatografia iónica tem se mesmo apresentado em alguns casos superior ao HPLC, devido ao seu elevado poder de separação, reduzido tempo de análise e baixo consumo de solventes^[92]. A cromatografia de camada fina requer equipamento simples, flexível e de baixo custo^[94]. Por outro lado a cromatografia gasosa embora já tenha sido aplicada na determinação de ciclamato tem sido menos utilizada devido à baixa volatilidade da maioria dos edulcorantes intensos^[85,94]. A eletroforese capilar foi igualmente utilizada, possuindo como vantagens o facto de necessitar de equipamento simples, de ser flexível e de mais baixo custo^[95].

Devido ao facto de permitirem obter resultados em tempo mínimo, os métodos de análise por injeção em fluxo (FIA)^[96], eletroquímicos^[97] e espectroscópicos^[98] têm sido utilizados. Os métodos de FIA apresentam-se muito úteis em análises automatizadas, especialmente quando apenas se pretende determinar um ou dois edulcorantes num grande número de amostras de forma contínua. As técnicas eletroquímicas permitiram de forma versátil a determinação de vários edulcorantes diretamente das amostras. Os métodos de separação espectroscópicos têm igualmente sido utilizados, maioritariamente com deteção UV^[85].

Não obstante o facto de estes métodos constituírem uma alternativa viável e com potencial de desenvolvimento, os métodos com base na utilização de HPLC têm

apresentado predominância na determinação de ciclamato e outros edulcorantes em alimentos e bebidas nos últimos anos ^[44].

A grande variedade de colunas cromatográficas com diferentes mecanismos de separação e a diversidade de detetores que podem ser utilizados tornam a aplicação desta tecnologia universal. Os métodos analíticos com recurso a tecnologia de HPLC possuem uma boa capacidade para identificar múltiplos analitos, boa compatibilidade com as propriedades físico-químicas dos edulcorantes, e oferecem elevada sensibilidade e robustez ^[86]. Evitam sobrestimações do teor do edulcorante na amostra, o que pode ocorrer em alguns métodos menos específicos ^[44].

Em alguns casos reduz a complexidade do pré-tratamento das amostras e permite realizar a deteção e quantificação de analitos em concentrações muito baixas o que sucede no caso dos edulcorantes na maioria das matrizes alimentares ^[44,85]. Estas vantagens têm justificado a predominância do desenvolvimento de métodos para a determinação de ciclamato e outros edulcorantes com base em métodos de HPLC ^[85,99].

2.7. Fundamentos de HPLC

A cromatografia líquida de alta resolução constitui atualmente uma das técnicas mais utilizadas em química analítica, quer para análises quantitativas ou qualitativas. Qualquer composto, presente em qualquer tipo de amostra mais ou menos complexa, que possa ser dissolvido num líquido, pode ser separado, identificado e quantificado com elevada precisão, sensibilidade e reprodutibilidade, através do uso desta técnica ^[100]. Na Figura 2.5 está representado um esquema genérico de um sistema de HPLC e os seus principais componentes.

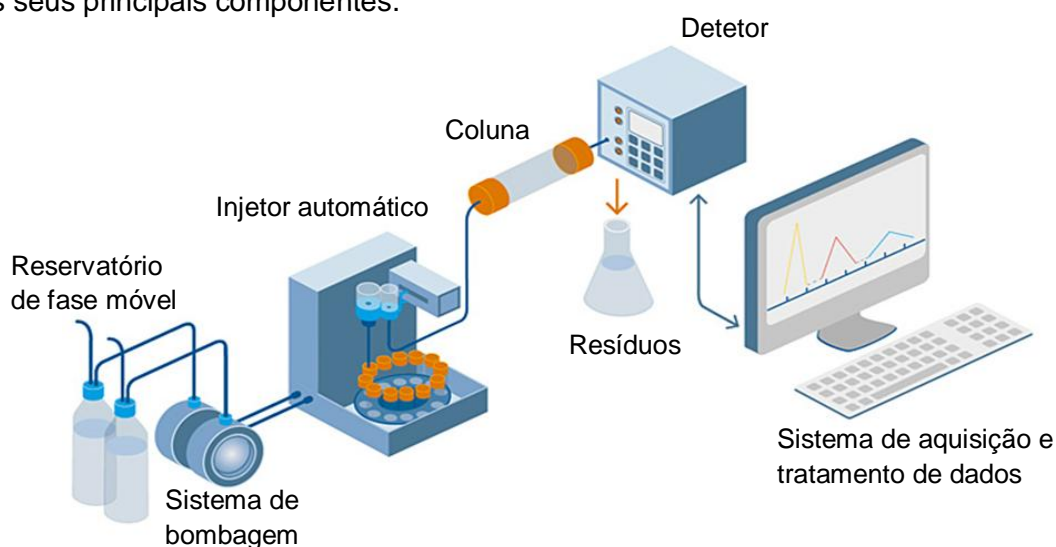


Figura 2.5 - Esquema representativo dos principais componentes de um sistema de HPLC ^[101].

O sistema de bombagem força a fase móvel através do equipamento, criando e medindo um fluxo específico (mL/min) a elevadas pressões até à coluna. Este sistema pode ser programado para variar a proporção dos componentes da fase móvel ao longo da corrida cromatográfica, caso se pretenda uma eluição em gradiente ou para fixar uma proporção desses componentes para eluições isocráticas.

O injetor automático transfere as amostras líquidas para a fase móvel que as transporta até à coluna cromatográfica. A coluna pode possuir diferentes tipos de materiais de enchimento (fase estacionária), que, juntamente com a fase móvel vão determinar a separação pretendida.

A separação dos diferentes analitos presentes na amostra ocorre através de diferentes mecanismos de interação entre estes, a fase estacionária e a fase móvel. Esta separação ocorre frequentemente por partição, adsorção ou por troca iónica, dependendo do tipo de coluna utilizada e do e de analitos em análise. A seleção do tipo de coluna adequada para uma determinada separação constitui uma das decisões mais importantes para o desenvolvimento de um método analítico. As suas características afetam significativamente a seletividade e eficiência de separação dos analitos, e conseqüentemente a qualidade da resolução dos cromatogramas.

À medida que os compostos vão sendo eluídos da coluna passam através de um detetor, o qual deve possuir sensibilidade suficiente para responder a mudanças de concentração de todos os analitos presentes. A fase móvel depois passar pelo detetor é direcionada para um reservatório de resíduos.

O sinal emitido pelo detetor é enviado para um sistema de colheita de dados (ex: computador), é processado e é gerado um cromatograma, no qual os diferentes analitos são representados por curvas aproximadamente gaussianas com diferentes tempos de retenção. Através dos tempos de retenção é possível identificar os analitos e com base nas áreas dos respetivos picos efetua-se a sua quantificação.

Normalmente o *software* usado na colheita e tratamento de dados permite igualmente programar uma série de parâmetros operatórios (ex: fluxo da fase móvel, volume e número das injeções, entre outros). No entanto, nem todos os *softwares* permitem estas programações^[100,102,103].

2.7.1. Modos de separação

O tipo de coluna cromatográfica e a sua constituição determinam o modo de separação do método, sendo a separação por partição uma das mais frequentemente

utilizadas. Neste caso a separação depende da polaridade dos analitos da amostra e da sua afinidade para com a fase móvel e fase estacionária, cuja polaridade determina o tempo de retenção dos diferentes analitos na coluna ^[103].

Existem dois tipos de separação em cromatografia de partição: a separação em fase normal (NP-HPLC) e em fase reversa (RP-HPLC). Nas técnicas de separação por NP-HPLC a fase estacionária possui uma elevada polaridade, e a fase móvel um forte carácter não polar, pelo que os compostos com menor polaridade são os primeiros a serem eluídos da coluna ^[104].

Na separação por RP-HPLC é utilizada uma fase estacionária não polar e uma fase móvel polar. A não polaridade da fase estacionária resulta, geralmente, da utilização de sílica modificada quimicamente, que promove a ligação de cadeias de hidrocarbonetos (hidrofóbicas) cujas características variam consoante o número de átomos de carbono utilizados (ex: C8 e C18). Quanto mais longa for a cadeia de átomos de carbono maior é a hidrofobicidade da fase estacionária ^[103,105].

Durante a corrida cromatográfica, com este modo de separação, os compostos menos polares ficam mais tempo retidos na coluna uma vez que a sua afinidade para com a fase estacionária é maior. Por outro lado, os compostos mais polares possuem maior afinidade com a fase móvel, e por isso são eluídos mais rapidamente ^[104].

A maior reprodutibilidade e ampla aplicabilidade das técnicas de RP-HPLC, justificam a sua utilização em mais de 80% de todos os métodos envolvendo a aplicação de HPLC. A maior popularidade deste modo de separação é igualmente devida aos diversos mecanismos de separação possíveis de executar, baseados em interações hidrofóbicas e hidrofílicas, juntamente com a disponibilidade de um grande número de fases estacionárias de elevada qualidade e diferentes níveis de hidrofobicidade. As técnicas de RP-HPLC permitem, atualmente, realizar a separação de uma grande variedade de substâncias, entre as quais de edulcorantes intensos ^[105,106].

2.8. Validação do Método de Análise

Independentemente do método analítico que esteja a ser aplicado é necessário realizar a sua validação. Este é um processo contínuo que começa no planeamento do método e continua durante a sua aplicação, podendo necessitar de ser repetido caso existam posteriores modificações substanciais no procedimento analítico. A validação permite garantir que o propósito de aplicação do método é atingido com a qualidade

exigida e que qualquer futuro ensaio de análise de rotina obtenha resultados muito próximos ao verdadeiro valor do teor do analito presente na amostra em estudo ^[107].

O desenvolvimento de um processo de validação exige a avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade e especificidade; gama de trabalho; linearidade; sensibilidade; limites de deteção e quantificação; precisão (repetibilidade e precisão intermédia) e ensaios de recuperação e exatidão ^[108].

➤ **Seletividade e especificidade**

A seletividade e especificidade são muitas vezes termos que causam alguma confusão, visto possuírem uma definição e formas de avaliação semelhantes. A seletividade de um método analítico é a capacidade de identificar e quantificar, com precisão, o (s) analito (s) pretendido (s) na presença de outros compostos que possam interferir com a sua determinação. Por outro lado, a especificidade é característica de métodos analíticos que produzam uma resposta para um único composto de interesse. Devido ao facto da maioria dos métodos cromatográficos produzirem respostas para mais do que um composto de interesse, o termo seletividade é sugerido pela IUPAC como sendo o mais adequado ^[107,109].

Os compostos interferentes podem ser outros ingredientes ativos, excipientes, produtos de degradação e outros compostos com propriedades semelhantes à do analito. Um método seletivo permite garantir que o pico obtido é exclusivamente do composto de interesse ^[109].

Existem diferentes formas de determinar se um método é específico ou seletivo, como por exemplo, através da comparação da matriz, com o analito de interesse, com uma matriz isenta. Nenhum composto deve eluir no tempo de retenção do analito de interesse na matriz isenta ^[110].

➤ **Gama de trabalho**

A gama de trabalho corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior, definidos para realização da curva de calibração. Os pontos definidos no intervalo de concentrações escolhido devem estar distribuídos equitativamente. Para verificar a adequabilidade da gama de trabalho é realizado o teste da homogeneidade de variâncias para os pontos extremos da curva, permitindo verificar se existem

diferenças significativas numa série de réplicas independentes para ambos, de acordo com a ISO 8466-1 [108,111].

Neste teste é avaliada a variância de dez réplicas independentes de acordo com a equação 2.1 aplicada para o primeiro e último ponto da curva.

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^N |y_{i,j} - \bar{y}_i|^2}{n_i - 1} \quad (2.1)$$

Onde: i - Número do padrão; j - Número de repetições efetuadas; y_i - Valor do sinal no ponto i ; \bar{y}_i - Média dos valores de y_i ; n_i - número de réplicas.

Determina-se o quociente entre as variâncias dos dois pontos para verificar se existem diferenças significativas. Quando o valor da variância do último padrão é superior à do primeiro recorre-se à equação 2.2, caso contrário é utilizada a equação 2.3.

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2} \quad (2.2)$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \quad (2.3)$$

Tendo como referência o valor tabelado da distribuição F de *Snedecor/Fisher*, para $n-1$ graus de liberdade, conclui-se acerca da diferença de variâncias obtida:

- Se $PG > F$, as diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida;
- Se $PG \leq F$, as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada [108].

➤ Linearidade

A capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em análise, dentro da gama de trabalho escolhida, é definida como linearidade [110].

A relação entre o sinal detetado e a concentração pode apresentar uma relação linear direta: $y = bx + a$, onde y corresponde ao sinal detetado e x à concentração. Em métodos baseados no uso de curvas de calibração é necessário analisar a sua linearidade através de formas diferentes ou complementares.

Pode ser avaliada através da comparação entre a função linear e não linear (polinomial) através de modelos estatísticos (teste de *Mandel*). A partir de um conjunto de pontos experimentais (sinal instrumental obtido das diferentes concentrações de analito) são calculados os desvios padrão residuais dos dois tipos de funções e a diferença entre as suas variâncias (DS^2) com a equação 2.4 ^[108].

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y2}^2 \quad (2.4)$$

Em que: N - número de padrões de calibração; $S_{y/x}^2$ - desvio padrão residual da equação linear; S_{y2}^2 - desvio padrão residual da equação polinomial.

Posteriormente com a equação 2.5 é calculado o valor teste, PG.

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad (2.5)$$

Este valor é comparado com o valor tabelado da distribuição F, de *Snedecor/Fisher*, resultando em duas conclusões possíveis:

- Se $PG \leq F$, a função de calibração é linear;
- Se $PG > F$, a função de calibração não é linear ^[108].

A linearidade pode também ser avaliada através da análise da representação gráfica obtida, nomeadamente do seu coeficiente de determinação e dos resíduos percentuais verificados para cada ponto da curva de calibração. O coeficiente de determinação é geralmente aceitável, quando igual ou superior a 0,995. Embora este parâmetro possa indicar uma boa correlação entre os pontos experimentais, não confirma necessariamente a linearidade do método ^[108,112].

➤ **Sensibilidade**

A sensibilidade é o quociente entre a resposta analítica e a concentração do analito correspondente. Por outras palavras, em métodos analíticos de calibração linear, a sensibilidade é o declive da respetiva reta (b). Num método com elevada sensibilidade uma pequena alteração na concentração do analito resulta numa alteração significativa no sinal obtido ^[107,108].

Em termos práticos o conhecimento deste parâmetro permite:

- averiguar a sua evolução ao longo do tempo;
- compará-lo entre diferentes métodos analíticos, com modelos lineares, para um mesmo analito;
- comparar o seu valor em curvas de calibração de diferentes analitos ^[108].

➤ **Limite de deteção**

O limite de deteção (LD) representa a menor concentração do analito em estudo que pode ser detetada e distinguida de zero (ou do nível de ruído do sistema), mas não necessariamente quantificada ^[107].

É normalmente medido em unidades de concentração e em métodos de calibração linear pode ser calculado com a equação 2.6 ^[108].

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad (2.6)$$

Em que: $S_{y/x}$ - estimativa do desvio padrão residual da curva de calibração; b – declive da curva de calibração.

➤ **Limite de quantificação**

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração do analito que pode ser determinado quantitativamente com um nível de precisão aceitável. Tal como o LD também é expresso em unidades de concentração e pode ser calculado em calibrações lineares através da equação 2.7.

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (2.7)$$

Embora a equação 2.7 seja a principal forma de calcular o LQ em métodos em que se usem curvas de calibração, também é possível considerar o primeiro ponto da curva de calibração para determinar este limite analítico. Nesse caso é necessário testar a precisão e exatidão desse ponto através de uma série de registos da sua concentração, em condições de precisão intermédia. Calcula-se depois a média,

desvio padrão dos valores obtidos e caso a variação do coeficiente de variação seja inferior a 10% define-se esse valor de concentração como o LQ^[108].

➤ **Verificação dos limites analíticos**

Os limites de deteção e quantificação da curva de calibração devem ser confirmados através da realização de um ensaio de recuperação, com uma adição padrão correspondente ao LQ. É analisada a amostra fortificada, e a mesma amostra diluída na proporção de 1/3 para determinação do LD, sendo que preferencialmente a matriz amostra em análise não deverá conter o analito em estudo^[112].

➤ **Repetibilidade do injetor**

A conformidade do injetor pode ser avaliada através da verificação da sua repetibilidade. São realizadas uma série de injeções (réplicas) de cada um dos pontos extremos da curva de calibração. Posteriormente são analisados os coeficientes de variação do sinal obtido das diferentes réplicas para cada extremo^[112].

➤ **Precisão**

A precisão de um procedimento analítico, expressa o grau de concordância (grau de dispersão) entre uma série de resultados obtidos a partir de uma série de ensaios de uma mesma amostra homogénea de acordo com as condições prescritas. A análise deste parâmetro permite avaliar a qualidade dos resultados tendo em consideração possíveis erros de carácter aleatório. É normalmente expressa em termos de variância, desvio padrão e coeficiente de variação do conjunto de ensaios realizados sob condições de repetibilidade e de precisão intermédia^[107,108].

É recomendado que os procedimentos analíticos para avaliar este parâmetro sejam realizados, separadamente, para cada tipo de matriz de amostra considerado de modo a englobar o intervalo completo de concentração do analito em estudo. Isto tem por objetivo concluir se o método apresenta precisão independentemente da concentração do analito presente na amostra^[107].

Repetibilidade (precisão intra-ensaio)

A realização de várias medições de uma mesma amostra, em diferentes preparações (tomadas) efetuadas nas mesmas condições de operação permite avaliar a repetibilidade do método, ou seja o nível aproximação entre os resultados obtidos. As condições que se mantêm iguais nas diferentes medições são:

- mesmo laboratório;
- mesmo analista;
- mesmo equipamento;
- mesmo tipo de reagentes;
- curtos intervalos de tempo (ex: mesmo dia) ^[108].

O coeficiente de variação, expresso em percentagem, é calculado através da equação 2.8.

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.8)$$

Em que: S_{ri} - desvio padrão dos valores de concentração das seis tomadas analisadas em condições de repetibilidade; \bar{x} - média dos valores de concentração obtidos.

Precisão intermédia

A precisão intermédia pode ser considerada como o parâmetro mais representativo da variabilidade de resultados obtidos através de um método analítico a nível interno no laboratório. É efetuado um conjunto de medições da mesma amostra ou padrão, no mesmo laboratório utilizando o mesmo método, sendo que neste caso é propositadamente alterada uma ou mais das condições definidas anteriormente como constantes no estudo da repetibilidade (ex: analista e/ou dia (s) diferente (s)) ^[109].

A estimativa da precisão intermédia pode ser feita com o cálculo do seu desvio padrão, através da equação 2.9 ^[108].

$$S_{i(c)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2} \quad (2.9)$$

Em que: $S_{i(c)}$ - desvio padrão da precisão intermédia; n - número de amostras; y_k - valor individual obtido; \bar{y} - média dos valores obtidos.

O coeficiente de variação da precisão intermédia pode depois ser calculado através da equação 2.10.

$$CV_r = \frac{S_{i()}}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.10)$$

Em que: \bar{x} - média das concentrações do número de ensaios realizados.

➤ **Recuperação**

Na maioria dos métodos analíticos ocorrem perdas do analito de interesse quando se realiza a sua extração de matrizes mais complexas. Consequentemente o valor resultante da medição poderá ser inferior à concentração exata presente na amostra original. Deste modo, a avaliação da quantidade de analito que pode ser adicionada à amostra, extraída e quantificada constitui um procedimento de validação importante [109]. A cada amostra devem ser adicionadas diferentes concentrações de analito, de acordo com a sua concentração esperada, nomeadamente:

- próxima da concentração máxima permitida de utilização;
- próxima do LD;
- próxima da concentração intermédia da gama de trabalho do método;
- entre 50 a 150% da concentração esperada do analito, em amostras com maiores concentrações do analito [108,113].

A recuperação é calculada, em percentagem, através da equação 2.11 [107].

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_{\text{fortificada}} - C_{\text{matriz}})}{C_{\text{adicionada}}} \times 100 \quad (2.11)$$

Em que: $C_{\text{fortificada}}$ - concentração da amostra fortificada; C_{matriz} - concentração da amostra não fortificada; $C_{\text{adicionada}}$ - concentração adicionada de analito.

➤ **Exatidão**

Constitui um indicador externo da utilidade e aplicabilidade do método em amostras reais, uma vez que indica a proximidade do valor obtido no ensaio de uma amostra com o seu valor de referência, aceite como verdadeiro. Uma das formas de analisar

amostras com valores de referência atribuídos e precisos consiste em analisar Materiais de Referência Certificados (MRC), fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como por exemplo o BCR (*Bureau Communautaire de Références*) ou através da participação em ensaios interlaboratoriais (EI), regulados por organismos como o FAPAS (*Food Analysis Performance Assessment Scheme*).

Deste modo, a comparação do valor obtido na análise de MRC com o respetivo valor certificado e valor de incerteza ou desvio padrão atribuídos pela entidade fornecedora, ou a participação em ensaios interlaboratoriais, permitem avaliar a exatidão do método. Esta comparação é feita com a aplicação de determinados processos de avaliação dos resultados, nomeadamente pela determinação do fator de desempenho Z, através da equação 2.12 ^[107,108].

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S} \quad (2.12)$$

Em que: X_{lab} - valor ou média dos valores obtidos pelo laboratório; X_v - valor certificado do MRC ou do EI; S - incerteza do valor do MRC ou desvio padrão do EI.

O valor de Z é depois avaliado numa escala que permite concluir acerca da exatidão valor, e conseqüentemente o do método:

- $|Z| \leq 2$, Satisfatório;
- $2 < |Z| \leq 3$, Questionável;
- $|Z| > 3$, Incorreto.

3. OBJETIVOS DO TRABALHO

O presente trabalho foi desenvolvido durante um período de estágio nas instalações do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP (INSA) e teve como principais objetivos:

- Otimização e validação de um método analítico com separação por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com deteção na região do ultravioleta (UV), de acordo com os princípios base da Norma EN 12857;
- Análise do teor de ciclamato em diferentes tipos de adoçantes de mesa;
- Análise da variabilidade do teor deste edulcorante em embalagens do mesmo lote e entre lotes diferentes;
- Avaliação do impacto dos resultados na exposição alimentar.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento desenvolvido para a determinação de ciclamato em adoçantes de mesa teve por base a norma EN 12857, que define um método de HPLC-UV para a determinação deste edulcorante em diferentes tipos de produtos alimentares. Como referido no capítulo 2.6., a tecnologia de HPLC é a mais utilizada para a determinação de ciclamato. No entanto, a utilização de detetores ultravioleta, acoplados a esta tecnologia de separação é rara para este tipo de analito.

Os únicos métodos de HPLC-UV desenvolvidos para este fim consistiram na realização de pré-tratamentos às amostras, ou sem pré-tratamento, mas com a adição de corantes específicos. Os métodos com pré-tratamento envolvem procedimentos de derivatização, ou de oxidação seguida de derivatização. Foi igualmente desenvolvida uma Norma Europeia, EN 1379, que descreve um método de análise de HPLC-UV direto, sem necessidade de pré-tratamento das amostras. Esta norma foi desenvolvida para a determinação de ciclamato e sacarina em preparações líquidas de adoçantes de mesa ^[91]. Não obstante esta norma ter sido desenvolvida para aplicação nas amostras em estudo, optou-se por não a seguir, sendo que as razões irão ser abordadas na discussão de resultados.

Optou-se por adotar um procedimento com base na norma EN 12857, que tem por princípio de aplicação a derivatização do ciclamato em N,N-diclorociclohexilamina, sensível à radiação ultravioleta ^[90]. Este produto derivatizado foi posteriormente separado numa coluna cromatográfica de fase reversa e detetado a um comprimento de onda de 314 nm. A identificação do ciclamato nas amostras foi realizada por comparação com os tempos de retenção das soluções padrão. A quantificação foi feita por padronização externa com base numa curva de calibração.

4.1. Equipamento

Os equipamentos necessários durante o desenvolvimento deste trabalho foram os seguintes:

- sistema cromatográfico de alta resolução, marca *Waters*, modelo A2695, equipado com bomba quaternária, forno de coluna, injetor automático e detetor de arranjo de diodos UV-Vis DAD da marca *Waters* e modelo 2996. O sistema de aquisição e tratamento dos dados foi realizado pelo *software* Empower[®];

- coluna cromatográfica *LiChrospher 60 RP-select B*, de fase reversa com 5 μm de porosidade, 25 cm de comprimento e 4 mm de diâmetro, marca *Merck Millipore*;
- espectrofotómetro, *Thermo Scientific Evolution 300*, e aquisição de dados realizada com o programa *VISIOpro*;
- banho de ultrassons, marca *Branson (ultrasonic cleaner)* com controlo de tempo e temperatura, modelo *Branson 3510*;
- sistema de ultrapurificação de água, marca *Millipore*, modelo *Milli-Q*;
- frigorífico a 4°C, marca *Fiocchetti*;
- moinho automático, marca *IKA*, modelo *A 11 B*;
- balança analítica, marca *Mettler Toledo*, modelo *XP 204*;
- dispensador automático.

4.2. Reagentes

Os reagentes e padrão de ciclamato utilizados e respetivas especificações do fabricante estão apresentados na Tabela 4.1. No decorrer das análises utilizou-se água com uma pureza de, pelo menos, grau II, obtida a partir de um sistema de purificação Mili-Q (Millipore).

Tabela 4.1 - Reagentes utilizados e especificações do fabricante.

Reagente	Marca	Formula
Ciclamato de hemi-cálcio (>99%)	Sigma-Aldrich	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_3\text{S} \cdot 1/2\text{Ca}$
Hipoclorito de sódio (2% cloro ativo)	Lixivia Super	NaClO
Sulfato de sódio anidro ($\geq 99,0\%$)	Merck	Na_2SO_4
Carbonato de sódio ($\geq 99,8\%$)	Riedel-de- Haën	Na_2CO_3
N-Heptano, para HPLC (>99%)	Prolabo VWR	C_7H_{16}
Ácido sulfúrico (96%)	Suprapur	H_2SO_4
Metanol, para HPLC (>99%)	Prolabo VWR	CH_3OH
2-Propanol (>99.8%)	Prolabo VWR	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$

4.3. Soluções

➤ **Solução de ácido sulfúrico 50%**

Esta solução foi preparada através da adição de 92 mL de água para um recipiente apropriado, sendo depois adicionados 100 mL de ácido sulfúrico (96%), o que resultou numa solução com uma concentração de 50%.

➤ **Solução de carbonato de sódio 5%**

Procedeu-se à pesagem de 50 g de carbonato de sódio para um balão volumétrico de 1000 mL, sendo o volume completado com água. Após homogeneização com agitação magnética esta solução ficou com uma concentração de 5%.

➤ **Solução padrão *stock* de ácido ciclâmico**

Para a preparação das soluções padrão de calibração, foi utilizada uma solução padrão *stock* de ácido ciclâmico com uma concentração de 2 mg/mL. Esta solução foi preparada a partir da pesagem de 445,0 mg de ciclamato de hemi-cálcio (que corresponde a uma massa de 400 mg de ácido ciclâmico), e diluição com água para um balão volumétrico de 200 mL.

➤ **Fase móvel**

Foi utilizada uma fase móvel constituída por metanol e água na proporção 80:20, respetivamente. O metanol e a água foram preparados separadamente em frascos de fase móvel, tendo sido desgaseificados durante cerca de 20 minutos num banho de ultrassons.

4.4. Amostras

Foram adquiridas amostras de adoçantes de mesa, nas suas três formas disponíveis, granulado (pó), líquido e em comprimidos, em diferentes supermercados na região de Lisboa durante os meses de Outubro e Novembro de 2012. As matrizes destes adoçantes e respetiva composição em aditivos estão descritas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Adoçantes de mesa analisados e respetiva composição.

Adoçante de mesa	Composição (aditivos)	Validade
Granulado	Sacarina 0,8%, Ciclamato de sódio 8%	01-03-2015
Comprimidos	Sacarina, Ciclamato de sódio	01-06-2015
Líquido 1	Sacarina, Ciclamato de sódio, Ácido Sórbico, Taumatina	20-10-2014
Líquido 2	Sacarina 1,5%, Ciclamato de sódio 15%, Ácido Sórbico	01-03-2015

Para cada um destes adoçantes de mesa foram adquiridos três lotes, da seguinte forma: cinco embalagens de um mesmo lote, e uma embalagem de cada um de outros dois lotes, ou seja sete embalagens para cada adoçante perfazendo um total de vinte e oito embalagens de adoçantes de mesa.

Todas as amostras foram seladas hermeticamente com parafilme, após a sua primeira abertura, e armazenadas numa sala refrigerada (15°C).

4.5. Procedimento Analítico

4.5.1. Preparação das amostras

➤ Moagem e homogeneização

Dos três tipos de adoçantes de mesa analisados, os líquidos e granulado foram apenas homogeneizados manualmente. A pipetagem/pesagem do seu conteúdo foi feita diretamente das embalagens adquiridas. O adoçante em comprimidos foi moído através da utilização de um moinho automático de laboratório e homogeneizado manualmente. O granulado (pó) resultante foi distribuído por vários recipientes que foram hermeticamente fechados com parafilme.

➤ **Preparação das soluções das amostras para derivatização**

A partir das amostras homogeneizadas foram preparadas as soluções para análise. Das amostras no estado líquido foi pipetado 1 mL para balões volumétricos de 100 mL, tendo sido determinado, numa balança analítica, o respetivo peso.

Para as amostras granulada e em comprimidos foi realizada a pesagem de 0,5 g e/ou 0,1 g numa balança analítica e as soluções foram preparadas em balões volumétricos de 100 mL, perfazendo o volume com água.

Todas as soluções de amostras foram analisadas em triplicado, ou seja, de cada amostra homogeneizada foram preparadas três tomas (pesagem/pipetagem rigorosa). À terceira toma de cada amostra foi adicionada uma quantidade conhecida de analito a partir de soluções padrão *stock*, como está esquematizado na Figura 4.1. A preparação desta terceira toma teve por objetivo calcular a taxa de recuperação de ciclamato adicionado.

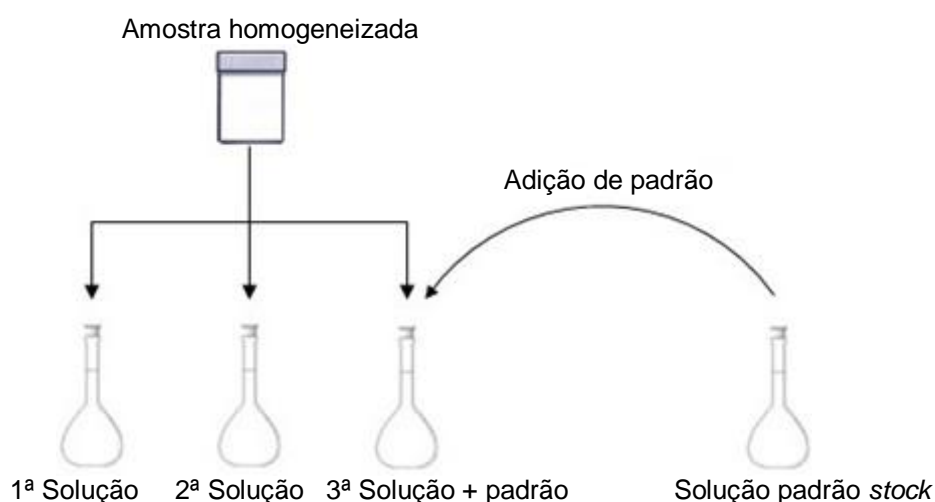


Figura 4.1 - Representação do procedimento para a análise das amostras em triplicado.

O volume da solução padrão *stock* adicionado tentou corresponder, aproximadamente, a 100% da quantidade de analito existente na toma (pesagem/pipetagem) de cada tipo de amostra.

Devido à elevada concentração em que o ciclamato se encontra nos adoçantes de mesa, foi necessário preparar soluções padrão *stock* adicionais, com uma concentração superior à da solução padrão *stock* (2 mg/mL) utilizada para preparar as soluções padrão de calibração. Deste modo para a análise das diferentes amostras, foram preparadas soluções *stock* adicionais cujas concentrações e volumes a

adicionar à terceira toma variaram consoante a quantidade de ciclamato existente em cada amostra.

4.5.2. Procedimento de derivatização

A solução padrão *stock* e as soluções das amostras foram sujeitas a um procedimento de derivatização, realizado em ampolas de decantação com a adição dos mesmos reagentes, como apresentado na Tabela 4.3.

Ao longo da análise das amostras (ensaios regulares) usou-se 20 mL da solução padrão *stock* e das soluções das amostras, e os volumes de reagentes recomendados pela norma.

Durante a validação do método, nomeadamente nos ensaios de avaliação da homogeneidade das variâncias, foi utilizado um volume de solução padrão *stock* de 100 mL e volumes de reagentes de derivatização cinco vezes superiores aos utilizados nos ensaios regulares.

Tabela 4.3 - Procedimento de derivatização e respetivos volumes de reagentes e tempos de agitação para as soluções padrão de calibração e amostras.

Reagentes	Ensaio regulares (curva de calibração)	Ensaio regulares (amostras)	Ensaio de homogeneidade
Soluções das amostras (mL)	-	20	-
Sol. padrão <i>stock</i> ácido ciclâmico (mL)	20	-	100
Ácido sulfúrico (mL)	1	1	5
n-heptano (mL)	10	10	50
Lixívia (mL) (hipoclorito de sódio)	2,5	2,5	12,5
Agitação (min)	1	1	5
Descarte da fase aquosa			
Carbonato de sódio (mL)	25	25	125
Agitação (min)	0,5	0,5	2,5
Descarte da fase aquosa			

Posteriormente, a fase orgânica (n-heptano) contendo o produto derivatizado foi seca e filtrada. A filtração foi realizada com um papel de filtro ao qual, previamente, se adicionou cerca de 1 g de sulfato de sódio anidro. O filtrado foi depois sujeito a uma nova filtração com recurso a uma seringa e êmbolo, utilizando um microfiltro específico para soluções orgânicas (PVDF), com poros de diâmetro de 0,45 µm. Para os ensaios regulares as duas filtrações foram realizadas para tubos de 15 mL e nos ensaios de homogeneidade para uma proveta e um erlenmeyer de boca esmerilada de 100 mL.

4.5.3. Preparação das soluções padrão de calibração

A partir da solução padrão *stock* derivatizada (2 mg/mL) foram realizadas diluições com n-heptano em balões volumétricos de 10 mL, correspondendo aos seis pontos da curva de calibração utilizada, cujas concentrações finais de ácido ciclâmico foram: 40, 70, 100, 130, 160 e 200 mg/L.

4.5.4. Diluição das amostras

Para as soluções derivatizadas das amostras foi necessário realizar diferentes diluições com n-heptano, em balões volumétricos de 5, 10 e 20 mL, dependendo do teor de ciclamato nos diferentes adoçantes de mesa, de modo a que o teor determinado se situasse dentro da gama de trabalho utilizada. No caso das soluções de recuperação (terceira toma com adição de padrão) foram realizadas diluições duas vezes superiores às das soluções sem adição.

Ambas as soluções padrão de calibração e das amostras foram depois pipetadas para viais e introduzidas no sistema de HPLC. Na Figura 4.2 está representado um fluxograma no qual está esquematizado o procedimento descrito.

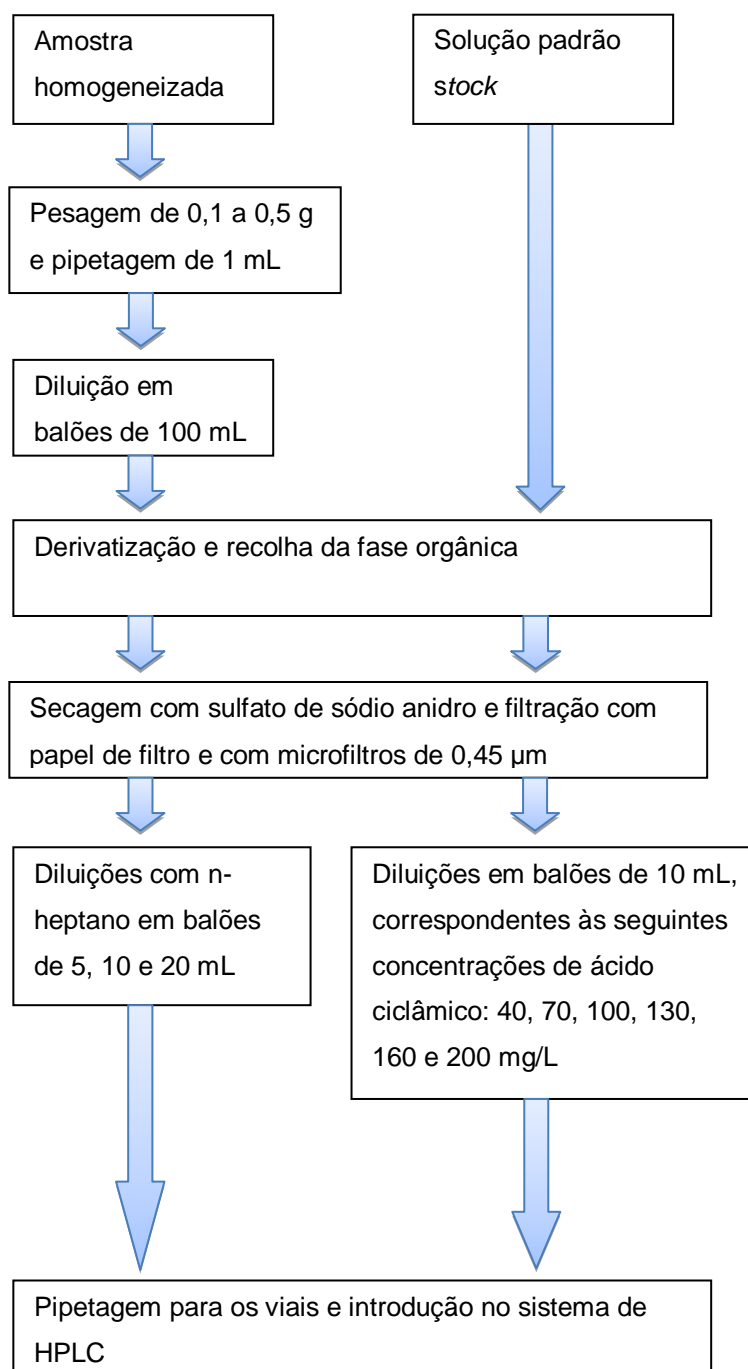


Figura 4.2 - Fluxograma do procedimento analítico de preparação de soluções para introdução no sistema de HPLC.

4.5.5. Condições cromatográficas

Os estudos de otimização do procedimento analítico, que serão descritos no capítulo 5.1, resultaram no estabelecimento das condições cromatográficas para a análise das soluções padrão e das amostras apresentadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Condições cromatográficas na análise de ciclamato.

Parâmetros	Condições
Modo de separação	Fase reversa
Fase móvel	Metanol (80%) e Água (20%) em modo isocrático
Fluxo	1 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Deteção (comprimento de onda)	314 nm
Temperatura do forno da coluna	37°C
Temperatura das amostras	5°C
Tempo de corrida	8 minutos

4.5.6. Identificação e quantificação do analito

A identificação do produto derivatizado foi realizada comparando os picos dos cromatogramas das soluções das amostras com os picos dos cromatogramas das soluções padrão, através da verificação do tempo de retenção.

A quantificação de ácido ciclâmico foi realizada através de uma padronização externa com a utilização de uma curva de calibração com seis pontos de concentração (mg/L). Esta curva foi construída de acordo com a relação entre as áreas obtidas e as concentrações das soluções padrão que foram injetadas. A equação da curva de calibração permitiu a determinação do teor de ácido ciclâmico nas amostras com base nas áreas dos respetivos picos.

As soluções dos padrões e das amostras foram introduzidas no sistema de HPLC no mesmo dia, tendo-se programado duas injeções para cada solução. A área para a quantificação de ciclamato resultou da média das áreas obtidas para as duas injeções

da mesma solução. Todos os cálculos para a obtenção do teor do analito nas amostras foram efetuados com recurso ao *software* Empower[®].

A determinação do teor de ácido ciclâmico, ρ , em mg/L ou a fração mássica, w , em mg/kg foi feita com recurso à equação 4.1, indicada pela norma EN 12857^[90], e introduzida numa folha de cálculo, presente no anexo 1.

$$w \text{ ou } \rho = \frac{\rho_{CS} \times V \times F}{m} \quad (4.1)$$

Em que: ρ_{CS} - concentração mássica de ácido ciclâmico na solução de amostra analisada e resultante da curva de calibração (mg/L); V - volume da solução de amostra (100 mL); F - fator de diluição; m - massa/volume da pesagem ou pipetagem das amostras em g ou mL.

Foi igualmente calculado o teor de ciclamato de sódio presente em cada amostra através da aplicação do fator de conversão de 0,8906, como indicado pela norma^[90], através da equação 4.2.

$$\text{Teor de ciclamato de sódio} = \frac{\text{Teor de ácido ciclâmico}}{0,8906} \quad (4.2)$$

4.6. Etapas de validação do método

No decorrer deste trabalho foram analisados e validados os parâmetros referidos e descritos no capítulo 2.8, com base no guia de validação laboratorial interna da RELACRE^[108], e no documento de controlo de qualidade interno para métodos cromatográficos do INSA^[112]. Na Tabela 4.5 estão apresentados os parâmetros validados no presente trabalho e o respetivo procedimento de validação. Todos os parâmetros foram avaliados em folhas de cálculo excel implementadas no DAN.

Tabela 4.5 - Parâmetros de validação do método e respetivos procedimentos.

Parâmetros	Procedimento
Gama de trabalho	A partir da solução padrão <i>stock</i> derivatizada foram preparadas dez réplicas independentes para as seguintes concentrações: 20, 40, 100, 120 e 200 mg/L, com vários pontos intermédios. Determinou-se o desvio padrão (S) e a variância (S^2) dos dez resultados referentes a cada nível de concentração.
Linearidade	Para a gama de trabalho definida foi avaliada a linearidade com três ensaios da curva de calibração. Depois de realizada a regressão linear foi efetuado o teste de <i>Mandel</i> (teste de <i>Fisher-Snedecor</i>), analisado o coeficiente de determinação e os resíduos obtidos.
Sensibilidade	Foi avaliada a variação da sensibilidade ao longo de todos os ensaios realizados, através do desvio padrão e coeficiente de variação (CV) de uma série de valores do declive (b) de várias equações de calibração.
Limite analíticos da curva de calibração (LQ e LD)	Os limites analíticos de quantificação (LQ) e de deteção (LD) foram determinados de duas formas diferentes: com base no desvio padrão residual da curva de calibração ($S_{y/x}$) e no declive (b); através da análise do CV das concentrações (mg/L) de uma série de leituras do primeiro ponto da curva de calibração em condições de precisão intermédia (dias diferentes). Os limites foram depois verificados com a realização de um ensaio de recuperação com adição padrão em concentração correspondente ao LQ definido e uma diluição posterior de 1/3 para confirmar o LD.
Limites do método	Os limites analíticos, em mg/L, foram convertidos em g/kg ou g/L, tendo em conta a toma máxima possível e os fatores de diluição aplicados às diferentes amostras.

4.7. Estudos de Precisão

➤ Repetibilidade

Para a determinação do CV da repetibilidade foi realizado um ensaio com seis réplicas independentes de cada tipo de amostra em análise sob condições de repetibilidade.

➤ **Precisão intermédia**

Para a determinação do CV da precisão intermédia foram realizados três ensaios de repetibilidade em três dias diferentes.

➤ **Repetibilidade do injetor**

A repetibilidade do injetor foi determinada através da programação, no sistema de HPLC, de dez injeções para o primeiro e último padrão da curva de calibração e análise do respetivo CV.

4.8. Exatidão

A exatidão do método foi determinada através da participação num ensaio interlaboratorial visto não existirem disponíveis materiais de referência contendo o analito em questão.

4.9. Testes Estatísticos

Com o objetivo de validar e analisar os resultados obtidos nos ensaios realizados foram utilizados os seguintes testes estatísticos:

- Homogeneidade das variâncias: Comparação da variância das réplicas do primeiro e último padrão. Existe homogeneidade de variâncias quando o valor de $PG \leq F(5,35)$;
- Teste de *Mandel*: análise da linearidade das curvas de calibração. A linearidade é verificada quando o valor de $PG \leq F(10,56)$;
- Análise dos parâmetros de curvas de calibração: comparação dos desvios padrão dos parâmetros de curvas de calibração (declive e ordenada na origem) para um intervalo de confiança de 95%;
- Teste ANOVA: avaliação da homogeneidade das variâncias dos teores de ciclamato das amostras, confirmando-se a homogeneidade do teor do analito quando $F \leq F_{\text{crítico}}$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como referido anteriormente, o presente trabalho teve por objetivo a otimização e validação de um método de HPLC-UV para a determinação de ciclamato em adoçantes de mesa, tendo sido adotado um procedimento baseado na norma EN 12857.

A decisão de adotar as diretrizes da norma EN 12857 foi tomada, apenas depois de se analisar com detalhe os resultados obtidos em dois ensaios teste realizados de acordo com o procedimento da norma EN 1379 e com um artigo publicado por Croitoru *et al.* ^[114]. Nestes ensaios foram testados valores de comprimento de onda de 200 nm, recomendado pela EN 1379, e de 196 nm, referido no artigo e justificado pelo espectro de absorção que foi traçado para uma solução padrão de ciclamato. A realização deste espectro teve por objetivo verificar como variava a absorção do ciclamato ao longo da gama do UV e qual era o seu máximo de absorção, sendo que foi verificada a não absorvância do ciclamato nesta gama (Figura 1 do anexo 2).

Em ambos os ensaios obtiveram-se picos cromatográficos de ciclamato com uma absorção e resolução muito reduzidas (Figura 3 e 4 do anexo 3). A pobre resolução dos picos cromatográficos e o espectro de absorção vieram reforçar o que já tinha sido constatado na revisão bibliográfica, acerca da baixa absorção deste edulcorante na região do UV.

A norma EN 12857, embora já tivesse sido testada com sucesso por técnicos superiores do INSA em ensaios interlaboratoriais, nunca foi validada internamente nem aplicada na análise de ciclamato em adoçantes de mesa.

Apesar do facto de nesta norma, não constar que o seu procedimento pode ser ou que foi aplicado (na altura do seu desenvolvimento) na análise de adoçantes de mesa, a matriz pouco complexa destes produtos é semelhante à de bebidas aromáticas à base de água para as quais a norma já foi aplicada. Por outro lado, o processo de derivatização do ciclamato para posterior absorção de radiação UV é um procedimento “universal” que pode ser aplicado em qualquer tipo de amostra homogeneizada. A validade destas considerações veio a ser confirmada, após a análise das amostras em estudo.

Para além de poder ser aplicada na análise de matrizes alimentares mais simples, como bebidas aromatizadas à base de água e adoçantes de mesa, a norma pode igualmente ser utilizada na análise de produtos alimentares mais complexos, (ex: chocolates, geleias, entre outros) ^[90]. Esta ampla aplicabilidade poderá permitir, no futuro, a sua utilização noutras matrizes alimentares em análises de rotina nos

laboratórios do DAN, com os devidos parâmetros revalidados caso sejam feitas alterações significativas ao método validado neste trabalho.

5.1. Otimização do Procedimento Analítico

Com o objetivo de otimizar o procedimento descrito na norma 12857, foram testadas algumas alterações, e efetuada uma análise crítica de alguns parâmetros, nomeadamente ao nível da preparação das soluções padrão e das condições cromatográficas recomendadas.

5.1.1. Preparação das soluções padrão

A norma EN 12857 descreve que as soluções padrão de calibração devem ser preparadas a partir de seis diluições de uma solução padrão *stock* (4mg/mL) em balões volumétricos de 100 mL e posterior derivatização de cada uma dessas soluções individualmente ^[90]. Este procedimento foi seguido, inicialmente para a gama de trabalho indicada pela norma (10-800 mg/L), e também para outras gamas de trabalho (40-400, 40-200 e 100-200 mg/L), tendo sido realizados estudos de validação relativos à adequabilidade da gama (estudo da homogeneidade das variâncias).

No entanto, não foi possível validar nenhuma das curvas de calibração testadas nestas gamas de trabalho, não tendo sido possível obter homogeneidade de variâncias.

Verificou-se uma diferença significativa entre a variância do sinal obtido (área dos picos) das réplicas do primeiro e último padrão das diferentes gamas testadas, resultando sempre em valores de PG superiores ao valor de F.

Devido ao elevado teor de ciclamato presente nos adoçantes de mesa, a definição de uma gama de trabalho numa zona de concentrações elevadas seria desejável porque poderia evitar a necessidade de se efetuar diluições adicionais. Porém, tal não se tornou viável, pelo que a não linearidade e a diferença entre as variâncias registada e deveram-se, provavelmente, às reações individuais de derivatização realizadas para cada solução padrão e para cada réplica no ensaio de homogeneidades.

Deste modo, foi testado um procedimento alternativo para a preparação das soluções padrão na tentativa de validar uma curva de calibração do método. Este procedimento consistiu numa derivatização direta de um determinado volume da solução padrão

stock, e posterior realização das diluições adequadas aos pontos da curva de calibração a partir da solução derivatizada. Esta alteração permitiu reduzir a variabilidade associada à derivatização das seis soluções, aconselhada pela norma, uma vez que se traduziu na realização de uma única derivatização.

Este procedimento foi adotado, apenas depois dos seus resultados terem sido comparados com os determinados pelo procedimento indicado na norma. Para tal, foram realizados dois ensaios de acordo com os dois procedimentos para uma determinada gama de trabalho, a partir da mesma solução padrão *stock*. Os resultados obtidos permitiram concluir que a realização do novo procedimento é equivalente. Esta constatação foi justificada pelo facto de haver uma sobreposição das curvas de calibração obtidas, e pelos valores do declive e da ordenada na origem da curva do novo procedimento se encontrarem dentro dos limites dos desvios padrão dos mesmos parâmetros da curva do procedimento descrito na norma, para um intervalo de confiança de 95% ^[115]. Esta comparação está apresentada no anexo 4.

A adoção deste novo procedimento para a preparação das soluções padrão permitiu, não só, validar uma gama de trabalho e respetiva curva de calibração, como também poupar tempo de execução de forma significativa.

5.1.2. Tempo de corrida cromatográfica

O tempo de corrida de oito minutos foi adotado depois de confirmar o tempo de retenção do produto derivatizado (entre 5,2 a 5,4 minutos), tendo-se optado por não utilizar o tempo recomendado pela norma, de 15 minutos para os padrões e 30 minutos para as amostras. Estes tempos recomendados pela norma podem ser devidos ao facto da coluna cromatográfica utilizada durante o seu desenvolvimento ser diferente à utilizada no presente trabalho.

A redução do tempo de corrida permitiu, não só reduzir o tempo realização de cada ensaio, mas também uma poupança substancial nos reagentes utilizados na fase móvel, sem comprometer a separação do analito e a resolução dos picos cromatográficos.

5.1.3. Volume de injeção

O volume de injeção de 20 μL para as soluções dos padrões e amostras, como definido pela norma, foi considerado como sendo adequado após a realização de alguns ensaios de teste.

Nestes ensaios prepararam-se réplicas independentes de curvas de calibração que foram injetadas consecutivamente com volumes de injeção de 10 e 20 μL . Este procedimento teve por objetivo avaliar as diferenças no formato e resolução dos picos cromatográficos. Nas Figuras 5.1 e 5.2 estão representados dois cromatogramas obtidos com um volume de injeção de 10 e 20 μL , respetivamente.

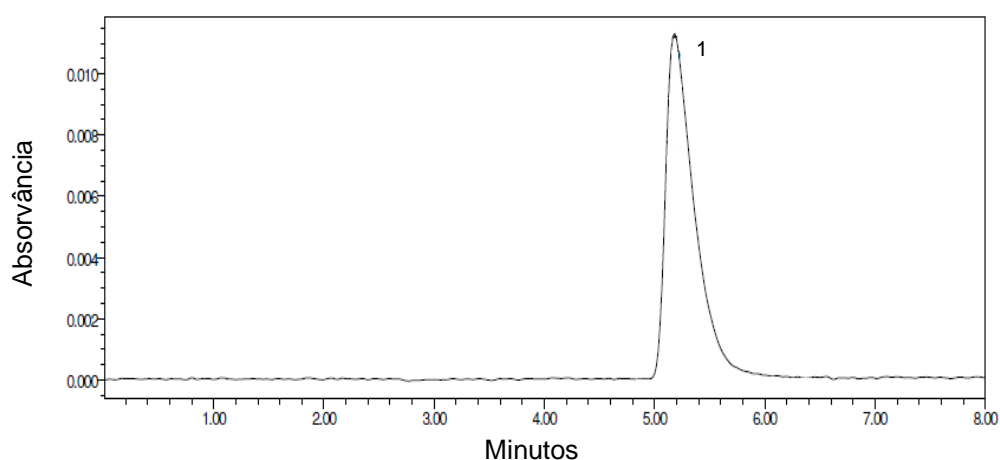


Figura 5.1 - Cromatograma de uma solução padrão com um volume de injeção de 10 μL .

1 - N,N-diclorociclohexilamina, tempo de retenção (TR) = 5,2 minutos.

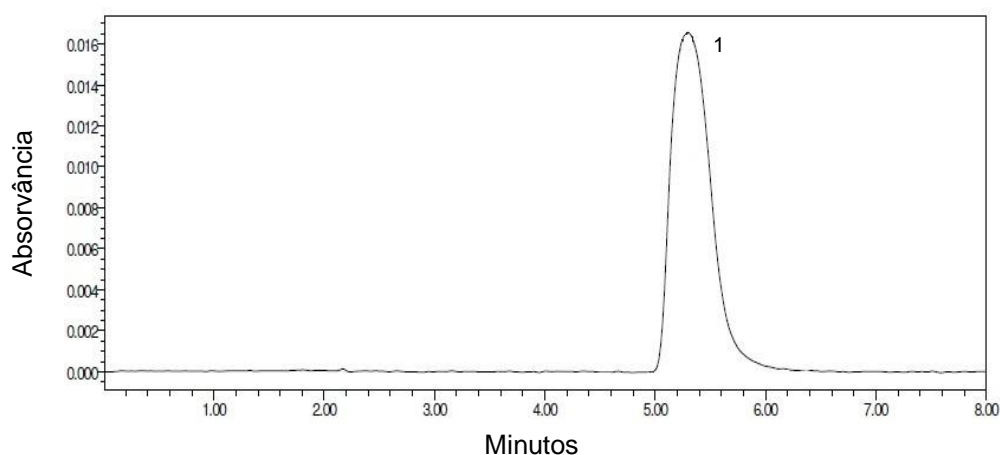


Figura 5.2 - Cromatograma de uma solução padrão com um volume de injeção de 20 μL .

1 - N,N-diclorociclohexilamina, tempo de retenção (TR) = 5,2 minutos.

Os picos cromatográficos resultantes das injeções com volume de 10 μL apresentaram um menor “arredondamento” comparativamente com os picos resultantes de um volume de injeção de 20 μL .

No entanto, visto esta ser a única alteração, não se justificou alterar o volume de injeção do procedimento descrito na norma. Para além disto, a realização de injeções a 20 μL permitiria, se necessário no futuro, programar maiores diluições para as amostras no sistema de HPLC, através da diminuição do volume de injeção.

5.1.4. Fluxo de fase móvel

As soluções padrão das curvas de calibração preparadas foram também analisadas no sistema de HPLC com um fluxo de fase móvel superior ao recomendado pela norma de 1 mL/min. Foi testado um fluxo de 1,4 mL/min tendo em conta a pressão resultante no sistema. Com este fluxo a separação do produto derivatizado foi mais rápida, tendo-se obtido cromatogramas com um tempo de retenção de cerca de 3,8 minutos para a N,N-diclorociclohexilamina, como se observa na Figura 5.3.

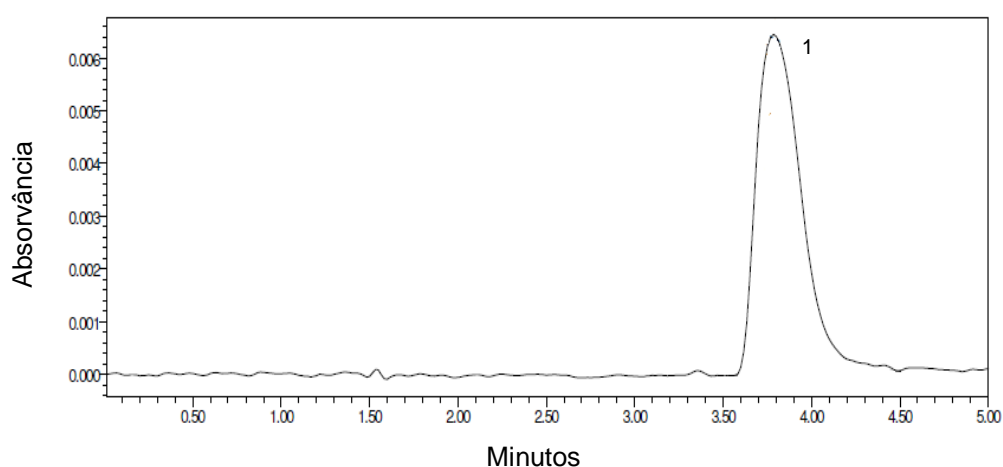


Figura 5.3 - Cromatograma de uma solução padrão com um fluxo de fase móvel de 1,4 mL/min.
1 - N,N-diclorociclohexilamina, TR = 3,8 minutos.

A adoção deste fluxo de fase móvel permitiria reduzir o tempo de corrida e poupar reagentes de fase móvel. Como é possível ver, por comparação da Figura 5.3 com a 5.2, foi possível reduzir o tempo de corrida de oito para cinco minutos, que permitiria poupar, aproximadamente, 2,4 e 0,6 mL de metanol e água por cada injeção no sistema, respetivamente. No entanto, estas diferenças não seriam significativas o suficiente que compensassem a sujeição do sistema às maiores pressões resultantes deste maior fluxo (2400-2500 psi) durante os vários ensaios laboratoriais a realizar.

Estas condições poderiam conduzir a um maior desgaste da coluna a longo prazo, sendo que se optou por utilizar o fluxo de 1 mL/min, recomendado pela norma, com uma pressão de 1700-1800 psi.

5.1.5. Composição da fase móvel

A composição da fase móvel utilizada neste trabalho e respetiva proporção teve por base a indicação da norma, de 80% de metanol e 20% de água. Esta refere que dependendo da coluna utilizada a proporção poderá ser ligeiramente modificada caso se verifiquem melhores resultados experimentais. De um modo geral, o aumento da proporção da fase orgânica em relação à fase aquosa aumenta a polaridade da fase móvel resultando numa eluição mais rápida de alguns analitos.

No decorrer deste trabalho, esta proporção não foi alterada uma vez que os picos cromatográficos obtidos apresentavam uma boa resolução e um bom tempo de retenção, não se justificando a avaliação do efeito deste parâmetro na corrida cromatográfica.

Tendo por base a metodologia analítica do presente trabalho, outras publicações, referem o uso de acetonitrilo em vez de metanol ^[116,117]. No entanto, foi relatado que não existem diferenças notórias na utilização de um ou outro solvente orgânico, sendo que a maior toxicidade e custo do acetonitrilo tende a dar preferência à utilização de metanol ^[118].

5.1.6. Temperatura da coluna

A norma não especifica qual a temperatura aconselhada a programar para o forno da coluna cromatográfica. No decorrer dos ensaios a temperatura situou-se sempre nos 37°C, que no equipamento de HPLC utilizado se encontra como o valor estabelecido por definição.

Não obstante este facto, verificou-se que este valor foi adequado para a separação do ácido ciclâmico. Embora não tenha sido avaliado o impacto da variação deste parâmetro nos resultados experimentais, nomeadamente a nível do tempo de retenção do analito, algumas publicações referem análises semelhantes à temperatura próximas da utilizada neste trabalho ^[116,118].

5.1.7. Comprimento de onda de deteção

O estabelecimento de um comprimento de onda de 314 nm, na gama do ultravioleta, como aconselhado pela norma, provou ser adequado para o objetivo proposto deste trabalho. A alteração deste parâmetro, sobretudo nos valores de 200 nm, poderia resultar na obtenção de cromatogramas com diferentes tipos de interferentes.

Dong *et al.*, e Shao *et al.*, avaliaram a absorção da N,N-diclorociclohexilamina numa ampla gama de comprimento de onda, e referem dois máximos de absorção a 210 nm e a 314 nm. No entanto, a 210 nm verificaram que existem interferências substanciais da fase móvel e do solvente utilizado. Deste modo, o comprimento de onda de 314 nm foi aceite como sendo o mais seguro e consensual^[116,119].

Com o objetivo de comprovar estes dados procedeu-se à realização de um espectro de absorção para uma solução padrão de ciclamato derivatizada de 100 mg/L, tendo-se registado dois máximos de absorção, a sensivelmente 210 e 314 nm, como é possível observar na Figura 2 do anexo 2.

Os estudos de otimização efetuados resultaram em alterações significativas em algumas etapas do procedimento analítico descrito na norma, nomeadamente o novo modo de preparação de soluções padrão adotado e a redução do tempo de cada corrida cromatográfica. Embora o estudo de algumas das condições cromatográficas, recomendadas pela norma, não tenha resultado na sua alteração foi importante para justificar a sua adequabilidade no procedimento analítico em questão (Tabela 4.4).

5.2. Validação do Método

Com o objetivo de analisar cada um dos tipos de amostras em estudo, com rigor e precisão, foram avaliados os parâmetros de validação do método e respetivas equações, descritos no capítulo 2.8.

➤ Gama de trabalho

Como referido no capítulo 5.1.1 não foi possível validar as gamas testadas no início deste trabalho. Verificou-se que quanto maior o valor da concentração do limite superior da gama testada maior era a diferença das variâncias entre as réplicas do primeiro e último padrão.

Deste modo, na aplicação do novo procedimento de preparação das soluções padrão, optou-se por reduzir a gama de trabalho descrita na norma. Foi realizado um ensaio para uma gama entre os 20 e os 200 mg/L, com vários pontos intermédios com o objetivo de se realizarem diferentes curvas de calibração e de se avaliar a sua homogeneidade e linearidade (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Gamas de trabalho testadas.

Concentração (mg/L)	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Número de réplicas independentes	10	10	1	1	10	10	1	1	1	10

Os resultados deste ensaio permitiram avaliar a adequabilidade das seguintes gamas de trabalho: 20 - 120; 20 - 200; 40 - 200 e 100 - 200 mg/L. Em todas estas gamas houve homogeneidade de variâncias. No entanto, os resultados obtidos para o maior intervalo (20 – 200 mg/L) não conseguiram obter linearidade, tendo havido resíduos superiores a 10% para o ponto de 20 mg/L.

Optou-se então por utilizar o intervalo seguinte de maior amplitude, de 40 a 200 mg/L, como a gama de trabalho do método. Na Tabela 5.2 está apresentado o sinal obtido para cada uma das dez réplicas realizadas, na gama de trabalho definida.

Tabela 5.2 - Intensidade do sinal das dez réplicas de cada padrão e respetiva variância (S_i^2).

Réplica	Intensidade do sinal (áreas dos picos cromatográficos)	
	Primeiro padrão de calibração (40 mg/L)	Último padrão de calibração (200 mg/L)
1	171046	828500
2	168638	830211
3	171500	834861
4	170826	829126
5	168063	836903
6	172206	833647
7	172997	829377
8	173802	836767
9	170238	828605
10	169435	835880
S_i^2	3405943	12592875

Para o intervalo de 40 a 200 mg/L foi calculada, através da equação 2.1, a variância para as réplicas de cada um dos seus pontos extremos e o quociente dos valores resultantes, com as equações 2.2 ou 2.3, respetivamente, tendo sido determinado um valor de PG de 3,7.

Como o valor tabelado da distribuição F de *Snedecor/Fisher*, para $n - 1$ graus de liberdade, é de 5,35, concluiu-se que a gama de trabalho selecionada está bem ajustada. Um exemplo da folha de cálculo utilizada para a avaliação da homogeneidade das variâncias está presente no anexo 5.

➤ Linearidade da curva de calibração

Inicialmente foi avaliada a linearidade de diferentes curvas de calibração com diferentes combinações de pontos intermédios para a gama de trabalho definida de 40 a 200 mg/L (Tabela 5.1), através das duas formas descritas no capítulo 2.8. Verificou-se que existia linearidade através do teste de *Mandel*, tendo igualmente sido verificados coeficientes de determinação e resíduos aceitáveis.

No entanto, devido a alguma irregularidade na distribuição dos pontos intermédios, optou-se por definir dois novos pontos (70 e 130 mg/L) para a mesma gama de trabalho com o objetivo de estabelecer uma distribuição equitativa entre os pontos pela gama de trabalho.

Procedeu-se, então, à realização de um ensaio no qual foram preparadas três réplicas da curva de calibração, através do procedimento de preparação das soluções padrão, descrito no capítulo 4.5. Neste ensaio, em vez de realizar um procedimento de derivatização e posteriores diluições, realizaram-se três procedimentos de derivatização com três volumes de 20 mL da mesma solução padrão *stock*. Isto teve por objetivo avaliar mais detalhadamente a linearidade da nova curva de calibração e a possível variabilidade associada à sua realização.

A partir dos resultados obtidos foi feita a comparação do seu modelo linear com o não linear recorrendo ao teste de *Mandel*, através das equações 2.4 e 2.5, que permitiram calcular os valores de PG de cada curva de calibração, que estão apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Valores de PG para as três réplicas da curva de calibração.

Curva de calibração	PG
1	1,27
2	0,09
3	0,27

Estes valores foram então comparados com o valor tabelado de F, de *Snedecor/Fisher* para n - 3 graus de liberdade, de 10,56. Como os valores de PG para as três réplicas da curva foram inferiores a F, foi possível concluir que a função de calibração linear conduzia a um bom ajuste dos pontos experimentais, existindo linearidade na curva utilizada. No anexo 6 está apresentado um exemplo da folha de cálculo utilizada para realizar o teste de *Mandel* das curvas de calibração.

Na Figura 5.4 estão representadas as três curvas de calibração obtidas neste ensaio.

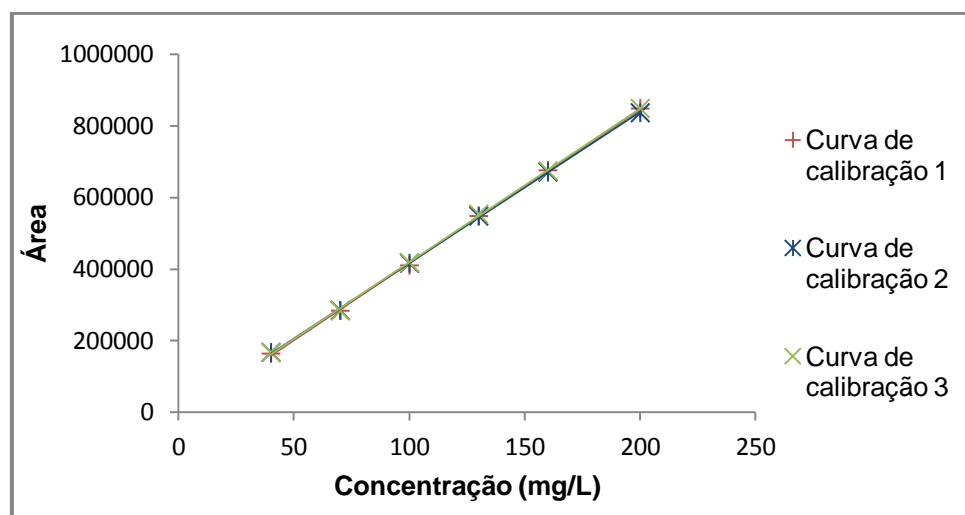


Figura 5.4 - Curvas de calibração para a validação do método.

Curvas de calibração: 1- $y = 4304,7x - 14127$; 2- $y = 4212,9x - 4506,2$ e 3- $y = 4283,5 - 9117,5$.

A linearidade foi também confirmada através da análise do coeficiente de determinação (r^2) e dos resíduos gerados para cada padrão da curva. De acordo com o guia de controlo interno de qualidade do INSA o coeficiente de determinação deve ser maior ou igual a 0,995 ^[112]. Os coeficientes de determinação das curvas de calibração apresentadas na Figura 5.4 foram os seguintes: 0,999274; 0,999720 e 0,999361, para as curvas de calibração 1, 2 e 3, respetivamente. Pelo que se confirmou o cumprimento deste parâmetro.

Na Figura 5.5 está representado um gráfico de análise dos resíduos, correspondentes ao desvio percentual das áreas (intensidade do sinal) obtidas para os diferentes pontos de calibração. Como é possível verificar todos os resíduos se encontram abaixo de 10%, estando dentro do limite aceitável, sendo que também não se verifica nenhuma tendência na sua variabilidade ao longo dos diferentes pontos. Esta percentagem máxima de 10% para aceitação dos resíduos dos diferentes pontos da curva de calibração foi definida pelo controlo de qualidade interno do INSA ^[112].

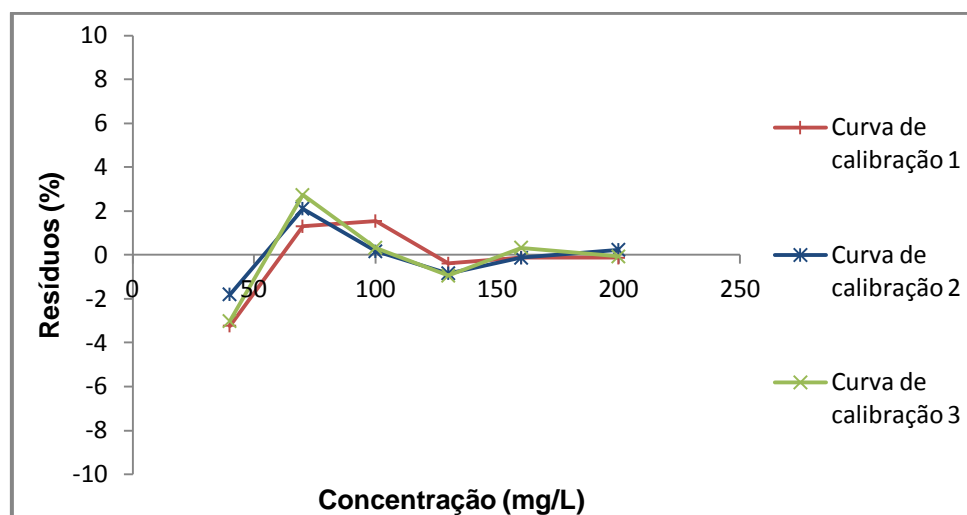


Figura 5.5 – Percentagem dos resíduos nos diferentes pontos das curvas de calibração.

Tendo sido verificada a linearidade da curva de calibração através da comparação dos modelos lineares e não lineares acima referidos, a conformidade das curvas preparadas em todos os ensaios posteriores teve por base a análise gráfica do coeficiente de determinação e dos resíduos obtidos. Estes parâmetros estiveram sempre de acordo com os limites estipulados como aceitáveis

No anexo 7 está apresentado um exemplo de um relatório dos parâmetros de uma curva de calibração resultantes do processamento dos dados com o *software* Empower[®], onde é possível visualizar a equação da reta, o coeficiente de determinação e os resíduos (percentagens de desvio) obtidos com o ensaio.

➤ Sensibilidade

A partir da análise dos valores do declive das várias curvas de calibração que foram sendo preparadas ao longo do tempo foi avaliada a variação da sensibilidade do método. Na Tabela 5.4 está apresentada a média o desvio padrão e coeficiente de variação dos vários valores obtidos deste parâmetro.

Tabela 5.4 - Valores da sensibilidade do método, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV). Ua – unidades de absorvância.

Sensibilidade (ua mg/L)	4261
S (ua mg/L)	141
CV (%)	3,3

Verifica-se que a sensibilidade do método se manteve aproximadamente constante ao longo da realização dos múltiplos ensaios necessários para o desenvolvimento deste trabalho, apresentando um baixo coeficiente de variação.

➤ **Limites analíticos de deteção e de quantificação**

Como referido no capítulo 2.8 os limites de deteção (LD) e de quantificação (LQ) da curva de calibração podem ser determinados de diferentes formas. No desenvolvimento de métodos com base em funções lineares, ambos os limites são, usualmente, calculados a partir dos parâmetros da curva da calibração.

Com base nas equações 2.6 e 2.7 foram calculados os limites de deteção e de quantificação para todos os ensaios realizados. Os valores do LQ estiveram sempre abaixo do valor do primeiro ponto da curva de calibração (40 mg/L), permitindo confirmar a sua aceitabilidade, de acordo com os critérios de validação internos do INSA ^[112].

No entanto, no presente trabalho optou-se por utilizar o primeiro ponto da curva de calibração como LQ, e um terço deste valor como o LD. Deste modo, os valores dos limites analíticos da curva de calibração foram 40 e 13,3 mg/L de ácido ciclâmico para o LQ e LD, respetivamente.

A definição de 40 mg/L como o limite de quantificação foi baseada, principalmente, por termos de praticabilidade e pelo teor do analito em estudo ser sempre superior a este valor. Esta última constatação é justificada pelo facto do ciclamato se encontrar em concentrações muito elevadas nos adoçantes de mesa e pelo teor determinado nas amostras em cada ensaio ser o resultado de diluições que permitem fazer o seu controlo e enquadramento na gama de trabalho definida.

A precisão e exatidão do limite de quantificação foram verificadas através da análise do coeficiente de variação de dez leituras do primeiro ponto de curvas de calibração preparadas ao longo do tempo em diferentes ensaios, em condições de precisão intermédia (diferentes dias).

Na Tabela 5.5 estão apresentados os valores da média, desvio padrão e coeficiente de variação do LQ.

Tabela 5.5 - Concentração média, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV) do primeiro padrão definido como LQ, em dez ensaios realizados.

Ensaio	1º Padrão de calibração (mg/L)
1	40,2
2	40,7
3	41,3
4	40,6
5	41,1
6	40,4
7	37,4
8	40,4
9	39,7
10	40,2
Média	40,2
S (mg/L)	1,1
CV (%)	2,7

De acordo com a RELACRE o valor do coeficiente de variação deve ser menor ou igual a 10% ^[108], pelo que se conclui que o limite de quantificação definido apresenta uma precisão e exatidão aceitáveis.

➤ Verificação dos limites analíticos

Os limites de quantificação e deteção estabelecidos foram confirmados através da realização de dois ensaios de recuperação em duas amostras de adoçante de mesa que não continham ciclamato. Estes ensaios tiveram como objetivos a obtenção de uma concentração do analito equivalente ao LQ, devendo a sua taxa de recuperação situar-se entre os 80 e 120 %, e a confirmação gráfica do pico correspondente ao LD. Permitiram também verificar se existia algum tipo de interferência que pudesse afetar os valores destes limites analíticos. Na Figura 5.6 está apresentado um esquema do procedimento realizado.

Foram utilizados dois adoçantes, granulado e em comprimidos, sem ciclamato, sendo que o ensaio de recuperação foi realizado em duplicado (contrariamente ao procedimento normal de análise de amostras). Para cada uma das amostras, realizou-se o seguinte procedimento:

- preparação e análise de uma solução, sem adição do analito (soluções 1 e 4);
- preparação e análise de duas soluções com a adição de um volume de analito padrão correspondente à concentração do LQ (soluções 2, 3, 5 e 6).

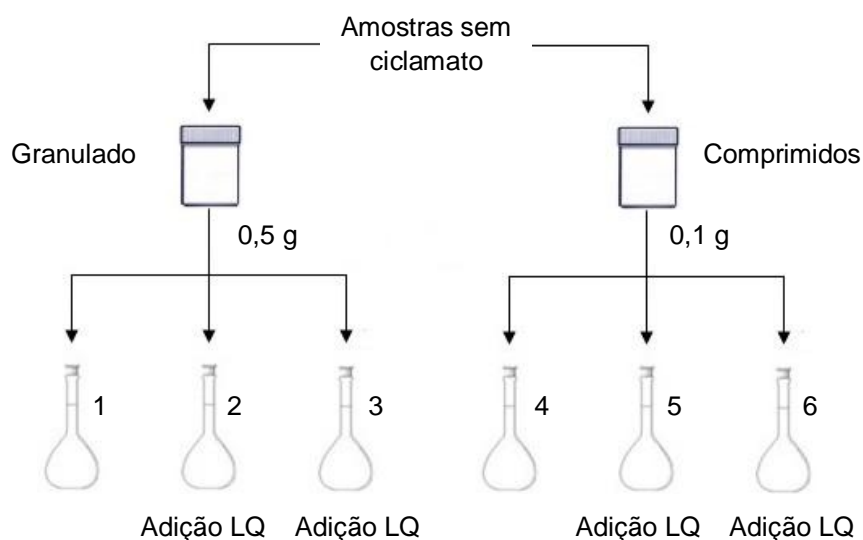


Figura 5.6 – Procedimento esquemático para a verificação do LQ.

A pesagem de apenas 0,1 g da amostra em comprimidos deveu-se ao facto de terem havido dificuldades para realizar a dissolução completa desta amostra em água no balão volumétrico de 100 mL e consequentemente na obtenção de uma solução suficientemente homogénea.

Foram adicionados 2 mL da solução padrão *stock* de 2 mg/mL, que após diluição nos balões de 100 mL corresponderam à concentração do LQ de 40 mg/L, seguidamente todas as soluções foram sujeitas ao processo de derivatização.

As soluções correspondentes ao LD foram obtidas a partir de uma diluição de 1/3 em n-heptano de cada uma das duas soluções com analito adicionado, posteriormente ao procedimento de derivatização. Na Tabela 5.6 estão apresentados os resultados destes ensaios, nomeadamente os valores das concentrações obtidas nas soluções fortificadas (LQ) e respetivas taxas de recuperação, e a confirmação da visualização do pico cromatográfico na soluções do LD.

Tabela 5.6 - Valores dos ensaios de recuperação para verificação do LQ e LD.

Amostras	Soluções com adição padrão	Limite de quantificação		Limite de deteção
		Concentração (mg/L)	Taxa de recuperação (%)	Pico cromatográfico
Granulada	Solução 2	39,3	98,4	Confirmado
	Solução 3	40,6	101,6	Confirmado
Comprimidos	Solução 5	40,2	100,5	Confirmado
	Solução 6	40,0	100,0	Confirmado

Tendo em conta os resultados obtidos foi possível definir de forma precisa e exata o padrão de concentração mais baixo da curva de calibração, 40 mg/L, como o limite de quantificação e um terço deste valor, 13,3 mg/L, como o limite de deteção. Além disto, as soluções 1 e 4 não apresentaram qualquer pico no tempo de retenção da N,N-diclorociclohexilamina, o que confirma a ausência de ciclamato nestas amostras.

➤ Limites do método

A partir dos limites analíticos da curva de calibração foram calculados os limites analíticos do método. Este cálculo é específico para o tipo de amostra que se está a analisar e tem em conta a grandeza do teor do analito presente, a toma realizada (pesagem/pipetagem), o volume no qual as amostras são diluídas e fatores de diluição adicionais aplicados. Na Tabela 5.7 estão apresentados os valores dos limites de quantificação e de deteção do método para as diferentes amostras em estudo, em g/L e g/kg para as amostras líquidas e sólidas, respetivamente. O cálculo do LQ do método teve por base a equação 4.1 na qual foi introduzida a concentração de 40 mg/L de ácido ciclâmico, um volume de diluição de 100 mL, fatores de diluição aplicados e as diferentes tomas de amostras realizadas, como está apresentado na tabela, sendo que foi considerado 1/3 do valor obtido como o LD do método.

Tabela 5.7 - Limites do método para cada matriz de amostra analisada.

Matriz da amostra	Toma da amostra	Limite de quantificação	Limite de deteção
Comprimidos	0,1 g	40 g/kg	13,3 g/kg
Granulado	0,5 g	8 g/kg	2,7 g/kg
Líquido	1 mL	4 g/L	1,3 g/L

Os limites do método, para a determinação de ciclamato em adoçantes de mesa, foram definidos para a toma de maior peso efetuada, neste caso a de 1 mL. Desta forma o método desenvolvido para o doseamento de ciclamato em adoçantes de mesa possui como LQ, 4 g/L, e como LD, 1,3 g/L. Tendo em conta que o ciclamato, se encontra sempre em elevadas concentrações nos adoçantes de mesa, é possível afirmar que os limites analíticos do método são adequados.

➤ Especificidade e seletividade

Com o objetivo de verificar a existência de algum interferente a um tempo de retenção semelhante ao do analito de interesse procedeu-se à avaliação da especificidade do método através dos cromatogramas resultantes da análise de adoçantes de mesa que não indicavam a presença de ciclamato no seu rótulo. Estes cromatogramas foram obtidos durante a realização dos ensaios de verificação do limite de quantificação e de deteção da curva de calibração. Nas Figuras 5.7 e 5.8 estão representados os cromatogramas de uma amostra de adoçante de mesa sem ciclamato e com ciclamato adicionado, respetivamente.

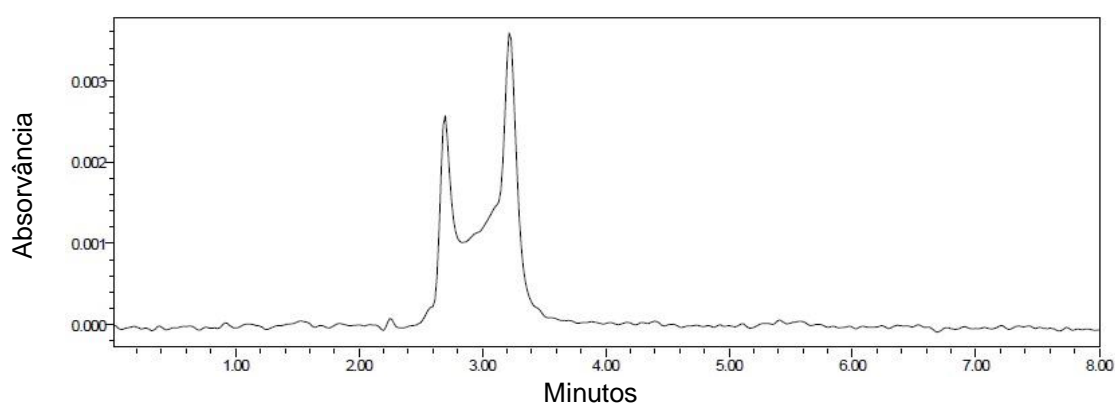


Figura 5.7 - Cromatograma de uma amostra sem ciclamato.

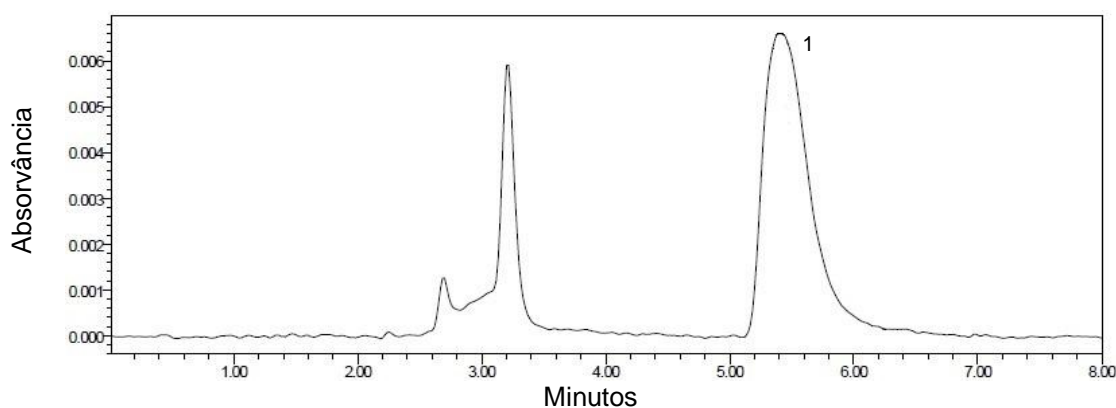


Figura 5.8 - Cromatograma de uma amostra com adição padrão de ciclamato.

1 - N,N-diclorociclohexilamina, TR = 5.4 minutos.

Através da análise da Figura 5.7 é possível verificar que não existe nenhum sinal no tempo de retenção da N,N-diclorociclohexilamina, permitindo concluir que o método é específico e seletivo para a separação e quantificação do analito.

➤ **Precisão**

Este parâmetro foi avaliado para os diferentes tipos de adoçantes de mesa em estudo, líquido, granulado e em comprimidos. Dos dois adoçantes de mesa em estado líquido (líquido 1 e 2) optou-se por avaliar a repetibilidade e precisão intermédia para apenas um deles (líquido 1), visto ambos possuírem o mesmo tipo de matriz.

Repetibilidade (Precisão Intra-ensaio)

Sob um conjunto de condições operatórias constantes, descritas no capítulo 2.8, procedeu-se à avaliação da repetibilidade do método. Foram analisadas, no mesmo dia e sob condições de repetibilidade, seis tomas independentes de uma embalagem do lote de adoçante para o qual foram adquiridas cinco embalagens. No anexo 8 está presente um exemplo da folha de cálculo utilizada para introduzir as concentrações de ácido ciclâmico determinado para as seis tomas. Para cada amostra foi calculado o coeficiente de variação de repetibilidade através da equação 2.8.

Precisão intermédia

Este parâmetro foi determinado através da realização dos ensaios da repetibilidade em três dias diferentes para cada amostra. A alteração desta condição experimental teve por objetivo concluir acerca da variabilidade dos resultados obtidos pelo mesmo método e no mesmo laboratório mas em dias diferentes com as concentrações resultantes de um total de dezoito tomas. Com a utilização das equações 3.10 e 3.11 calcularam-se o desvio padrão e o coeficiente de variação da precisão intermédia, respetivamente.

Na Tabela 5.8 estão apresentados os valores das concentrações médias das seis tomas em três dias diferentes para cada um dos adoçantes analisados e os respetivos coeficientes de variação da repetibilidade (CV_r) e da precisão intermédia (CV_R). As concentrações estão expressas em g/kg e g/L para os adoçantes de mesa sólidos e líquido, respetivamente.

Tabela 5.8 - Valores das concentrações médias obtidas e respetivos coeficientes de variação para a repetibilidade e precisão intermédia.

Adoçante de mesa	Dia	Concentração média (g/kg e g/L) e desvio padrão	Repetibilidade CV _r (%)	Precisão Intermédia CV _R (%)
Granulado	1	70 ± 2	3,0	2,7
	2	70 ± 1	2,0	
	3	73 ± 1	1,2	
Comprimidos	1	645 ± 1	2,0	2,6
	2	638 ± 2	2,4	
	3	658 ± 2	3,0	
Líquido 1	1	29 ± 0	0,9	3,3
	2	27 ± 0	0,9	
	3	28 ± 0	1,3	

Analisando os valores da tabela verifica-se que foi obtido um coeficiente de variação máximo de 3,0% para a repetibilidade e 3,3% para a precisão intermédia em todos os tipos de amostras analisadas. É possível afirmar que o método permite efetuar medições precisas do analito uma vez que os teores determinados para cada adoçante, resultantes de diferentes tomas derivatizadas no mesmo dia ou em dias diferentes são muito próximos. Nos anexos 9 e 10 estão presentes exemplos de folhas de cálculo utilizadas para calcular o CV da repetibilidade e da precisão intermédia, respetivamente.

➤ Repetibilidade do injetor

O controlo do sistema cromatográfico foi realizado através da monitorização da repetibilidade do injetor, permitindo verificar se este se encontrava bem calibrado e com uma precisão aceitável. Esta monitorização foi feita através da programação, no sistema de HPLC, de dez injeções consecutivas para duas soluções derivatizadas correspondentes ao primeiro e último padrão de calibração, 40 e 200 mg/L, respetivamente.

Na Tabela 5.9 estão apresentados os valores dos sinais das dez injeções de cada um dos padrões, o respetivo desvio padrão e coeficiente de variação.

Tabela 5.9 - Valores da intensidade do sinal para as dez réplicas de cada padrão, média, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV).

Injeção	Intensidade do sinal (Área do pico)	
	40 mg/L	200 mg/L
1	168270	850772
2	168551	857937
3	168170	850332
4	171533	851094
5	170932	854465
6	169746	848785
7	172063	850748
8	166576	858115
9	171351	851063
10	167716	850066
Média	169491	852338
S	1893	3418
CV (%)	1,1	0,4

Como na análise da precisão do método, a monitorização da repetibilidade do injetor foi feita com base no seu coeficiente de variação, devendo o seu valor, neste caso, ser inferior a 5%, de acordo com o controlo de qualidade interno do INSA ^[112]. É possível verificar que para ambos os padrões os coeficientes cumprem este critério, e que o injetor apresenta uma precisão aceitável.

➤ Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da participação num ensaio interlaboratorial, FAPAS 0311, no qual cada participante analisou a mesma amostra fornecida. Neste caso a amostra em análise contendo ciclamato foi um refrigerante, sendo que devido ao teor inferior do analito neste tipo de amostras (comparativamente com adoçantes de mesa) não foram necessárias diluições, quer antes do procedimento de

derivatização quer posteriormente. Deste modo, foi realizada uma pipetagem direta da amostra para três ampolas de decantação.

A avaliação da exatidão foi feita em condições de precisão intermédia, com dois ensaios em dias diferentes e realizados por analistas diferentes tendo o ensaio sido igualmente realizado em triplicado. No primeiro ensaio foi adicionado à terceira ampola um volume de solução padrão *stock* correspondente a, sensivelmente, metade do limite máximo de utilização de ciclamato em bebidas aromáticas à base de água, 250 mg/L, devido ao desconhecimento do seu teor na amostra. No segundo ensaio, tendo já uma estimativa do teor do analito, foi adicionado um volume de padrão correspondendo a, sensivelmente, 100% do teor de ácido ciclâmico na amostra. Na Tabela 5.10 estão apresentados os valores determinados para o teor de ácido ciclâmico e respetivas taxas de recuperação.

Tabela 5.10 - Concentração de ciclamato de sódio e taxas de recuperação determinadas no ensaio interlaboratorial.

Dia	Teor de ácido ciclâmico (mg/L)	Taxa de recuperação (%)
1	179	99
2	184	100

Não tendo, até à data da submissão deste trabalho para avaliação, sido recebido o resultado do ensaio interlaboratorial, é possível concluir que a semelhança dos resultados obtidos nos dois dias e respetivas taxas de recuperação atestam a exatidão do método.

5.3. Estabilidade das Soluções Derivatizadas

Embora o método analítico tenha sido validado adequadamente, uma das grandes limitações da sua aplicação consiste no facto do produto derivatizado possuir uma estabilidade limitada, pelo que de acordo com a norma EN12857 é estável por apenas um período médio de 24 h quando armazenado a 4°C^[90]. Isto constitui uma limitação importante, uma vez que para cada nova análise é necessário preparar novas soluções padrão de calibração através do procedimento de derivatização descrito no capítulo 4.5.2.

Com o objetivo de averiguar esta limitação foi realizado um estudo da estabilidade do produto derivatizado, tendo-se procedido a injeções de soluções padrão derivatizadas com períodos e condições de armazenamento diferentes entre si. O parâmetro de estabilidade avaliado foi a intensidade do sinal obtido pelo analito.

A partir de uma solução padrão *stock* derivatizada foram preparados vinte e quatro vias, equivalendo a quatro curvas de calibração. Seis destes vias foram introduzidos no sistema de HPLC no mesmo dia do ensaio. Os restantes dezoito foram selados com parafilme, sendo que doze foram armazenados a uma temperatura de 4°C, e os restantes seis armazenados à temperatura ambiente num local escuro.

No dia seguinte, aproximadamente 24 horas depois da primeira injeção, foram introduzidos os vias armazenados à temperatura ambiente e seis dos vias armazenados a 4°C. Sensivelmente 48 horas depois da primeira injeção procedeu-se à introdução dos restantes seis vias armazenados a 4°C no sistema de HPLC. Os dados obtidos no estudo da estabilidade estão presentes na Tabela 5.11.

Tabela 5.11 - Estabilidade das soluções padrão derivatizada.

Concentração (mg/L)	Intensidade do sinal (área do pico)			
	No mesmo dia de preparação	24 Horas depois		48 Horas depois
		4°C	Temperatura ambiente	4°C
40	167350	166737	162038	161967
70	293184	290651	287040	285801
100	423915	423007	419976	417407
130	553305	552546	550601	545570
160	680185	678705	676757	674954
200	847922	845936	846094	842433

É possível observar que ocorreu um decréscimo sistemático mas pouco significativo na intensidade do sinal em todas as soluções padrão ao longo do tempo, permitindo

afirmar que as soluções derivatizadas apresentam uma estabilidade superior à indicada pela norma.

Conclui-se que, salvo algumas exceções, ocorreram maiores decréscimos para os padrões de concentração mais baixa, e que mesmo para estes o maior desvio foi de, aproximadamente, 3,3% (padrão de 40 mg/L após 48 horas) em relação às soluções injetadas no próprio dia de preparação. Os menores decréscimos observaram-se para as soluções armazenadas a 4°C durante 24 horas.

A boa estabilidade do produto derivatizado foi sobretudo confirmada através dos resultados das soluções armazenadas durante 24 horas à temperatura ambiente e durante 48 horas a 4°C. Isto permitiu concluir que a diferença entre armazenar as amostras durante 24 horas à temperatura ambiente ou a 4°C é mínima, e que a utilização de soluções padrão para a determinação de ciclamato dois dias depois de terem sido derivatizadas é, aparentemente, viável.

Embora se tenha verificado uma boa estabilidade das soluções derivatizadas, optou-se por continuar a realizar a preparação de novas curvas de calibração para cada novo ensaio. Seria necessária a realização de estudos mais aprofundados, não só nas soluções padrão mas também nas soluções das amostras de modo a definir critérios rigorosos de aceitabilidade de resultados e consequente período máximo de utilização das soluções derivatizadas.

A boa estabilidade das soluções é concordante com os resultados obtidos num estudo efetuado por Liang-xing *et al.* Neste estudo foi avaliada a evolução do sinal obtido de uma solução padrão derivatizada, ao longo de 24 horas, armazenada à temperatura ambiente, tendo ocorrido um desvio percentual de 4,1% após este período de tempo pelo que foi concluído não existirem alterações significativas ^[118].

5.4. Análise das Amostras de Adoçantes de Mesa

Após o método analítico ter sido validado procedeu-se à determinação de ciclamato nas amostras de adoçantes de mesa em estudo. Foram analisadas um total de vinte e oito amostras de quatro adoçantes de mesa de três tipos diferentes, de acordo com o procedimento analítico descrito no capítulo 4.5. A diferença de pesagens para as amostras sólidas (granulada e em comprimidos) descrita no procedimento deveu-se ao facto do volume dos reagentes, especificado pela norma para o procedimento de derivatização, não ser suficiente para a conversão total do ciclamato das amostras em comprimido, devido à sua concentração muito elevada. A pesagem de 0,1 g para estas amostras permitiu resolver este problema.

Na figura 5.9 está representado um dos muitos cromatogramas obtidos da análise das amostras.

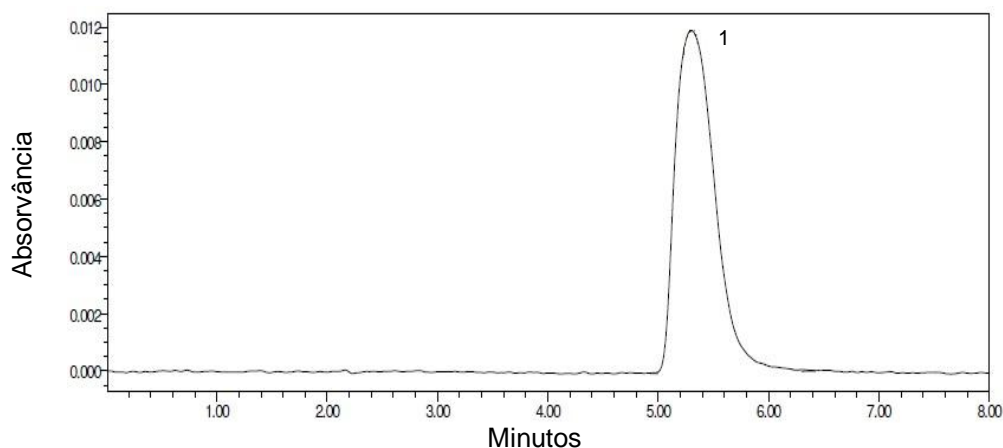


Figura 5.9 - Cromatograma de uma amostra de adoçante de mesa granulado.

1 - N,N-diclorociclohexilamina, TR = 5,3 minutos.

De acordo com o procedimento descrito cada amostra foi analisada em triplicado, sendo que à terceira toma foi adicionado um volume de solução padrão *stock* correspondente, sensivelmente, a 100% do teor de ácido ciclâmico na porção de amostra pesada / pipetada.

Este teor foi estimado através dos resultados obtidos durante os ensaios de avaliação da repetibilidade e precisão intermédia do método para as três matrizes de amostra em análise: granulada, comprimidos e líquida. O conteúdo de analito do adoçante de mesa líquido 2, não utilizado nos estudos de precisão, foi estimado através de uma análise preliminar.

Na Tabela 5.12 estão apresentadas as concentrações das novas soluções *stock* cuja preparação teve em atenção a toma de amostra realizada e respetivo teor de ácido ciclâmico estimado.

Tabela 5.12 - Concentração das soluções *stock* adicionais preparadas e respetivos volumes adicionados à solução de recuperação para cada amostra.

Adoçante	Toma da amostra	Concentração da solução <i>stock</i> para adição (mg/mL)	Volume adicionado à solução de recuperação (mL)
Granulado	0,5 g	10	3,5
Comprimidos	0,1 g	6,5	10
Líquido 1	1 mL	10	3
Líquido 2	1 mL	14,5	8

A preparação de soluções *stock* adicionais com estas diferenças de concentração de ácido ciclâmico teve em conta os seguintes fatores:

- adição de 100% do analito à solução de recuperação de cada amostra;
- a elevada concentração de ciclamato nas amostras;
- o grande intervalo de teor de ciclamato verificado entre os diferentes adoçantes de mesa.

Como critério de aceitação dos resultados da análise das amostras foi considerado um coeficiente de variação de repetibilidade máximo de 5% para os ensaios em duplicado, de acordo com a ISO 5725-6: 1994 ^[120].

Uma vez que durante a análise da repetibilidade os coeficientes obtidos foram todos inferiores a 5% (Tabela 5.10), a definição deste coeficiente permitiu aumentar o intervalo de aceitabilidade dos resultados ao mesmo tempo que garantiu uma boa repetibilidade para a análise das amostras.

Na Tabela 5.13 estão apresentados os teores de ácido ciclâmico, desvios padrão e as respetivas taxas de recuperação para as diferentes embalagens do mesmo lote e de lotes diferentes dos quatro adoçantes analisados, assim como o teor de ciclamato de sódio de cada embalagem. O valor determinado para cada amostra resultou da média dos teores obtidos para as duas tomas sem adição padrão. Os teores das amostras sólidas (comprimidos e granulada) estão expressos em g/kg e das líquidas (líquido 1 e 2) em g/L.

Tabela 5.13 - Teores e taxas de recuperação de ácido ciclâmico e de ciclamato de sódio.

Adoçante de mesa	Lote	Embalagem	Teor de ácido ciclâmico	Taxa de recuperação	Teor de ciclamato de sódio
Unidades			g/kg	%	g/kg
Granulado	1	A	70	97	78
		B	71	95	80
		C	70	93	79
		D	70	98	79
		E	70	100	78
	2	A	68	102	77
	3	A	69	101	77
Comprimidos	1	A	652	96	732
		B	625	107	702
		C	653	102	733
		D	652	103	733
		E	658	100	739
	2	A	652	101	732
	3	A	657	107	737
Unidades			g/L	%	g/L
Líquido 1	1	A	29	101	32
		B	29	102	32
		C	29	98	33
		D	28	100	32
		E	28	104	31
	2	A	27	104	30
	3	A	26	108	29
Líquido 2	1	A	126	92	141
		B	126	100	141
		C	124	98	139
		D	124	99	139
		E	125	99	141
	2	A	131	106	147
	3	A	132	103	148

Pela análise da Tabela 5.13 concluiu-se que existe uma grande variação no teor deste edulcorante nos diferentes adoçantes analisados. Além disto foi igualmente possível verificar que o ciclamato está presente em teores muito elevados, o que é justificado não só pelas amostras analisadas serem adoçantes de mesa, mas principalmente

devido ao facto do poder adoçante do ciclamato ser reduzido comparativamente com outros edulcorantes intensos, e por isso a necessidade de ser utilizado em quantidades muito superiores para alcançar a doçura ou efeito sinérgico pretendido. Foram obtidas boas taxas de recuperação em todas as amostras fortificadas com o analito. Os valores variaram entre 92 e 108%, situando-se dentro do intervalo definido como aceitável pelo controlo de qualidade interno do INSA (80 - 120%) [112]. Demonstrou-se, assim, que o método possui uma boa seletividade e capacidade de recuperar o analito, não ocorrendo perdas significativas do seu teor durante as várias etapas do procedimento.

Na Figura 5.10 está apresentado um gráfico de barras que permite verificar melhor a diferença existente no teor de ciclamato de sódio entre os diferentes adoçantes de mesa que foram analisados. Nesta figura está apresentado o teor de cada lote, sendo que o teor do lote 1 de cada adoçante constitui a média das cinco embalagens.

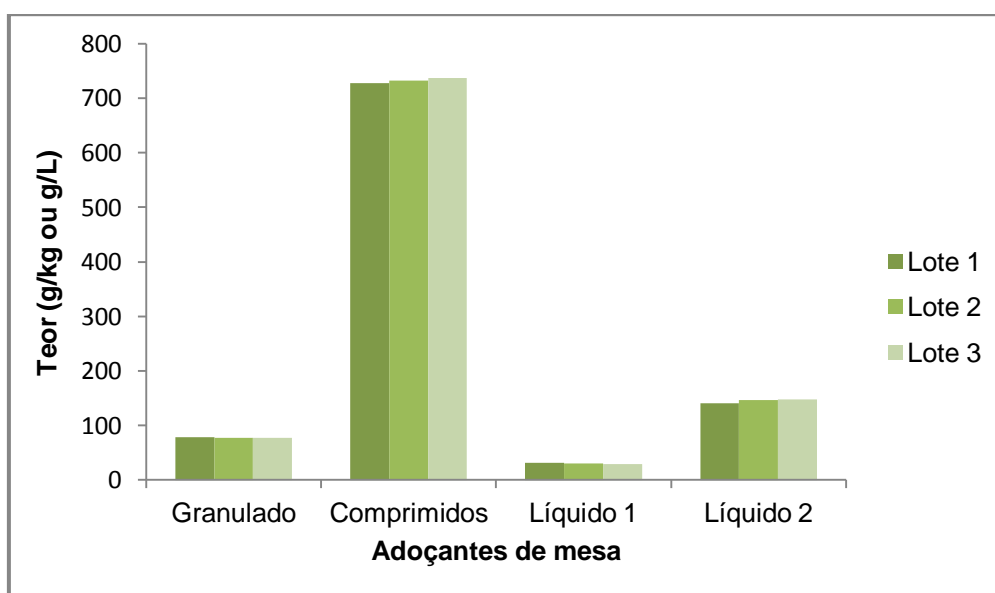


Figura 5.10 - Teor de ciclamato de sódio nos diferentes adoçantes de mesa.

Na Tabela 5.14 estão apresentados os teores em percentagem de ciclamato de sódio determinados para cada lote e embalagem e os que se encontram descritos nos rótulos dos adoçantes analisados.

Tabela 5.14 - Teor (%) em ciclamato de sódio dos adoçantes de mesa analisados.

Adoçante de mesa	Lote	Embalagem	Teor de ciclamato de sódio (%)	
			Determinado	Valor rotulado
Granulado	1	A	7,8	8
		B	8,0	
		C	7,9	
		D	7,9	
		E	7,8	
	2	A	7,7	
	3	A	7,7	
Comprimidos	1	A	73,2	Não especificado.
		B	70,2	
		C	73,3	
		D	73,3	
		E	73,9	
	2	A	73,2	
	3	A	73,7	
Líquido 1	1	A	3,2	Não especificado.
		B	3,2	
		C	3,3	
		D	3,2	
		E	3,1	
	2	A	3,0	
	3	A	2,9	
Líquido 2	1	A	14,1	15
		B	14,1	
		C	13,9	
		D	13,9	
		E	14,1	
	2	A	14,7	
	3	A	14,8	

Verificou-se que para os adoçantes de mesa, cujo rótulo especifica o teor de ciclamato, as percentagens determinadas não foram muito diferentes. No caso do adoçante de mesa granulado as percentagens obtidas foram muito próximas do valor rotulado de 8%, com um desvio máximo de 0,3% (lote 2 e 3). Para o adoçante líquido 2 observou-se um desvio máximo de 1,1% em relação aos 15% rotulados, sendo que os lotes 2 e 3 foram os que apresentaram valores mais próximos.

Por outro lado para o adoçante em comprimidos e líquido 1, os fabricantes não especificam o teor percentual de ciclamato de sódio no rótulo das respetivas embalagens. Isto constitui um cenário normal, uma vez que não existe uma obrigatoriedade da especificação do teor de edulcorantes intensos no rótulo deste tipo de produtos alimentares.

Não obstante este facto, observou-se uma diferença muito substancial entre os teores de ciclamato nos adoçantes de mesa analisados, com um máximo de cerca de 71% (2,9-73,9%). Esta diferença pode ser considerada normal devido à não existência de um limite máximo de utilização de edulcorantes em adoçantes de mesa. Isto confere uma grande “liberdade” aos produtores alimentares na formulação deste tipo de produtos, o que por consequência resulta em diferenças muito grandes no teor de edulcorantes presentes em diferentes adoçantes de mesa.

De acordo com a composição em edulcorantes intensos (Tabela 4.2), todas as amostras analisadas apresentam uma combinação de ciclamato e sacarina de sódio. Como referido no capítulo 2.4.3 esta é de facto a mistura mais utilizada, principalmente na proporção de 10:1 de ciclamato e sacarina respetivamente, sendo os adoçantes granulado e líquido 2 exemplo disso.

No entanto, a partir dos resultados obtidos foi possível concluir que esta proporção não é sempre aplicada, nomeadamente no caso do adoçante de mesa líquido 1, uma vez que para se verificar seria necessário um teor de sacarina de, aproximadamente, 0,3%, valor este muito reduzido para qualquer edulcorante intenso em adoçantes de mesa. É provável que neste caso a utilização de ciclamato, mais do que fornecer sabor doce ao adoçante, tenha tido como objetivo principal mascarar o sabor residual desagradável e acentuado da sacarina.

É também importante constatar que o adoçante de mesa líquido 1 possui na sua composição o edulcorante intenso natural taumatina, para além do ciclamato e da sacarina (Tabela 4.2). Este facto pode justificar a menor concentração de ciclamato observada, uma vez que a taumatina apresenta um poder adoçante muito elevado (2000 vezes superior ao da sacarose), sendo necessária uma menor quantidade dos restantes edulcorantes intensos utilizados devido ao efeito sinérgico criado.

Analisando o teor de ciclamato nos diferentes tipos de adoçante de mesa verificou-se que o adoçante em comprimidos apresenta um teor significativamente superior aos adoçantes líquidos e granulado. Esta situação pode ser justificada pelo facto dos adoçantes líquidos e em pó serem usualmente utilizados em maiores quantidades ou de forma menos controlada pelo consumidor^[81].

Por outro lado, os adoçantes de mesa em comprimidos apresentam um princípio de aplicação um pouco diferente. Normalmente é adicionado um ou dois comprimidos a uma bebida quente para que seja obtida a doçura pretendida pelo consumidor, sendo a sua utilização mais controlada.

Tendo em conta o peso do conteúdo das embalagens deste adoçante (72g) e o número de unidades em cada embalagem (1200), e sabendo que cada unidade (\approx 60 mg) apresenta em média 73,0% deste edulcorante (percentagem média de todas as embalagens deste adoçante) é possível concluir que cada unidade apresenta em média 43,8 mg de ciclamato de sódio. Esta quantidade a juntar a uma possível quantidade de sacarina permite concluir que este adoçante é praticamente apenas constituído por edulcorantes intensos.

Fazendo uma primeira análise crítica pode parecer que o adoçante de mesa em comprimidos possui um teor excessivo de ciclamato, desenquadrado dos demais adoçantes analisados.

Numa pesquisa por produtos semelhantes, foi encontrado um adoçante de mesa de outra marca em comprimidos com a mesma combinação de edulcorantes intensos, peso e número de unidades mas que especificava a quantidade de ciclamato em cada unidade no rótulo. Neste caso o valor rotulado era de 40 mg por comprimido, que não é muito diferente do valor determinado para o adoçante de mesa analisado.

Noutros estudos de determinação de ciclamato em adoçantes de mesa, realizados por Rocha *et al.* e Gouveia *et al.*, foram determinados, respetivamente, teores de 703 e 714 g/kg de ciclamato de sódio em amostras de adoçantes de mesa em comprimidos [96,121].

Estes factos permitiram concluir que o valor determinado, embora muito elevado, está dentro da gama referida por outros autores e noutros adoçantes disponíveis no mercado.

5.4.1. Estudo da homogeneidade

Com o objetivo de analisar a homogeneidade do teor de ciclamato nas diferentes amostras procedeu-se à análise da sua variância dentro do mesmo lote e entre os três lotes de cada adoçante de mesa em estudo. Para tal foram comparados os valores dos duplicados de cada amostra através do teste estatístico ANOVA.

Este teste avalia a variância de resultados através da comparação das médias entre pelo menos dois grupos, permitindo determinar se são ou não significativamente diferentes entre si. O teste avalia qual das seguintes Hipóteses é verdadeira:

- Hipótese Nula (H0): as médias são iguais;
- Hipótese Alternativa (H1): as médias são diferentes.

O teste é realizado para um nível de significância definido, 0,05 neste caso (intervalo de confiança de 95%), e a partir dos resultados obtidos comparam-se os parâmetros F e $F_{\text{crítico}}$. Se F for inferior ao $F_{\text{crítico}}$ considera-se a Hipótese nula como verdadeira, caso contrário a Hipótese Alternativa é definida como verdadeira.

Para o presente trabalho a igualdade ou não das médias permite concluir se o teor de ciclamato é homogéneo ou não homogéneo, respetivamente. De referir que este teste não especifica quantos e quais os grupos (lote ou embalagem) que diferem dos restantes mas que pelo menos um deles apresenta diferenças significativas ^[122].

Na Tabela 5.15 estão apresentados os valores de F e $F_{\text{crítico}}$ resultantes da comparação dos teores de ciclamato entre as cinco embalagens do mesmo lote (1) de cada adoçante de mesa. Os restantes dados obtidos do teste, estão presentes no anexo 11.

Tabela 5.15 - Valores de F e $F_{\text{crítico}}$ para a homogeneidade no mesmo lote.

Adoçante de mesa	Valor de F	$F_{\text{crítico}}$
Granulado	0,24	
Comprimidos	1,62	5,19
Líquido 1	12,20	
Líquido 2	0,16	

Verificou-se que existe homogeneidade no teor de ciclamato em todas as amostras analisadas, com exceção para o adoçante de mesa líquido 1.

Para a análise da homogeneidade das variâncias entre lotes (1, 2 e 3) procedeu-se à comparação do teor de ciclamato entre os três lotes de cada adoçante de mesa. Na Tabela 5.16 estão apresentados os respetivos valores estatísticos, estando os restantes dados do teste presentes no anexo 11.

Tabela 5.16 - Valores de F e $F_{\text{crítico}}$ para a homogeneidade entre lotes.

Adoçante de mesa	Valor de F	$F_{\text{crítico}}$
Granulado	1,38	
Comprimidos	0,26	3,98
Líquido 1	20,29	
Líquido 2	10,09	

Verificou-se que os adoçantes de mesa sólidos (granulado e em comprimidos) apresentam homogeneidade ao contrário de ambos os adoçantes de mesa líquidos (líquido 1 e líquido 2).

Para que a análise da homogeneidade do teor de ciclamato entre os três lotes de cada adoçante de mesa fosse o mais correta possível, seria aconselhável a comparação do teor de ciclamato entre o mesmo número de embalagens. Esta comparação não foi possível de ser realizada neste trabalho uma vez que foram adquiridas cinco embalagens para o lote 1 e apenas uma embalagem para o lote 2 e 3 de cada adoçante de mesa analisado, tendo a comparação sido feita na proporção de 5:1, no que respeita aos valores observados das embalagens.

Deste modo, e uma vez que esta metodologia estatística está assente na comparação das variâncias e das médias dos valores introduzidos, a introdução de novos valores de mais embalagens do lote 2 e 3 poderia, ou não, confirmar e reforçar as conclusões obtidas para a homogeneidade entre lotes. Não obstante este facto, o teste ANOVA é passível de ser aplicado mesmo quando existe uma diferença no número de resultados para cada amostra.

Ao analisar os resultados deste teste para os diferentes adoçantes de mesa e comparando os teores obtidos (Tabelas 5.13 e 5.14) constatou-se que parecem não existir diferenças que justificassem a não homogeneidade verificada em alguns casos, como por exemplo para o adoçante de mesa líquido 1.

A não homogeneidade no mesmo lote para esta amostra não significa necessariamente que existam diferenças significativas no teor de ciclamato. Isto pode ser verificado através da semelhança dos teores de ciclamato determinados para este adoçante (Tabela 5.13). No entanto, o facto dos valores obtidos entre embalagens do mesmo lote serem muito próximos, justificado pelo coeficiente de repetibilidade muito baixo para este adoçante (Tabela 5.8), origina que qualquer pequeno desvio do valor médio, mais vezes verificado, seja considerado desigual. Esta constatação é

igualmente aplicável à não homogeneidade verificada entre os três lotes deste adoçante de mesa.

Contudo, convém salientar que a não homogeneidade verificada em algumas das amostras reforça a ideia, já transmitida neste trabalho, da “liberdade” que os produtores alimentares possuem na formulação destes produtos.

É provável que não exista um controlo muito rigoroso na adição de edulcorantes na mesma quantidade exata nos diferentes lotes fabricados. Este controlo poderá ser ainda menos rigoroso no caso do ciclamato de sódio, uma vez que devido ao seu baixo poder adoçante, não serão pequenas diferenças na quantidade adicionada deste edulcorante que irão alterar a doçura pretendida de um determinado adoçante de mesa. Este motivo poderá justificar uma homogeneização insuficiente no processo de produção dos adoçantes líquidos 1 e 2. Por outro lado, as diferenças observadas para estas amostras não são suficientemente elevadas para que pudessem sugerir uma necessidade urgente ou prioritária de melhorar o processo produtivo usado pelos respetivos fabricantes.

Num estudo de determinação do teor de ciclamato e outros edulcorantes em diferentes adoçantes de mesa, com a mistura ciclamato e sacarina realizado por Del Bianchi, foi verificada uma diferença significativa entre diferentes lotes de vários adoçantes de mesa líquidos ^[123], tal como se verificou neste trabalho. Embora este estudo tenha sido realizado com amostras adquiridas no mercado brasileiro, a formulação deste tipo de produtos e respetiva legislação é semelhante em todos os países, no que respeita à não existência de uma quantidade máxima de utilização de edulcorantes intensos e à não obrigatoriedade da rotulagem do respetivo teor.

5.5. Impacto na Exposição Alimentar

Os adoçantes de mesa não são os produtos com edulcorantes intensos mais usados pelo consumidor. Contudo, quando usados, são consumidos diariamente como substitutos do açúcar, sendo este padrão de consumo sobretudo verificado em indivíduos diabéticos ou em regime de dieta ^[80].

Por falta de dados que indiquem o consumo médio de adoçantes de mesa em Portugal e na União Europeia, não é possível fazer uma avaliação do impacto dos resultados determinados na exposição alimentar. No entanto, é importante realçar a necessidade de se realizarem estudos de estimativa da ingestão de ciclamato e outros edulcorantes intensos através do consumo de adoçantes de mesa e outros produtos, de forma regular, sobretudo em Portugal onde os dados são praticamente inexistentes.

Na Tabela 5.17 é apresentado um exemplo das quantidades máximas aproximadas de cada um dos adoçantes de mesa analisados que seriam necessárias consumir diariamente por um adulto e por uma criança para que o valor da DDA de ciclamato, 7 mg/kg de peso corporal/dia expresso como ácido ciclâmico, fosse atingido.

Para esta abordagem foi considerada uma criança (M/F) de 10 anos com um peso médio de 32,5 kg (percentil 50), de acordo com dados da DGS, e um adulto (M/F) com um peso médio de 66,4 kg tendo por base uma altura média de 1,70 m e um índice de massa corporal de 23 ^[124]. Para os adoçantes líquidos foi tido em conta o peso médio de uma gota e para o adoçante em comprimidos, o peso de uma unidade. Os dados utilizados para a elaboração desta tabela estão apresentados no anexo 12.

Tabela 5.17 - Quantidade de adoçante de mesa necessário para atingir a DDA de ciclamato.

Adoçante de mesa	Adulto (M/F)	Criança (M/F)
Granulado (gramas)	6,7	3,3
Comprimidos (unidades)	12	6
Líquido 1 (gotas)	650	318
Líquido 2 (gotas)	112	55

Analisando a Tabela 5.17 conclui-se que a quantidade hipotética de produto necessária para atingir da DDA varia significativamente e que o adoçante de mesa em comprimidos é o produto, cujo consumo, aparenta apresentar maior risco de um possível incumprimento da DDA. Neste caso seriam apenas necessários cerca de 12 e 6 comprimidos por dia para atingir o limite máximo diário para um adulto e uma criança, respetivamente.

Embora os adoçantes de mesa em comprimido sejam, geralmente, utilizados em menor quantidade que os restantes, esta dose é relativamente baixa sobretudo se for tida em conta uma possível maior ingestão por parte de alguns subgrupos populacionais, como adultos e crianças diabéticas, ou simplesmente por pessoas em regimes de dieta. Por outro lado, o consumo do adoçante granulado e líquido 1 e 2, devido aos menores teores de ciclamato presentes, não aparenta atingir a DDA facilmente.

É importante referir que a ingestão desta dose hipotética exclui a contribuição de outras possíveis fontes de ciclamato de sódio, que podem ser tidas em conta em estudos de estimativa da ingestão deste edulcorante (ex: refrigerantes).

Deste modo, conclui-se que, não havendo um limite máximo de utilização de ciclamato em adoçantes de mesa, seria importante que existisse uma obrigatoriedade na especificação do teor deste edulcorante intenso e de outros na sua rotulagem.

A grande variação no teor de ciclamato observada nas diferentes amostras e o facto de poderem existir no mercado marcas com teores muito elevados que colocam em risco o cumprimento da DDA justificam a importância que a rotulagem do teor exato no rótulo teria. Permitiria ao consumidor realizar uma compra mais informada deste tipo de produtos e um maior controlo da sua ingestão na dieta diária.

6. CONCLUSÃO

O método de cromatografia líquida de alta resolução aplicado neste trabalho demonstrou ser adequado, específico e eficaz para o doseamento de ciclamato de sódio em diferentes tipos de adoçantes de mesa.

As alterações realizadas no procedimento da norma, nomeadamente a preparação e derivatização das soluções padrão e a redução do tempo de corrida permitiram reduzir substancialmente o tempo de execução de cada ensaio. Foi possível concluir que a estabilidade das soluções padrão derivatizadas é superior à indicada pela norma, sendo possível prever que a sua utilização seja viável em dias posteriores à sua preparação.

A eficiência do método foi provada através da validação de vários parâmetros, tendo apresentado adequabilidade à gama de trabalho e linearidade à curva de calibração, estabelecidas. Os limites de deteção e de quantificação da curva de calibração, 13,3 e 40 mg/L, e do método, 6,7 e 20 g/L, respetivamente, foram apropriados para as amostras em estudo, para as quais demonstrou, igualmente, uma boa repetibilidade e precisão intermédia.

Da análise das amostras obtiveram-se taxas de recuperação entre os 92 e 108% e verificou-se uma grande variação no teor de ciclamato entre os diferentes adoçantes, o que já era esperado devido à inexistência de um limite máximo de utilização deste edulcorante neste tipo de produtos alimentares. Os valores determinados encontram-se próximos dos rotulados para dois dos adoçantes em análise (adoçante granulado e líquido 2), sendo que para os outros dois não foi possível fazer esta comparação devido ao facto desta informação não constar no respetivo rótulo (adoçante em comprimidos e líquido 1).

Ao fazer a comparação do teor de ciclamato entre os diferentes lotes e dentro do mesmo lote de cada adoçante chegou-se à conclusão que as diferenças são pouco significativas, embora se tenha verificado uma não homogeneidade entre lotes para os adoçantes líquidos 1 e 2 e no mesmo lote para o adoçante líquido 1.

Verificou-se que numa das amostras analisadas (adoçante em comprimidos) o risco do seu consumo ultrapassar a DDA constitui uma possibilidade real. Pelo facto do ciclamato se encontrar em teores muito elevados e variados em adoçantes de mesa seria aconselhável que os produtores alimentares incluíssem o seu teor no rótulo dos seus produtos, de modo a permitir ao consumidor controlar, de forma informada, a sua ingestão.

A nível laboratorial conclui-se que o método otimizado e validado pode ser aplicado em análises de rotina no controlo de qualidade de adoçantes de mesa, sendo que os princípios base do procedimento analítico adotado são aplicáveis a vários tipos de amostras alimentares e bebidas, com a devida revalidação do método, se necessário. De referir que da revisão bibliográfica que foi realizada, constatou-se que, até à data, não foram publicados estudos em Portugal que foquem quer a determinação do teor de ciclamato em adoçantes de mesa quer a previsão do respetivo impacto na exposição alimentar. Este trabalho foi, nesse sentido, único e revelou a importância que teria a realização de estudos de estimativa da ingestão deste edulcorante através do consumo deste tipo de produtos, no país. Caso se verificasse que existe, de facto, risco de ultrapassar a DDA de ciclamato por adultos ou crianças pelo consumo dos adoçantes de mesa disponíveis no mercado, seria importante alterar a legislação em vigor no que respeita ao uso de edulcorantes intensos nestes produtos substitutos do açúcar de modo a evitar possíveis riscos para a saúde humana.

7. SUGESTÕES DE TRABALHO FUTURO

Tendo em conta que a otimização e a validação de um método constituem processos dinâmico e contínuo e que o consumo de produtos “light” contendo ciclamato e outros edulcorantes intensos aparenta continuar a ser elevado no futuro, existem aspetos relacionados com o presente trabalho que poderão ser trabalhados e explorados no futuro:

- estudo detalhado da estabilidade das soluções padrão e amostras derivatizadas sob condições e períodos de armazenamento variados;
- determinação da incerteza da medição do método;
- análise do teor de ciclamato em bebidas aromáticas à base de água, nomeadamente refrigerantes, com a devida revalidação do método validado;
- realização de estudos de avaliação da ingestão de ciclamato por consumo de adoçantes de mesa e bebidas aromáticas à base de água em subgrupos populacionais mais sensíveis à sua ingestão (ex: crianças e diabéticos).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Zyglis A., Wasik A., Kot-Wasik A., Namieśnik J., *Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection*. Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 400, 2011, p. 2159–2172.
- [2] Diretiva 94/35/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de Junho de 1994, relativa aos edulcorantes para utilização nos géneros alimentares. Jornal Oficial da União Europeia, N° L237, 1994, p. 3-12.
- [3] Regulamento (CE) N.º1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008 relativo aos aditivos alimentares. Jornal Oficial da União Europeia, 2008, N.º L354, p. 16-33.
- [4] International Sugar Organization, *Alternative Sweeteners in a High Sugar Price Environment*. Market Evaluation Consumption and Statistics Committee, Vol. 12, 2012, p. 1-53.
- [5] Kishi A., Bizzari S., Janshekar H., *High-Intensity Sweeteners*. In: *Chemical Economics Handbook*, Menlo Park, CA, Stanford Research Institute International 2010.
- [6] Salminen S., Hallikainen A., *Sweeteners*. In: Branen A.L., Davidson P.M., Salminen S., Thorngate J. H (ed.), *Food additives*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York; 2002, p. 447-476.
- [7] Leth T., Fabricius N., Fagt S., *Estimated intake of intense sweeteners from non-alcoholic beverages in Denmark*. Food Additives & Contaminants, Vol. 24, 2007, p. 227–235.
- [8] De La Peña C., *Alchemic Ally, Women’s Creativity and control in Saccharin and Cyclamates*. In: De La Peña C. (ed.), *Empty Pleasures: The Story of Artificial Sweeteners from Saccharin to Splenda*, The University of North Carolina Press, 2010, p. 39-64.
- [9] Mattes R.D., Popkin B.M., *Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms*. The American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 89, 2009, p.1-14.
- [10] Bright G., *Low-Calorie Sweeteners-From Molecules to Mass Markets*. In: Corti A. (ed.), *Low-Calorie Sweeteners: Present and Future*. World Review of Nutrition and Dietetics. Karger, Vol. 85, Basel, 1999, p. 2-9.
- [11] Nabors L.O., *Alternative Sweeteners: An Overview*. In: Nabors L.O. (ed), *Alternative Sweeteners*, 4th ed., Taylor & Francis Group, 2012, p. 1-12.
- [12] Fatibello-Filho O., Vieira I.C., Gouveia S.T., Calafatti S.A., Guaritá-Santos A.J.M., *Adoçantes artificiais*. Química Nova, Vol. 19, 1996, p. 248-260.

- [13] Kirk-Othmer, *Food Additives*. In: Encyclopedia of Chemical Technology. John Wiley & Sons, New Jersey, 2007, p. 29-73.
- [14] Kemp S.E., *Low-calorie sweeteners*. In: Spillane W.J. (ed), *Optimizing Sweet Taste in Food*, Woodhead Publishing Limited, England, 2006, p.175-250.
- [15] Beauchamp G.K., *Factors Affecting Sweetness*. In: Corti A. (ed.), *Low-Calorie Sweeteners: Present and Future*. World Review of Nutrition and Dietetics, Karger, Vol. 85, Basel, 1999, p. 10-18.
- [16] European Food Information Council, *Benefits and Safety of Low Calorie Sweeteners*, EUFIC Review, October 2012, consultado em 5 de Abril de 2013: http://www.eufic.org/article/en/page/RARCHIVE/expid/Benefits_Safety_Low_Calorie_Sweeteners/.
- [17] Szmrecsányi T., Alvarez V.M.P., *The Search for a Perfect Substitute: Technological and Economic Trajectories of Synthetic Sweeteners, from Saccharin to Aspartame (c.1880-1980)*. International Economic History Congress, (Session C-36.), Madrid, 1998.
- [18] Renwick A., Drewnowski A., Vecchia C., *Low Calorie Sweeteners*. International Sweeteners Association, 2012, p. 1–30.
- [19] Drewnowski A., *Intense sweeteners and energy density of foods: implications for weight control*. European Journal of Clinical Nutrition, Vol. 53, 1999, p. 757–763.
- [20] Bakal A.I., *Mixed Sweetener functionality*. In: Nabors L.O. (ed.), *Alternative Sweeteners 4th ed.*, Taylor & Francis Group, 2012, p. 473-488.
- [21] Bakal A.I., *Functionality of combined sweeteners in several food applications*. Chemistry and Industry Society of Chemical Industry, 1983, p. 700.
- [22] Moraru C., *Formulating in Sweetness*. Prepared Foods, Vol. 180, 2011, p. 71-77.
- [23] LMC International, *Annual Review of the Intense Sweetener Market*. Sweetener Analysis, 1994, p. 1-12.
- [24] Verbruggen R., *Food Additives in the European Union*. In: Branen A.L, Davidson P.M, Salminen S., Thorngate J.H. (ed.), *Food additives*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, 2002, p. 447-476
- [25] Codex Alimentarius Commission (CAC). Procedural Manual. 18th ed. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2008, Rome.
- [26] Mortensen A., *Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects*. Scandinavian Journal of Food and Nutrition, 2006, Vol. 50, No 3, p. 104 -116.

[27] Diretiva 96/83/EC do Parlamento Europeu e do Conselho de 19 de Dezembro de 1996 que altera a Diretiva 94/35/CE relativa aos edulcorantes para utilização nos géneros alimentares. Jornal Oficial da União Europeia, 1997, nº L048, p. 16-19.

[28] Diretiva 2003/115/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Dezembro de 2003 que altera a Diretiva 94/35/CE relativa aos edulcorantes para utilização nos géneros alimentares. Jornal Oficial da União Europeia, 2004, nº L24, p. 65-71.

[29] Diretiva 2006/52/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 5 de Julho de 2006 que altera a Diretiva 95/2/CE relativa aos aditivos alimentares com exceção dos corantes e dos edulcorantes e a Diretiva 94/35/CE relativa aos edulcorantes para utilização nos géneros alimentares. Jornal Oficial da União Europeia, 2006, nº L204, p. 10-22.

[30] Kroger M., Meister K., Kava R., *Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: A review of the safety issues*. Comprehensive Review Food Science Food Safety, 2006, Vol. 5, Issue 2, p. 35-47.

[31] Renwick A.G., *Incidence and severity in relation to magnitude of intake above the ADI or TDI: use of critical effect data*. Regulatory Toxicology Pharmacology, Vol. 30, Issue 2, 1999, p. 79-86.

[32] Mercola J., Pearsall K.D., *Sweet Nothings, the rise of the artificial sweeteners*. In: Mercola J., Pearsall K.D. (ed.), *Sweet deception: why Splenda, NutraSweet, and the FDA may be hazardous to your health*, Thomas Nelson Inc., 2006, p. 19-35.

[33] Whelan E.M., Stare F.J., *Panic in the Pantry*, Atheneum, New York, 1975, p. 152.

[34] Whitfield R.M., *Cyclamates – The Triumph of Hysteria over Science*, unpublished paper available from Whitfield R.M., Executive Professor in the D'Amore-McKim School of Business and Founding Director of the Business Sustainability at Northeastern University, 2011.

[35] Hunt F., Bopp B.A., Price P., *Cyclamate*. In: Nabors L.O. (ed), *Alternative Sweeteners*, 4th ed., Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2012, p. 93-111.

[36] De La Peña C., *Diet Men, The Food-Pharma Origins of Artificially Sweetened Products*. In: De La Peña C. (ed.), *Empty Pleasures: The Story of Artificial Sweeteners from Saccharin to Splenda*, The University of North Carolina Press, 2010, p. 65-104.

[37] Takayama S., Renwick A.G., Johansson S.L., Thorgeirsson U.P., Tsutsumi M., Dalgard D.W., Sieber S.M., *Long-term toxicity and carcinogenicity study of cyclamate in nonhuman primates*. Toxicological Sciences, Vol. 53, 2000, p. 33-39.

[38] Audrieth L.F., Sveda M., *Preparation and properties of some N-substituted sulfamic acids*. Journal of Organic Chemistry, Vol. 9, 1944, p. 89–101.

- [39] Spillane W.J., Thomson J.B., *Studies of the protonation equilibria of sulphamates using ^{13}C and ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopic, potentiometric, and conductimetric methods*. Journal of the Chemical Society, Vol. 2, 1977, p. 580–584.
- [40] Leban D., Rudan-Tasic, Lah N., Klofutar C., *Structures of artificial sweeteners – cyclamic acid and sodium cyclamate with other cyclamates*. Acta Crystallographica, section B 63, 2007, p. 418–425.
- [41] Rowe C.R., Sheskey P.J., Quinn M.E. (ed.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th ed., Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, Washington D.C, 2009, p. 643-645.
- [42] Walters D.E. (ed.), *The Sweetener Book*, Gale Walters Publishing, Illinois, 2013.
- [43] Dubois G.E., *Saccharin and Cyclamate*. In: Mitchell H. (ed), *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 2006, p. 137-166.
- [44] Kokotou M.G., Asimakopoulos A.G, Thomaidis N., *Sweeteners*. In: Nollet L.M. L. (ed.), *Food analysis by HPLC*, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., 2000, p.493-514.
- [45] Mac Kinnon D.K., *Sweeteners*. In: Smith K., Hong-Shum L. (ed.), *Food Additives Data Book*, Blackwell Science, Oxford, 2003, p. 901-1003.
- [46] United States Congress, House of Representatives, Committee on the Judiciary Subcommittee No. 2. *Cyclamates*. Hearings before subcommittee no. 2 of the committee on the Judiciary House of Representatives, Ninety-Second Congress, 29, 30 September and 6 October 1971, Serial No. 22. US Government Printing Office, Washington, DC; 1972.
- [47] Fazio T., Howard J.W., Haenni E.O., *Survey of cyclohexylamine content of food products containing cyclamates*. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, Vol. 3, 1970, p. 1120–1128.
- [48] Nelson, A.L., *Properties of High-Intensity Sweeteners*. In: Nelson A.L. (ed.), *Sweeteners: alternative*, The American Association of Cereal Chemists, Inc., Minnesota, 2000, p. 17-29.
- [49] Kasperson R.W., Primack N., *Cyclamate*. In: O'Brien-Nabors L., Gelardi R.C. (ed.), *Alternative sweeteners*, Marcel Dekker, New York, 1986, p. 71-87.
- [50] DuBois G.E., Lee J.F., *A simple technique for the evaluation of temporal taste properties*. Chemical Senses, Vol. 7, 1983, p. 237–246.
- [51] Beck K.M., *Nonnutritive sweeteners: Saccharin and cyclamate*. In: Furia T.E. (ed.), *CRC handbook of food additives*, Vol. 2, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, 1980.

- [52] Carr B.T., Pecore S.D., Gibes K.M., Dubois G.E., *Sensory methods for sweetener evaluation*. In: Ho C.T., Manley C.H. (ed.), *Flavor Measurement*, Marcel Dekker, New York, 1993, p. 219–237.
- [53] Vincent H.C., Lynch M.J., Pohley F.M., Helgren F.J., Kirchmeyer F.J., *A taste panel study of cyclamate–saccharin mixture and of its components*. *Journal of American Pharmacists Association*, Vol. 44, 1955, p. 442–446.
- [54] Schiffman S.S., Booth B.J., Carr B.T., Losee M.L., Sattely-Miller E.A., Graham B.G., *Investigation of synergism in binary blends of sweeteners*. *Brain Research Bulletin*, Vol. 38, 1995, p. 105–120.
- [55] DuBois G.E., *Non-nutritive sweeteners*. In: *Encyclopedia of Food Science & Technology*, John Wiley & Sons, New York, 2000, p. 2245–2265.
- [56] Beck K.M., Nelson A.S., *Latest uses of synthetic sweeteners*. *Food Engineering*, Vol. 35, 1963, p. 96–97.
- [57] Lynch M.J., Gross H.M., *Artificial sweetening of liquid pharmaceuticals*. *Drug and Cosmetic Industry*, Vol. 87, 1960, p. 324–326, 412–413.
- [58] Renwick A.G., Thompson J.P., O’Shaughnessy M., Walter E.J., *The metabolism of cyclamate to cyclohexylamine in humans during long-term administration*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, No. 196, 2004, p. 367–380.
- [59] Bopp B.A., Sonders R.C., Kesterson J.W., *Toxicological aspects of cyclamate and cyclohexylamine*. *Journal of Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 16, 1986, p. 213–306.
- [60] Renwick A.G., *The metabolism of intense sweeteners*. *Xenobiotica*, Vol. 16, 1986, p. 1057–1071.
- [61] Roberts A., Renwick A.G., Ford G., Creasy D.M., Gaunt I., *The metabolism and testicular toxicity of cyclohexylamine in rats and mice during chronic dietary administration*. *Journal of Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 98, 1989, p. 216–229.
- [62] Buss N.E., Renwick A.G., Donaldson K.M., George C.F., *The metabolism of cyclamate to cyclohexylamine and its cardiovascular consequences in human volunteers*. *Journal of Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 115, 1992, p. 199–210.
- [63] Gaunt I.F., Sharratt M., Grasso P., Lansdown A.B.G., Gangolli S.D., *Short-term toxicity of cyclohexylamine hydrochloride in the rat*. *Food and Cosmetics Toxicology*, Vol. 12, 1974, p. 609–624.
- [64] Mason P.L., Thompson, G.R., *Testicular effects of cyclohexylamine hydrochloride in the rat*. *Toxicology*, Vol. 8, 1977, 143–156.

- [65] Brune H., Mohr U., Deutsch-Wenzel R.P., *Establishment of the no-effect dosage of cyclohexylamine hydrochloride in male Sprague-Dawley rats with respect to growth and testicular atrophy*. Unpublished report, 1978.
- [66] Serra-Majem L., Bassas L., Garcia-Glossas R., Ribas L., Ingles C., Casals I., Saavedra P., Renwick A.G., *Cyclamate intake and cyclohexylamine excretion are not related to male fertility in humans*. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 20, 2003, p.1097–1104.
- [67] Price J.M., Biava C.G., Oser B.L., Vogin E.E., Steinfeld, J., Ley, H.L., *Bladder tumors in rats fed cyclohexylamine or high doses of a mixture of cyclamate and saccharin*. *Science*, Vol. 167, 1970, p. 1131–1132.
- [68] Hicks R.M., Wakefield J.S.J., Chowaniec J., 1975. *Evaluation of a new model to detect bladder carcinogens or co-carcinogens: Results obtained with saccharin, cyclamate and cyclophosphamide*. *Chemical-Biological Interactions*, Vol.11, 1975, p. 225–233.
- [69] Morgan R.W., Wang O., *A review of epidemiological studies of artificial sweeteners and bladder cancer*. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 23, 1985, p. 529–533.
- [70] Jensen O.M., *Artificial sweeteners and bladder cancer: Epidemiological evidence*. Third European Toxicology Forum, 1983, Geneva, Switzerland.
- [71] Kroger M., Meister K., Kava R., *Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: A review of the safety issues*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 5, 2006, p. 35-47.
- [72] Commission of the European Communities, 1985. Report of the Scientific Committee for Food on Sweeteners (expressed on 14 September 1984). Reports of the Scientific Committee for Food (Sixteenth Series). CEC, Luxembourg, EUR 10210 EN.
- [73] JECFA. Sodium Cyclamate. Monographs and Evaluations, 1982.
- [74] SCF, Opinion on Sweeteners (expressed on 11 December 1987 and 10 November 1988). Reports of the Scientific Committee for Food (21th Series). Commission of the European Communities, Luxembourg, 1989.
- [75] SCF, Recommendation on cyclamates (expressed on 21 June 1991). Reports of the Scientific Committee for Food (27th Series). Commission of the European Communities, Luxembourg, 1992.
- [76] SCF, Opinion on Cyclamic acid and its sodium and calcium salts (expressed on 14 December 1995). Reports of the Scientific Committee for Food (38th Series). Commission of the European Communities, Luxembourg, 1998.

- [77] SCF, Revised opinion on cyclamic acid and its sodium and calcium salts (expressed on 9 March 2000). European Commission, Brussels, 2000.
- [78] Renwick A.G., *The intake of intense sweeteners – an update review*. Food Additives and Contaminants, Vol. 23, 2006, p.327-338.
- [79] Leclercq C., Arcella D., Le Donne C., Piccinelli R., Sette S., Soggiu M.L., *Stochastic modelling of human exposure to food chemicals and nutrients within the “Montecarlo” project An exploration of the influence of brand loyalty and market share on intake estimates of intense sweeteners from sugar-free soft drinks*. Toxicological letters, Vol. 140, 2003, p. 443-457.
- [80] Lawrie C.A., Rees N.M.A., *The approach adopted in the UK for the estimation of the intake of food additives*. Food Additives and Contaminants, Vol. 13, 1996, p. 411-416.
- [81] Huvaere K., Vandevivere S., Hasni M., Vinkx C., Loco J.V., *Dietary intake of artificial sweeteners by the Belgian population*. Food Additives and Contaminants, Vol. 29, 2012, p. 54-65.
- [82] Lino C.M., Costa I.M., Pena A., Ferreira R., Cardoso S.M., *Estimated intake of sweeteners, acesulfame-K and aspartame, from soft drinks, based on mineral waters and nectars for a group of Portuguese teenage students*. Food Additives and Contaminants, Vol. 25, 2008, p. 1291-1296.
- [83] Wasik A., McCourt J., Buchgraber M., *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, Vol. 1157, 2007, p. 187 – 196.
- [84] Huang Z., Ma J., Chen B., Zhang Y., Yao S., *Determination of cyclamate in foods by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Analytical Chimica Acta, No. 555, 2006, p. 233-237.
- [85] Zyglar A., Wasik A., Namieśnik J. *Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs*. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, 2009, p. 1092-1102.
- [86] Herrmann A., Damawandi E., Wagmann M., *Determination of cyclamate by HPLC with indirect photometry*. Journal of Chromatography, Vol. 280, 1983, p. 85–90.
- [87] Choi M.M.F., Hsu M.Y., Wong S.L., *Determination of cyclamate in low-calorie foods by high-performance liquid chromatography with indirect visible photometry*. The Analyst, Vol. 125, 2000, p. 217-220.
- [88] Lehr M., Schmid W., *Simple and specific HPLC procedure for the determination of cyclamate in fruit beverages after conversion to N,N-dichlorocyclohexylamine*. European Food Research and Technology, No. 192, 1991, p. 335-338.

- [89] Hauck M., Köbler H., *Determination of cyclamate in complex matrix using HPLC after column derivatization with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan*. European Food Research and Technology, No. 191, 1990, p. 322-324.
- [90] EN 12857:1999 – *Determination of cyclamate in Foodstuffs- by Method by high performance liquid chromatography*
- [91] EN 1379:1996 – *Determination of cyclamate and saccharin in liquid table top sweetener preparations - Method by high performance liquid chromatography*.
- [92] Zhu, Y., Guo, Y., Ye, M., James, F. S., *Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography*. Journal of Chromatography A, Vol. 1085, 2005, p. 143–146.
- [93] Baranowska I., Zydron M., Szczepaniak K., *TLC in the analysis of food additives*. Journal of Planar Chromatography Modern TLC, Vol. 17, 2004, p. 54-57.
- [94] Richardson M.L., Luton P.E., *Determination of cyclamate in soft drinks by gas chromatography*. Analyst, Vol. 91, 1966, p. 520.
- [95] Bergamo A.B., da Fracassi S.J.A., de Pereira J.D., *Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contact less conductivity detection*. Food Chemistry, Vol. 124, 2011, p. 1714–1717.
- [96] Rocha F.R.P., Rodenas-Torralba E., Morales-Rubio A., de la Guardia M., *A clean method for flow injection spectrophotometric determination of cyclamate in table sweeteners*. Analytica Chimica Acta, Vol. 547, 2005, p. 204-208.
- [97] Medeiros R.A., de Carvalho A.E., Rocha-Filho R.C., Fatibello-Filho O., *Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode*. Talanta, Vol. 76, 2008, p. 685-689.
- [98] Armenta S., Garrigues S., de la Guardia M., *Sweeteners determination in table top formulations using FT-Raman spectrometry and chemometric analysis*. Analytica Chimica Acta, Vol. 56, 2004, p. 521-527.
- [99] Lawrence J.F., Charbonneau C.F., *Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse-phase liquid chromatography with absorbance detection*. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, Vol. 71, 1988, p. 934-937
- [100] McMaster M.C. (ed.), *HPLC: A Practical User's Guide*, 2nd ed., Wiley & Sons Inc, New Jersey, 2007, p. 3-14.

- [101] *Analytical Methods, High performance liquid chromatography*, The Lindle Group, 2013, consultado em 18 de Abril de 2013: http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/high_performance_liquid_chromatography.html
- [102] *High Pressure Liquid Chromatography, Pharmacopeia*, U.S. Pharmacopeia, 2008 - 2010, consultado em 20 de Maio de 2013: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c621s9.html
- [103] Siouffi A.M., HPLC. In: Nollet L.M.L. (ed.), *Food analysis by HPLC*, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., 2000, p. 1-54.
- [104] Champion B., *HPLC Separation Fundamentals*. Agilent Technologies, Inc., 2009.
- [105] Engelhardt H., *Bonded Stationary phases*. In: Corradini D. (ed), *Handbook of HPLC*, 2nd ed., Chromatographic Science Series. Taylor and Francis Group, 2011, p. 47-66.
- [106] Claessens H.A., *Trends and progress in the characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography*. Trends in analytical chemistry, Vol. 20, 2001, p. 563-583.
- [107] González A.G., Merrador M.A., *A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles*. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 26, 2007, p. 227-238.
- [108] RELACRE, Guia Relacre 13, *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. Instituto Português da Qualidade, Portugal, 2000.
- [109] INMETRO, Normalização e Qualidade Industrial. *Orientação sobre a validação de métodos de ensaios químicos*. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, DOQ-CGCRE-008, 2007.
- [110] International Conference on Harmonisation (ICH), *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, 1995.
- [111] International Standard Organization, Water quality, Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function, ISO 8466-1, 1990.
- [112] Departamento de Alimentação e Nutrição, *Controlo da Qualidade Interno - Métodos Cromatográficos*, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Dezembro de 2012.
- [113] Snyder L.R., Kirkland J.J., Glajch J.L. (ed.), *Practical HPLC Method Development*. 2nd ed., Wiley, New York, 1997.

- [114] Croitoru M.D., Fülöp I., Kincses Ajtay M., Balogh C., Dogaru M.T., Direct HPLC-UV determination of cyclamate, saccharin and aspartame from soft drinks. *Acta Alimentaria*, Vol. 40, 2011, p. 459-465.
- [115] Miller J.N., Miller C.J., *Calibration methods: regression and correlation*. In: Miller J.N., Miller C.J. (ed.), *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th ed., Pearson education Limited, Harlow, 2005, p. 107-147.
- [116] Dong F., Li Z., Zhou G., Jiang J., Determination of sodium cyclamate in food flavours and fragrances, *Food Science*, Vol. 31, 2010, p. 113-116.
- [117] Zheng L., Li L., Yyuan A., Li Y., Determination of sodium cyclamate in sweet triterpene glucoside of luohanguo by high performance liquid chromatography. *Fujian Analysis & Testing*, Vol. 15, 2006, p. 32-34.
- [118] Liang-xing H., Sai-jun L., Chun-hui K., Bai-kun G., *Determination of Cyclamate in Preserved Fruits by High-performance Liquid Chromatography Coupled with Pre-column Derivatization*. *Food Science*, Vol. 30, 2009, p. 204-206.
- [119] Shao T., Li X., Chen Q., Xie G., Shen G., Determination of cyclamate in liquor with high performance liquid chromatography (HPLC) method. *China Brewing*, Issue 12, 2004, p. 31-32.
- [120] International Standard Organization, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 6: Use in practice of accuracy values, ISO 5725-6, 1994.
- [121] Gouveia S.T., Fatibello-Filho O., Nobrega J.A., *Flow injection spectrophotometric determination of cyclamate in low calorie soft drinks and sweeteners*. *Analyst*, Vol. 120, 1995, p. 2009-2012.
- [122] Miller J.N., Miller C.J., *Significance tests*. In: Miller J.N., Miller C.J., (ed). *Statistics and Chemometris for Analytical Chemistry*, 5th ed., Pearson education Limited, Harlow, 2005, p. 39-69.
- [123] Del Bianchi M., *Avaliação dos níveis de ingestão diária de edulcorantes pelo consumo de adoçantes líquidos de mesa*. Faculdade de Engenharia de Alimentos Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual De Campinas, Brasil, 2012.
- [124] DGS. Consultas de Vigilância de Saúde Infantil e Juvenil, atualização das curvas de crescimento, Direção-Geral de Saúde, Ministério da Saúde, 2006.

ANEXOS

Anexo 1 - Exemplo da folha de cálculo para a determinação do teor de ácido ciclâmico nas amostras

PARÂMETRO: **Ciclamato**

Nº/Data de Entrada: x | x

Amostra: x

Observações: SS20130701C

Toma de Amostra	1	2	3	4	5	6
Data de análise:	01-07-2013					
Executante:	BRS					
Pasta Nº:	xx					
Diluição na técnica	1					
Rectas de Calibração: Y(área) vs X(µg/mL)						
Resíduos ≤ 10 %	Sim					
Coefficiente correlação (r) ≥ 0,995	Sim					
Toma da amostra (mL)	1,0000	1,0000	1,0000			
Volume em que a amostra é diluída (mL)	100	100	100			
Concentração do padrão (µg/mL)			14500			
Volume do padrão adicionado (mL)			8,0			
Diluição posterior	1/10	1/10	1/20			
Concentração Sol. Analisadas (µg/mL)	124,7030	126,2230	120,1420			
Concentração da Toma de Amostra (µg /mL amostra)	124703	126223	240284			
Concentração Média da Amostra (mg/L Amostra)	125463,0					
Repetibilidade (CV _r =5%)	OK					
Taxa de recuperação (%)	99,0					
r (repetibilidade)	17564,82					

Anexo 2 – Espectros de absorção

➤ Solução padrão de ciclamato não derivatizada

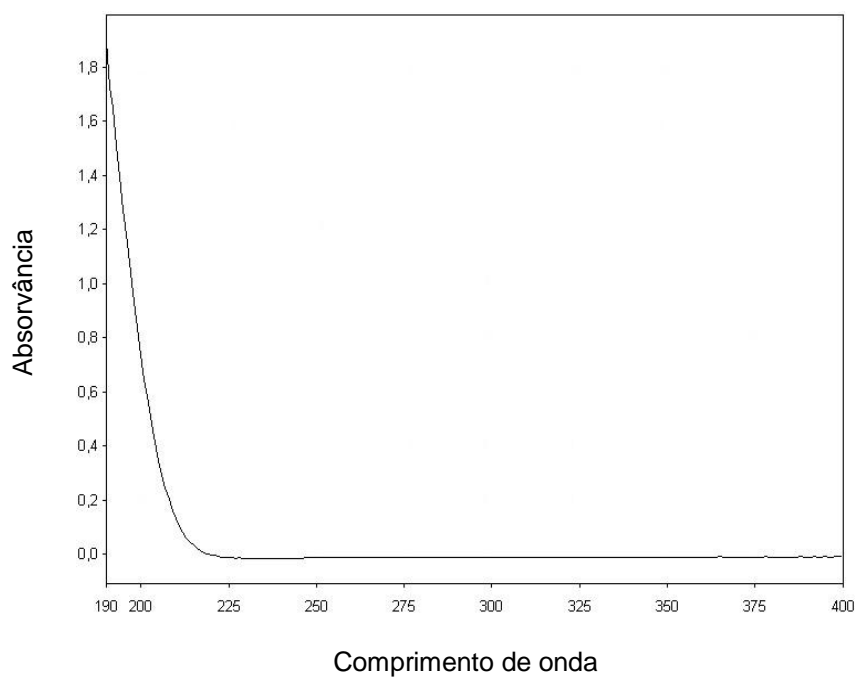


Figura 1 – Espectro de absorção de uma solução padrão de ciclamato não derivatizada.

➤ Solução padrão de ciclamato derivatizada

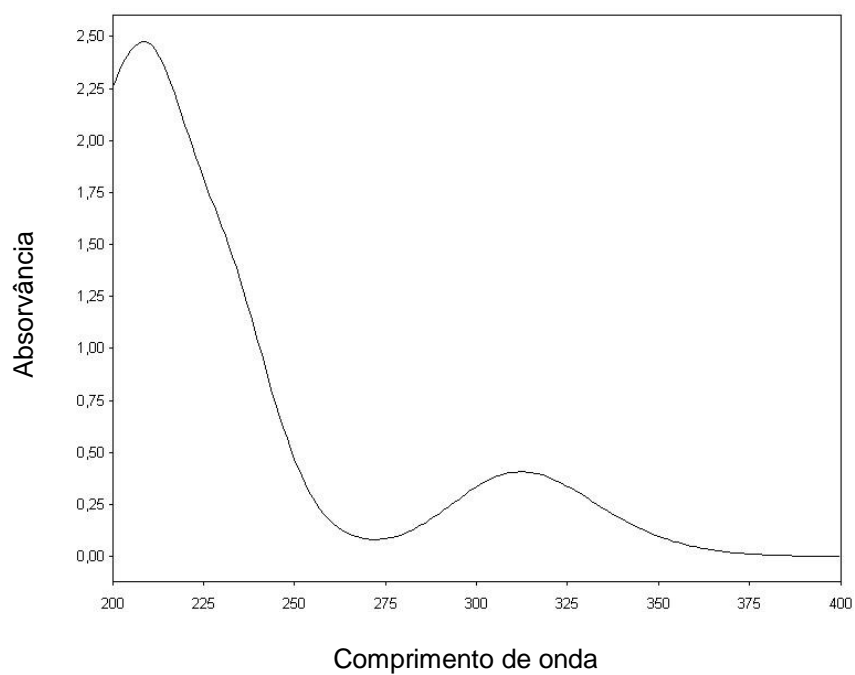
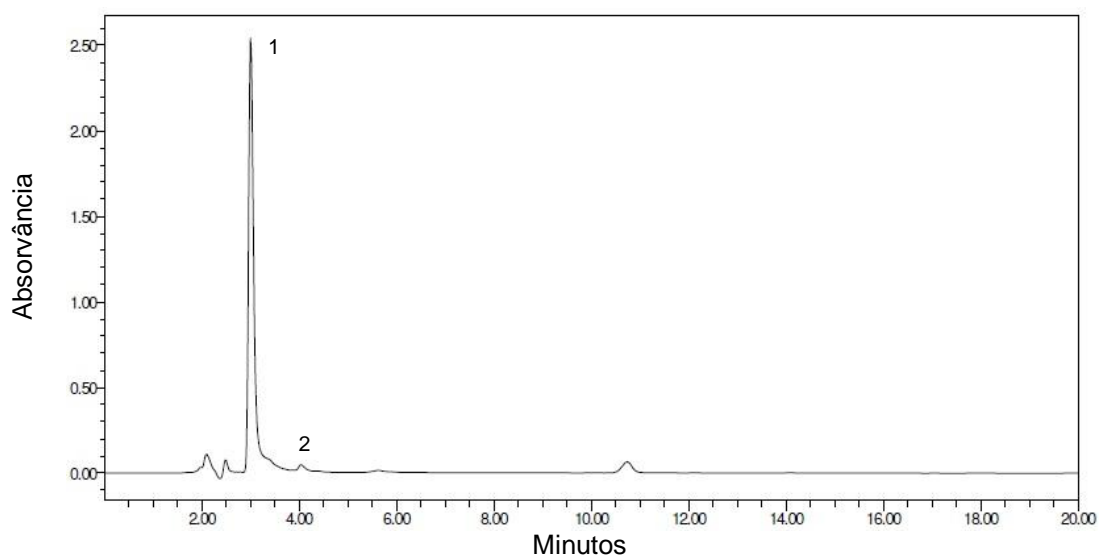


Figura 2 – Espectro de absorção de uma solução padrão de ciclamato derivatizada.

Anexo 3 – Cromatogramas teste**➤ Ensaio teste EN 1379****Figura 3** – Cromatograma da amostra adoçante de mesa líquido 1.

1 - Sacarina, 2 - Ciclamato de sódio.

Tabela 1 - Condições cromatográficas.

Parâmetros	Condições
Modo de separação	Fase reversa
Fase móvel	Di-hidrogenofosfato de potássio (70%) e Metanol (30%)
Fluxo	1 mL/min em modo isocrático
Volume de injeção	20 µL
Deteção (comprimento de onda)	200 nm
Temperatura do forno da coluna	37°C
Temperatura das amostras	5°C
Tempo de corrida	20 minutos

➤ **Ensaio teste com as condições referidas por Croitoru *et al*^[114]**

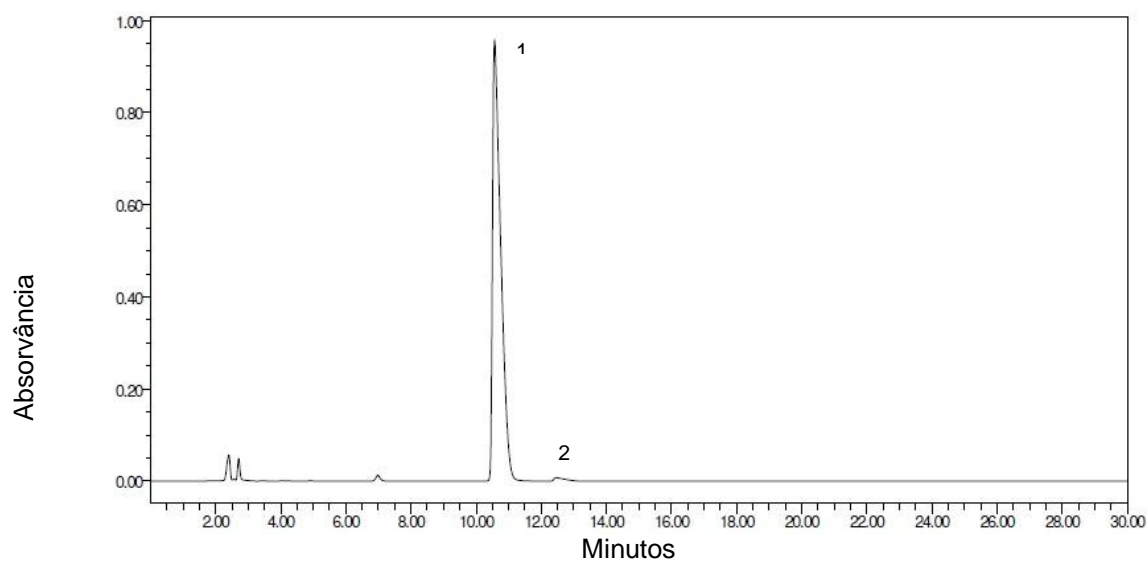


Figura 4 – Cromatograma da amostra adoçante de mesa líquido 1.

1 - Sacarina; 2 - Ciclamato de sódio.

Tabela 2 – Condições cromatográficas.

Parâmetros	Condições
Modo de separação	Fase reversa
Fase móvel	Di-hidrogenofosfato de potássio (95%) e Acetonitrilo (5%)
Fluxo	1 mL/min em modo isocrático
Volume de injeção	20 µL
Deteção (comprimento de onda)	196 nm
Temperatura do forno da coluna	37°C
Temperatura das amostras	5°C
Tempo de corrida	30 minutos

Anexo 4 – Comparação das curvas de calibração

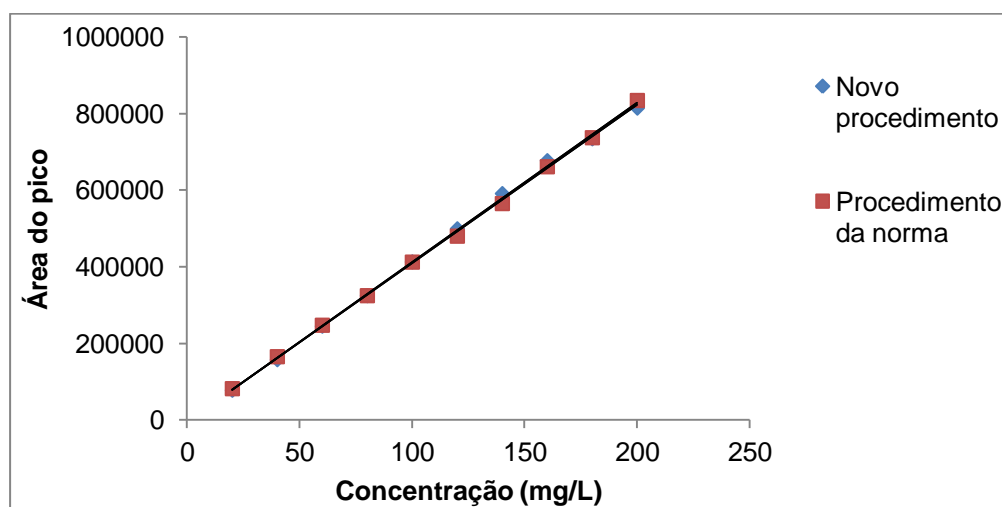


Figura 5 – Retas de calibração obtidas para uma mesma gama de trabalho com os dois procedimentos.

Novo procedimento- $y = 4158,1x - 3693,3$; Procedimento da norma- $y = 4133,6 - 3515,2$.

Tabela 2 - Parâmetros da reta de calibração obtida pelo procedimento da Norma.

Parâmetros da curva de calibração	
Declive (b)	4133,6
Desvio padrão do declive (Sb)	40,9
$b \pm t(n - 2) \times Sb$	$4133,6 \pm 94,6$
Ordenada na origem (a)	-3515,2
Desvio padrão da ordenada na origem (Sa)	5079,8
$a \pm t(n - 2) \times Sa$	$-3515,2 \pm 11734,4$

Foi considerado o desvio padrão (S) do declive (b) e da ordenada na origem (a) da curva de calibração preparada pelo procedimento de preparação de soluções padrão recomendado pela norma. De acordo com o valor t tabelado para um intervalo de confiança de 95% ($P = 0,05$) e $n - 2$ (número de pontos da curva de calibração) determinou-se o intervalo de possíveis valores para o declive e ordenada na origem ($b \pm t(n - 2) \times Sb$ e $a \pm t(n - 2) \times Sa$).

Comparando os valores do declive e da ordenada na origem da curva de calibração obtida com o novo procedimento verifica-se que os respetivos valores encontram-se dentro do intervalo determinado para os parâmetros da curva do procedimento recomendado pela norma.

Anexo 5 – Folha de cálculo para o teste da homogeneidade das variâncias

Conc.		Sinal (y_{ij} =Área do pico i ;ensaio j)									
i	x_i (mg/L)	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10
1	40,000	171046,00000	168638,00000	171500,00000	170825,50000	168063,00000	172206,00000	172997,00000	173801,50000	170238,00000	169434,50000
2	0,000	#DIV/0!									
3	0,000	#DIV/0!									
4	0,000	#DIV/0!									
5	0,000	#DIV/0!									
6	200,000	828499,50000	830211,00000	834861,00000	829126,00000	836903,00000	833646,50000	829377,00000	836767,00000	828604,50000	835880,00000

Média $y_1 =$	170874,95
Desvio Padrão $y_1 =$	1845,52
CV% $y_1 =$	1,08
Variância $y_1 =$	3405943

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^N |y_{i,j} - \bar{y}_i|^2}{n_i - 1}$$

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^N y_{i,j}}{n_i}$$

Média $y_{10} =$	832387,55
Desvio Padrão $y_{10} =$	3548,64
CV% $y_{10} =$	0,43
Variância $y_{10} =$	12592875

PG = 3,697324302

$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}$	se	$S_{10}^2 > S_1^2$
-------------------------------	----	--------------------

$F_{(n_{10}-1, n_1-1, 99,0 \%)} = 5,35$

$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}$	se	$S_{10}^2 > S_1^2$
-------------------------------	----	--------------------

PG < F OK
PG > F .

Anexo 6 – Folha de cálculo para o teste de Linearidade (Mandel)

<i>i</i>	Ajuste Linear $(y_i - \hat{y}_i)^2$	Ajuste polinomial $(y_i - \hat{y}_i)^2$
1	1,343089E+07	1,741922E+07
2	6,309232E+06	9,124227E+06
3	6,206685E+07	6,306123E+07
4	1,816679E+07	1,870658E+07
5	1,986188E+06	3,164232E+06
6	7,863821E+03	7,886475E+04
7	3,281695E+07	2,827558E+07
8	1,255007E+07	9,806159E+06
9	1,707042E+06	1,251740E+06
10	2,709598E+05	1,107637E+05
11	8,539815E+05	2,092415E+06
12	2,244759E+07	1,777029E+07
$\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$	1,726144E+08	1,708613E+08
N	12	12

Ajuste Linear

$$S_{y1} = \frac{\sqrt{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}}{N - 2}$$

$$S_{y1} = 4,154689071E+03$$

Ajuste Polinomial

$$S_{y2} = \frac{\sqrt{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}}{N - 3}$$

$$S_{y2} = 4,357130804E+03$$

Diferença das variâncias $DS^2 = (N - 2) \cdot S_{y1}^2 - (N - 3) \cdot S_{y2}^2$	Valor do teste $PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2}$
--	--

$$F_{(1, N-3, 99\%)} = 10,56143104$$

PG < F	OK
PG > F	.

O ajuste polinomial não é significativamente melhor que o linear

O ajuste polinomial é significativamente melhor que o linear

$$PG = 0,092344016$$

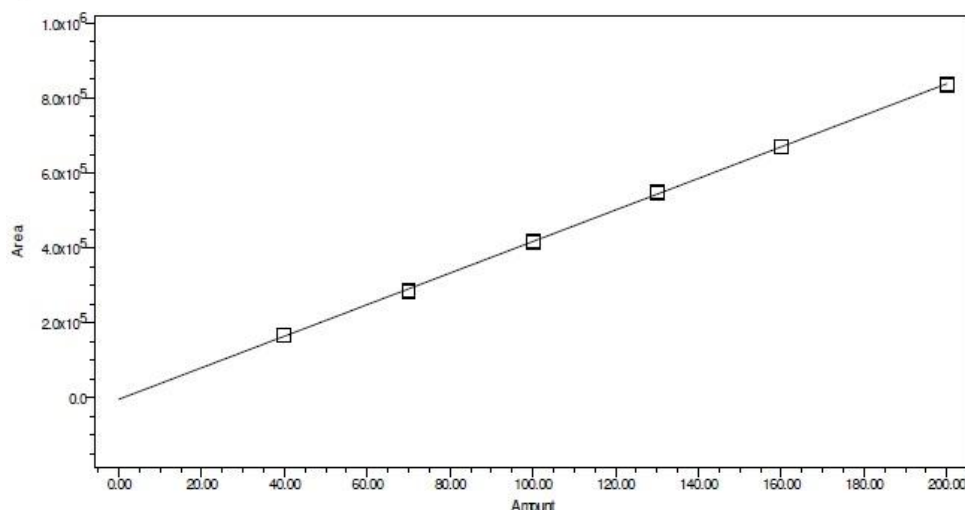
$$DS^2 = 1,753113179E+06$$

Anexo 7 – Relatório de resultados da curva de calibração com o programa Empower®



LC Calibration Report

Processing Method:	SS20130620C2	System:	HPLC5
Processing Method ID:	36275	Channel:	W2996 314.0nm+1.2
Calibration ID:	36277	Proc. Chnl. Descr.:	W2996 PDA 314.0 nm at 1.2
Date Calibrated:	5/21/2013 3:00:19 PM Europe/Lisbon		



Peak Name: Ciclamato; RT: 5.295; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 36278; R: 0.999860; R²: 0.999720; Weighting: None; Equation: Y = 4.21e+003X - 4.51e+003; Standard Error 4.154689e+003

	Sample Name	Result Id	Peak Name	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation
1	P2.1	36316	Ciclamato	40.000	167676.001	40.870	-2.13
2	P2.1	36317	Ciclamato	40.000	166523.000	40.596	-1.47
3	P2.2	36318	Ciclamato	70.000	282520.750	68.130	2.74
4	P2.2	36319	Ciclamato	70.000	286137.279	68.988	1.47
5	P2.3	36320	Ciclamato	100.000	415377.502	99.665	0.34
6	P2.3	36321	Ciclamato	100.000	416875.786	100.021	-0.02
7	P2.4	36322	Ciclamato	130.000	548904.005	131.360	-1.04
8	P2.4	36323	Ciclamato	130.000	546717.511	130.841	-0.64
9	P2.5	36324	Ciclamato	160.000	670870.000	160.310	-0.19
10	P2.5	36325	Ciclamato	160.000	670084.437	160.124	-0.08
11	P2.6	36326	Ciclamato	200.000	839005.007	200.219	-0.11
12	P2.6	36327	Ciclamato	200.000	833342.997	198.875	0.57

Anexo 8 – Folha de cálculo das concentrações de ácido ciclâmico nos ensaios de repetibilidade.

PARÂMETRO:

Ciclamato

Nº/Data de Entrada:

x | x

Amostra:

x

Observações:

Toma de Amostra	1	2	3	4	5	6
Data de início de análise:	x					
Executante:	BRS					
Pasta Nº:						
Diluição na técnica	1					
Rectas de Calibração: Y(área) vs X(µg/mL)						
Resíduos ≤ 10 %	sim					
Coefficiente correlação (r) ≥ 0,995	sim					
Toma da amostra (g)	0,5002	0,5001	0,5002	0,5000	0,5003	0,5002
Volume em que a amostra é diluída (mL)	100	100	100	100	100	100
Diluição posterior	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
Concentração Sol. Analisadas (µg/mL)	68,7350	66,7570	71,1070	71,6550	71,2460	72,4110
Concentração da Toma de Amostra (mg/kg amostra)	68707,5170	66743,6513	71078,5686	71655,0000	71203,2780	72382,0472
Concentração Média da Amostra (mg/kg Amostra)	70295,0103					
repetibilidade (CV _r =5%)	OK					
r (repetibilidade)	14059,0021					
Data de fim de análise						

Anexo 9 - Folha de cálculo do CV da repetibilidade

Natureza da amostra		x			
Descrição da amostra		x			
Método		EN 12857			
DADOS / série data de análise					
série(i)		1	2	3	
n					
1		68707,5170	70877,0000	72319,7523	
2		66743,6513	71615,6769	73370,3038	
3		71078,5686	68544,0000	73465,9204	
4		71655,0000	71038,0000	73476,8278	
5		71203,2780	70702,0000	73214,7141	
6		72382,0472	68332,3341	71374,6254	
Nº ensaios por Operador	n	6	6	6	
Média	\bar{x}	70295,0103	70184,8352	72870,3573	
Desvio Padrão	S	2134,314631	1388,945639	852,2217811	
Variância	S ²	#####	#####	#####	
CV%	CV%	3,036224934	1,978982548	1,169504052	
Desvio padrão da repetibilidade	S _{ri}	2134,314631			
Variância da repetibilidade	S _{ri} ²	#####			
Limite de repetibilidade	r	5976,080968			

Anexo 10 – Folha de cálculo do CV da precisão intermédia

Natureza da amostra	x		
Descrição da amostra	x		
Método	EN 12857		
DADOS / série data de análise			
série(i)	1	2	3
n			
1	68707,5170	70877,0000	72319,7523
2	66743,6513	71615,6769	73370,3038
3	71078,5686	68544,0000	73465,9204
4	71655,0000	71038,0000	73476,8278
5	71203,2780	70702,0000	73214,7141
6	72382,0472	68332,3341	71374,6254
Nºensaios por Operador	6	6	6

Nºensaios por Operador	n		6	6	6
Média dos ensaios de todos os operadores (N ensaios)	\bar{y}	71116,73427			
Numero total de determinações total	N	18			
	$\sum (y - \bar{y})^2$	63766913,97			
Desvio padrão da precisão intermédia	S_{Pi}	1936,748548			
Variância da precisão intermédia	S_{Pi}^2	3750994,94			
Limite de precisão intermédia	P_i	5422,895935			
CV%	CV%	2,723337296			

Anexo 11 - Análise da variância da concentração de ciclamato nas amostras (teste ANOVA)

➤ Adoçante granulado

Tabela 3 - Análise da variância entre lotes.

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	Valor P	F crítico
Entre grupos	6351937	2	3175968	1,378335	0,292305	3,982298
Dentro de grupos	25346278	11	2304207			
Total	31698215	13				

Tabela 4 - Análise da variância no mesmo lote.

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	1805601	4	451400,2	0,241772	0,903128	5,192168
Dentro de grupos	9335237	5	1867047			
Total	11140837	9				

➤ Adoçante em comprimidos

Tabela 4 - Análise da variância entre lotes.

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	1,24E+08	2	61897540	0,262051	0,774143	3,982298
Dentro de grupos	2,6E+09	11	2,36E+08			
Total	2,72E+09	13				

Tabela 5 - Análise da variância no mesmo lote.

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	1,37E+09	4	3,44E+08	1,620706	0,3017	5,192168
Dentro de grupos	1,06E+09	5	2,12E+08			
Total	2,43E+09	9				

➤ Adoçante líquido 1

Tabela 6 - Análise da variância entre lotes.

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	12630913	2	6315456	20,29416	0,000204	3,982298
Dentro de grupos	3423154	11	311195,8			
Total	16054067	13				

Tabela 7 - Análise da variância no mesmo lote.

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	825125,7	4	206281,4	7,909002	0,021736	5,192167773
Dentro de grupos	130409,3	5	26081,85			
Total	955534,9	9				

➤ Adoçante líquido 2

Tabela 8 - Análise da variância entre lotes.

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	1,11E+08	2	55518876	10,09183	0,003244	3,982298
Dentro de grupos	60515066	11	5501370			
Total	1,72E+08	13				

Tabela 9 - Análise da variância no mesmo lote.

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	6802102	4	1700526	0,162619	0,948549	5,192167773
Dentro de grupos	52285455	5	10457091			
Total	59087557	9				

Anexo 12 – Dados utilizados para calcular a quantidade de adoçante de mesa necessário de ingerir para a atingir a DDA de ciclamato em adultos e crianças.

Tabela 10 - Peso (kg) e respetiva quantidade de ácido ciclâmico necessária de ingerir para atingir a DDA de um adulto e criança.

	Peso (kg)	Quantidade de ácido ciclâmico para atingir a DDA (mg)
Adulto (M/F)	66,4	464,8
Criança (M/F)	32,5	227,5

Tabela 11 - Dados de cada adoçante de mesa, utilizados para o cálculo da quantidade necessária para ultrapassar a DDA de ciclamato.

Adoçante de mesa	Teor médio de ácido ciclâmico de todas as embalagens (%)	Conteúdo		Quantidade necessária para atingir a DDA	
		Peso	Quantidade de ácido ciclâmico	Adulto (M/F)	Criança (M/F)
Granulado	7,0	Embalagem (g)		Gramas	
		75	5,2	6,7	3,3
Comprimidos	65,0	Cada unidade (mg)		Unidades	
		60	39,0	12	6
Líquido 1	2,8	Média de uma gota (mg)		Gotas	
		25,55	0,7	650	318
Líquido 2	12,7	Média de uma gota (mg)		Gotas	
		32,8	4,2	112	55