



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

WALKÍRIA CARVALHO NAVES

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS PARA A
DETERMINAÇÃO DE ACESSULFAME E ASPARTAME EM
BEBIDAS DIETÉTICAS**

BRASÍLIA - DF

1º/2022



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA INSTITUTO DE QUÍMICA

WALKIRIA CARVALHO NAVES

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS PARA A
DETERMINAÇÃO DE ACESSULFAME E ASPARTAME EM
BEBIDAS DIETÉTICAS**

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a ANA CRISTI BASILE DIAS

Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Química Tecnológica apresentado ao Instituto de Química da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a conclusão do curso de graduação em química tecnológica.

BRASÍLIA – DF

1º/2022

Dedico a toda a minha família que sempre esteve ao meu lado, em especial à minha mãe, Cláudia que não pôde estar aqui mas sei que me guarda de onde estiver.

Agradecimentos

À minha mãe, Cláudia, que sempre fez de tudo pela minha educação. Me ajudou, incentivou, me ensinou a nunca desistir e seguir meus sonhos. Se hoje entrego este trabalho, é graças a você.

Ao meu pai Corbiniano, pelo incentivo, amor e dedicação.

Aos meus familiares em especial meus tios, Renato e Renata, que no momento mais difícil da minha vida me incentivaram a seguir meu sonho de entrar na UnB. E aos meus avós, Juçara e Mário Sérgio, que me deram todo o apoio necessário para que eu chegasse neste momento.

Ao meu grande amigo Igor que desde o início da minha graduação sempre esteve comigo nos momentos de maior preocupação me ajudando de todas as formas que pôde.

À minha amiga Carol que foi minha principal companheira durante os anos de graduação virando noites estudando e compartilhando momentos de desespero.

Ao meu namorado e amigo Rafael pela paciência, suporte, incentivo e por me acalmar nos momentos difíceis que aconteceram durante esse processo.

Ao meu primo Lucas por demonstrar sempre interesse sobre o andamento do trabalho torcendo sempre pra que tudo desse certo.

À minha amiga de laboratório Izabella que me ajudou imensamente no processo de pesquisa.

À minha orientadora Ana Cristi que me instruiu durante o período sempre com muita dedicação, carinho e paciência.

E a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte dessa caminhada.

RESUMO

O aspartame (ASP) e acessulfame (ACS) são amplamente utilizados como adoçantes sintéticos não calóricos na indústria alimentícia, principalmente refrigerantes dietéticos. Estudos atuais demonstram que a ingestão, em altas concentrações, de ASP está relacionada à problemas de saúde como dores de cabeça, alterações de humor e até desregulações neurotransmissoras. Como refrigerantes se caracterizam como matrizes complexas a determinação dos adoçantes geralmente é feita através de métodos laboriosos. Dessa forma, este trabalho objetivou o estudo de métodos rápidos e simples com a utilização de equipamentos espectroscópicos como o UV-Vis e fluorímetro.

Os resultados obtidos para o UV-Vis demonstraram há a ocorrência de um intenso efeito de matriz. Para a fluorescência observou-se uma possível interação intermolecular entre as espécies presentes na amostra. Dessa maneira torna-se necessária uma técnica de separação dos componentes.

Palavras-chave: : aspartame, acessulfame, adoçantes sintéticos, alimentos, refrigerantes, UV-Vis, fluorímetro, efeito de matriz.

ABSTRACT

Aspartame (ASP) and acesulfame (ACS) are widely used as non-caloric synthetic sweeteners in the food industry, especially diet soft drinks. Current studies show that the ingestion, in high concentrations, of ASP is related to health problems such as headaches, mood swings and even neurotransmitter dysregulations. As soft drinks are characterized as complex matrices, the determination of sweeteners is usually done through laborious methods. Thus, this work aimed to study fast and simple methods using spectroscopic equipment such as UV-Vis and fluorimeter.

The results obtained for the UV-Vis showed the occurrence of an intense matrix effect. For fluorescence, a possible intermolecular interaction between the species present in the sample was observed. Thus, a component separation technique becomes necessary.

Keywords: aspartame, acesulfame, synthetic sweeteners, foods, soft drinks, UV-Vis, fluorimeter, matrix effect.

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

OMS	Organização Mundial da Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS	Adoçantes Sintéticos
ACS	Acessulfame
ASP	Aspartame
SAC	Sacarina
HLPC	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
UV-Vis	Ultravioleta – visível

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura molecular do aspartame	16
Figura 2. Estrutura molecular do acessulfame	16
Figura 3. Espectro de absorção para a Sacarina a 5,0 mg/L, Acessulfame-K a 8,0 mg/L e Aspartame a 10,0 mg/L. (Llamas et al., 2008)	19
Figura 4. Diagrama simplificado indicando os processos que ocorrem na fluorescência.(Silva, 2016)	20
Figura 5 Espectros de absorção no UV do ASP e ACS.	25
Figura 6 Curvas de calibração UV-Vis do (A) ACS e (B) ASP.....	25
Figura 7. Espectros das curvas de adição de padrão de ACS em (A) H ₂ OH!, (B) Soda e (C) Sprite.	27
Figura 8. Curvas de adição de padrão de ACS em (A) H ₂ OH!, (B) Soda e (C) Sprite .28	
Figura 9 Espectros no UV-Vis dos sucos em pó FIT e Clight.	29
Figura 10 – Espectros (A) da curva (B) de calibração interna do ASP em H ₂ OH!	32
Figura 11. Espectro (A) e curva de calibração (B) do ASP no fluorímetro.	32
Figura 12. Espectro obtido para o ACS-K, ASP e solução de ambos adoçantes.	33
Figura 13. Estrutura molecular do aspartame.....	34
Figura 14. Estrutura molecular do ACS	34
Figura 15. Espectros da curva de adição de padrão de ASP em (A) H ₂ OH!, (B) Soda e (C) Sprite	36
Figura 16. Curva de calibração interna do ASP em (A) H ₂ OH!, (B) Soda e (C) Sprite	37

Lista de Tabelas

Tabela 2. Relação entre os resultados do rótulo e os obtidos para as análises das amostras...	26
Tabela 3. Valor de concentração de ACS encontrado após análises por UV-Vis.	29
Tabela 4. Possíveis interferentes relacionados aos seus comprimentos de onda de absorção.	30
Tabela 5. Relação entre os resultados do rótulo e os obtidos para as análises das amostras...	35

Sumário

Lista de Abreviaturas e Acrônimos	9
Lista de Figuras.....	10
Lista de Tabelas	11
1. Introdução	12
2. Objetivos	14
3. Revisão Bibliográfica.....	15
3.1. A relação da obesidade e os adoçantes	15
3.2. Aspartame e Acessulfame-K	15
3.3. Determinação do acessulfame e aspartame	17
4. Materiais e métodos	21
4.1. Reagentes	21
4.2. Equipamentos	21
4.3. Amostras	22
4.3.1. Amostras em pó	22
4.3.2. Amostras líquidas	23
4.4. Preparo de Amostras.....	23
4.4.1. Bebidas gaseificadas	23
4.4.2. Bebidas em pó.....	24
4.4.3. Construção das curvas	24
5. Resultados e discussão	25
5.1. Análises por UV-Vis	25
5.1.1. Calibração externa para determinação de ACS e ASP nas amostras.....	25
5.1.2. Adição de padrão para determinação de ACS	26
5.1.3. Adição de padrão para determinação de ASP.....	31
5.1.4. Curva de calibração externa do aspartame por espectrofluorimetria.....	32
5.1.5. Análise das amostras.....	35
6. Conclusão.....	37
7. Perspectivas futuras.....	38
8. Referências bibliográficas	39

1. Introdução

A obesidade é definida como o excesso de gordura corporal que gera o aumento do risco de doenças e da mortalidade. Mundialmente, a ocorrência da obesidade triplicou desde 1980 e, em 1998, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu a obesidade como um problema de saúde com proporções de epidemia. (Kitzinger & Karle, 2013) A prevalência dessa doença é monitorada em todo mundo pela OMS e, de acordo com os dados de 2022, cerca de 1 bilhão de pessoas estão acima do peso. (Organização Pan-Americana da Saúde, 2022)

O aumento do número de pessoas obesas fez com que houvesse maior interesse por hábitos saudáveis. Isso desencadeou o crescimento na procura por alimentos de baixas calorias nos quais é feita a substituição do açúcar por adoçantes não calóricos. (Cesar Santos de Sousa & Beatriz Abreu Gloria)

Os adoçantes são uma classe de aditivos alimentares compostos por substâncias de origem sintética ou natural utilizados para intensificar o sabor adocicado em produtos alimentícios. Aqueles que são classificados como adoçantes naturais são derivados de produtos naturais e são calóricos. Um exemplo de adoçante natural é a frutose que é, aproximadamente 1,7 vezes mais doce do que a sacarose e está presente, por exemplo, no mel e em frutas. O sorbitol e o xilitol também são exemplos de adoçantes naturais e estão presentes em frutas e vegetais. (Sardesai & Waldshan, 1991)

Os adoçantes conhecidos por artificiais são aqueles que foram obtidos através de sínteses laboratoriais. O acesulfame-K (ACS) é um adoçante não calórico que é classificado como artificial. É um adoçante que não é metabolizado pelo corpo então é excretado pelo corpo sem alguma alteração. Ele está presente em diversos tipos de alimentos, em produtos de higiene bucal e também em produtos farmacêuticos sendo liberado em aproximadamente 90 países. (Cantarelli et al., 2009a)

O aspartame é amplamente utilizado para manter o sabor adocicado por longos períodos em alimentos e bebidas, especialmente refrigerantes. No entanto, a sua metabolização gera produtos como a fenilalanina, ácido aspártico e o metanol que podem ser tóxicos quando ingeridos em altas concentrações. (Buyukgoz et al., 2015a; Lindseth et al., 2014a) A fenilalanina está envolvida na regulação neurotransmissora e o ácido aspártico é um neurotransmissor excitatório e a alteração da regulação neurotransmissora pode resultar em distúrbios neurocomportamentais. (Lindseth et al., 2014a) Além disso,

estudos realizados em ratos demonstraram que o consumo prolongado e em altas concentrações desse adoçante induz o surgimento de tumores malignos. (Landrigan & Straif, 2021)

Por esse motivo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária determinou em 2018 os limites máximos para ASP e ACS em 750 mg/L e 350 mg/L, respectivamente. (ANVISA, 2018)

Para a quantificação dessas substâncias o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou, em 2013, uma instrução de trabalho onde define que a cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector UV-Vis (HPLC-UV) é a técnica indicada para a determinação desses adoçantes em bebidas (MAPA, 2013). Na literatura também encontram-se trabalhos utilizando métodos baseados em HPLC acoplado a outros detectores como infravermelho e fluorescência. (Cheng & Wu, 2011a; George et al., 2010a; Zamzam et al., 2019) Porém, a utilização do HPLC é onerosa e demorada.

Tendo em vista esses pontos principais, este trabalho possui como principal objetivo a avaliação de métodos espectroscópicos para a determinação do teor de aspartame e acessulfame em amostras de bebidas dietéticas visando um método rápido, menos oneroso e de baixo custo.

2. Objetivos

Este trabalho possui como objetivo geral realizar o estudo dos métodos espectroscópicos para a análise de adoçantes em refrigerantes e sucos dietéticos de maneira rápida e simplificada. Como grande parte desses produtos possui, em sua composição, o aspartame e acesulfame como edulcorantes então este trabalho estará focado na análise de amostras para a determinação desses analitos.

3. Objetivos específicos

- Determinar aspartame e acesulfame através do UV-Vis.
- Determinar aspartame por fluorimetria.

4. Revisão Bibliográfica

4.1. A relação da obesidade e os adoçantes

Um dos problemas relacionados ao aumento da ingestão de adoçantes é a obesidade. Doença esta que possui característica complexa sendo amplamente evitável e, juntamente com o excesso de peso, afeta mais de um terço da população mundial. A previsão, caso as tendências mantenham-se, é de que em 2030, 38% da população adulta do mundo tenha excesso de peso e que 20% sejam obesos. (Jonas, 2018)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde – OMS, desde 1975 os casos de obesidade mundial triplicaram, sendo que, em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos – considerando pessoas com 18 anos ou mais – apresentavam excesso de peso. (Jonas, 2018)

O aumento da obesidade mundial está ligado à diminuição de atividades físicas e alterações no comportamento alimentar onde são incluídos alimentos que possuem alto teor de açúcar. Dessa forma, a indústria, já há algum tempo, tem substituído a sacarose por adoçantes artificiais (AS).

Com o aumento do uso de edulcorantes pela população e indústria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA determinou limites máximos que são estipulados na resolução publicada em 2018. (ANVISA, 2018)

Também de acordo com essa norma, a ANVISA define que, para alimentos contendo dois ou mais aditivos alimentares que possuam a mesma função tecnológica, a quantidade somada desses aditivos não pode superar o limite do aditivo em maior quantidade individual.

4.2. Aspartame e Acesulfame-K

O *Aspartame* (Figura 1) é um adoçante sintético não nutritivo que possui baixo valor calórico (Llamas et al., 2008) e foi descoberto acidentalmente nos Estados Unidos em 1965 na tentativa de desenvolver um sedativo para úlceras. Depois da sacarina, o aspartame é um dos adoçantes mais usado como substituto do açúcar no mundo, (Landrigan & Straif, 2021) sendo encontrado em diversos produtos como refrigerantes e sobremesas.

Estudos realizados em 2007 mostraram que o consumo regular desse adoçante pode ser potencialmente cancerígeno e, em 2021, outro estudo realizado em ratos reforçou essa teoria afirmando que há a incidência de tumores malignos em múltiplos órgãos (Huff &

Ladou, n.d.; Landrigan & Straif, 2021b). Em 2014 foi publicado um trabalho afirmando que os produtos da metabolização do aspartame são responsáveis por diversos efeitos adversos como dores de cabeça, comprometimento da memória, mudanças de humor e depressão, chegando até a alterar as regulações neurotransmissoras, gerando distúrbios neurocomportamentais e, por esse motivo seu limite máximo estabelecido pela ANVISA é de 750 mg/L. (Lindseth et al., 2014b).

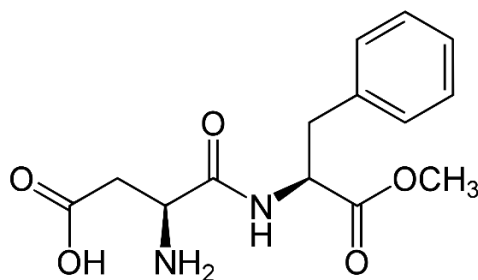


Figura 1. Estrutura molecular do aspartame

O Acessulfame-K (Figura 2) é um adoçante sintético não nutritivo que foi descoberto em 1967 porém só foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 1988. Em um estudo feito foi descoberto que as variações do posicionamento dos substituintes no anel causavam grande influência em sua doçura, mas, quando em altas concentrações, gera um sabor residual amargo.

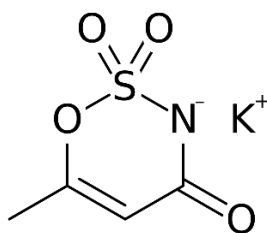


Figura 2. Estrutura molecular do acessulfame

Nos últimos anos sua utilização vem crescendo, já que ele é utilizado em diversos alimentos processados pois ele pode ser congelado ou aquecido sem perder seu poder adoçante. Assim como o aspartame, o acessulfame é utilizado em diversos alimentos incluindo doces, sucos, refrigerantes e em produtos farmacêuticos.

Em 2010, um estudo divulgado criticou os testes realizados antes da liberação desse adoçante sintético (AS) para o consumo pois, apesar das autoridades liberarem o consumo de acessulfame, testes realizados em ratos mostraram que os índices de problemas

respiratórios e a incidência de tumores foram muito altas. (Karstadt, 2010)

De forma parecida ao aspartame, a ANVISA estabeleceu limites máximos de utilização para esse adoçante. Dessa forma, de acordo com a resolução publicada em 2018, o limite máximo diário para este AS é de 350 mg/L em alimentos dietéticos.

As amostras escolhidas para a análise neste trabalho foram os refrigerantes e sucos dietéticos, que em sua maioria possuem os adoçantes aspartame e acessulfame em sua composição, e por esse motivo, a pesquisa desse trabalho estará focada nesses adoçantes.

4.3. Determinação do acessulfame e aspartame

Diversas técnicas analíticas são empregadas para a identificação e quantificação de adoçantes sintéticos. Em amostras alimentícias, é necessário implementar técnicas que proporcionem confiabilidade, seletividade, sensibilidade, rapidez, segurança operacional e que possuam baixo custo que estejam associadas ao número de amostras disponíveis, os equipamentos e reagentes disponíveis, o tempo disponível do analista para a análise e, principalmente, a matriz das amostras. (Martins et al., 2019)

As técnicas cromatográficas são as mais usadas para realizar a separação dos componentes dessas amostras uma vez que são aplicadas para separar, identificar e quantificar compostos orgânicos e inorgânicos baseado na partição ou distribuição de uma amostra entre uma fase estacionária e móvel.

O HPLC é considerado a técnica de referência (MAPA, 2013) para esse tipo de análise e é o mais utilizado já que possui alta eficiência, grande sensibilidade devido a diversidade de detectores e a fácil recuperação das amostras contendo adoçantes com uma resolução adequada.

Além disso, o HPLC é capaz de realizar a separação de adoçantes como o ciclamato, sacarina, aspartame, acessulfame-K e sucralose simultaneamente (Cantarelli et al., 2009; Grembecka et al., 2014; Liu et al., 2014; Yang & Chen, 2009) utilizando da coluna do tipo C-18 (Grembecka et al., 2014; Lim et al., 2013). George et al. (2010) desenvolveu um método realizando o preparo de amostras com a utilização de cartuchos de extração em fase sólida antes da injeção no equipamento. Essa abordagem é, normalmente, acoplada à outras como o UV e fluorescência combinada com diferentes formas de detecção (Cheng & Wu, 2011; George et al., 2010; Zamzam et al., 2019) já que o HPLC é utilizado para separar os componentes das amostras sendo possível, assim, ser feita a detecção dos analitos.

No entanto, o HPLC possui algumas desvantagens como o alto custo da instrumentação, a necessidade de um analista treinado, de demandar muito tempo para que todos os parâmetros sejam definidos e também a necessidade de muitas etapas de preparação de amostras com a utilização de diferentes compostos químicos (Cesar Santos de Sousa & Beatriz Abreu Gloria) gerando resíduos tóxicos proveniente dos solventes orgânicos.

Nos últimos anos, as técnicas eletroanalíticas vêm ganhando espaço quando se trata de estudos envolvendo adoçantes devido sua capacidade de determinar simultaneamente AS como aspartame e acessulfame-K, sua simplicidade operacional, a não necessidade de pré-tratamento, rapidez (Martins et al., 2019) e sensibilidade.

Estudos como a determinação de aspartame e acessulfame-K simultaneamente utilizando voltametria de varredura linear e calibração multivariada são encontrados porém a técnica, apesar de produzir bons resultados, necessita de tratamento dos dados por quimiometria (Pierini et al., 2013) que é um processo oneroso, além disso, elas não apresentam boa reprodutibilidade caracterizando desvantagens desse método. (Martins et al., 2019)

O infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), é uma técnica rápida e exata. O FTIR não promove a destruição da amostra e também ser capaz de determinar simultaneamente vários analitos de adoçantes artificiais como o ciclamato, sucralose, sacarina, acessulfame-K e aspartame porém é associada ao tratamento quimiométrico como, por exemplo, o PLS. A quimiometria é aplicada para a resolução de picos sobrepostos (Khurana et al., 2008; Wang et al., 2020) e a sua utilização limita o analista que deve possuir o treinamento para o tratamento adequado dos dados.

A espectroscopia Raman também é utilizada para análises de vários adoçantes de maneira simultânea sendo uma técnica não destrutiva e que não requer pré tratamento das amostras. Um estudo realizado em refrigerantes para a detecção de aspartame utilizou nanopartículas de prata combinado à técnica Raman obtendo um método com alta linearidade, sensibilidade e precisão. (Buyukgoz et al., 2015) Outro estudo foi realizado em adoçantes de mesa em pó pra a determinação de aspartame, ciclamato, sacarina e acessulfame. Esse estudo foi realizado utilizando PLS como tratamento de dados. (Duarte et al., 2017)

Essa técnica pode ser aplicada para amostras líquidas e sólidas sendo caracterizada

por uma análise rápida e barata, porém o fraco espalhamento da luz pelo raman gera uma técnica de baixa sensibilidade analítica, sendo essa a sua desvantagem para utilização. (Martins et al., 2019) Além disso, ela não se caracteriza como uma análise onerosa já que é necessário o tratamento de dados como o PLS ou a utilização da derivatização, como o caso das nanopartículas de prata.

A técnica do UV-Vis se baseia na absorção de radiação na região do ultravioleta e visível onde é medida a quantidade de luz absorvida pela amostra. Dessa forma, um feixe de luz, no comprimento de onda desejado, incide na amostra, que a absorve, fazendo a quantificação através da detecção da quantidade de luz absorvida.

O UV-Vis se encaixa bem na determinação do acessulfame e aspartame já que estes apresentam picos de absorção em 227 nm e 210 nm, respectivamente, como descrito na Figura 3. (Fernandes et al., 2013; Cantarelli et al., 2009)

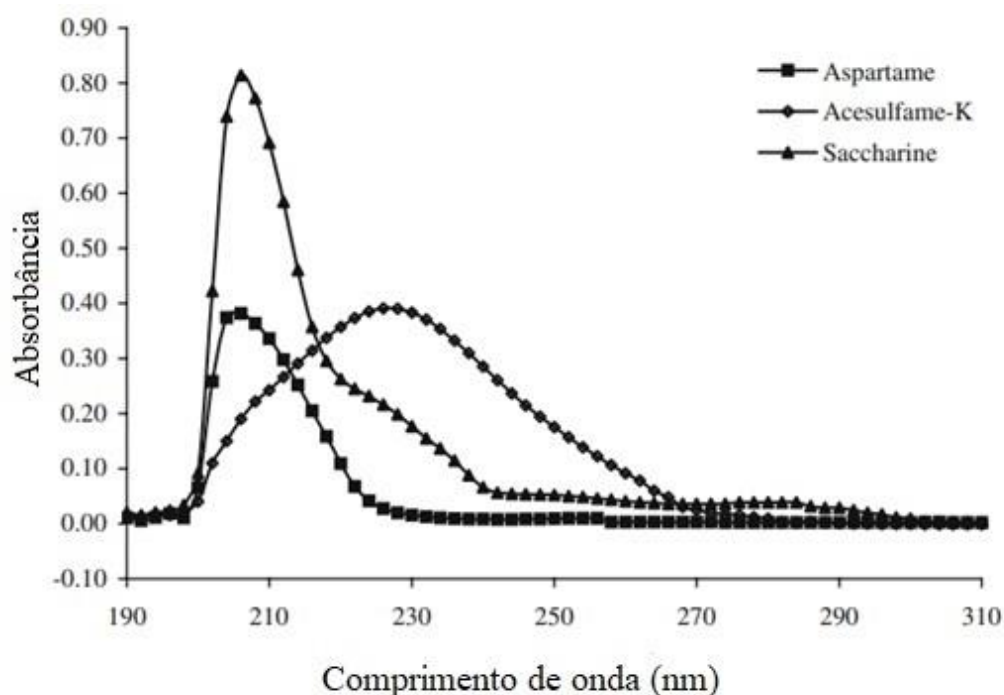


Figura 3. Espectro de absorção para a Sacarina a 5,0 mg/L, Acesulfame-K a 8,0 mg/L e Aspartame a 10,0 mg/L. Adaptado de (Llamas et al., 2008)

Essa absorção se dá pela presença de grupos cromóforos na molécula do ACS-K que é dada pelas duplas ligações e pelos elétrons não ligantes. Já no aspartame a absorção é feita pela presença de elétrons não ligantes, duplas ligações, oxigênios presentes na molécula e pelo anel aromático.

O uso do UV-Vis se encaixa bem na análise de aspartame e acessulfame por ser um

método simples e rápido (Llamas et al., 2008) graças também ao seu baixo custo, não destruição das amostras, facilidade operacional.

Já a fluorimetria possui instrumentação baseada na emissão de fótons. Ela ocorre devido a emissão de radiação das espécies químicas após terem absorvido radiação eletromagnética na região do visível e do ultravioleta havendo a transição do estado fundamental para o excitado. A liberação de fótons ocorre quando a molécula, depois de absorver energia, relaxa e a liberação desses fótons resulta na fluorescência (Figura 4).(Silva, 2016)

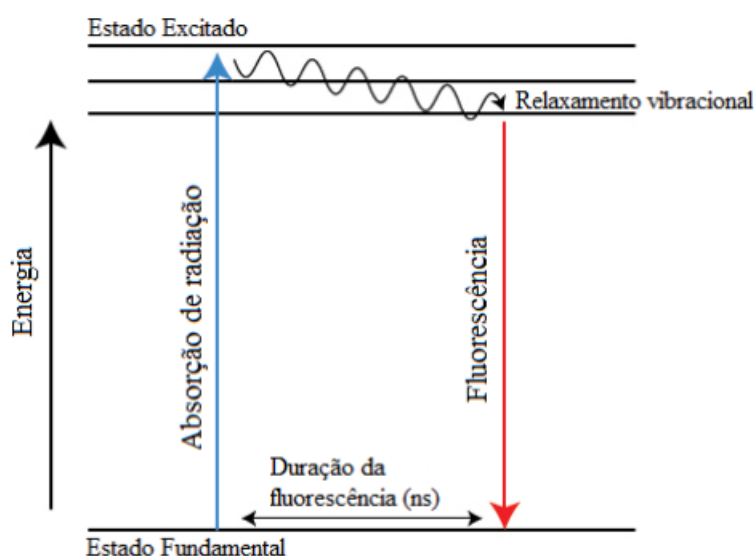


Figura 4. Diagrama simplificado indicando os processos que ocorrem na fluorescência. Adaptado de (Silva, 2016)

Essa técnica possui seletividade pois é necessário que os analitos escolhidos para serem estudados necessitam possuir, em sua estrutura, anéis e estruturas químicas rígidas para que sejam capazes de emitir radiação eletromagnética. A estrutura molecular possui grande importância sobre a luminescência de forma que moléculas ricas em elétrons π , como as aromáticas, contendo ou não heteroátomos em sua cadeia principal, são potencialmente fluorescentes. (Flávia Ferreira de Carvalho Marques, 2009)

Em adoçantes, poucos são os compostos capazes de fluorescer porém, estudos encontrados na literatura demonstram que o aspartame possui essa característica (Cheng & Wu, 2011; Wrobel & Wrobel, 1997) para os comprimentos de onda máximos de excitação (λ_{exc}) em 210 nm e de emissão (λ_{em}) em 285 nm com fenda de 20 nm.(Silva,

2016) O que faz com que a fluorimetria seja uma boa técnica para ser aplicada na determinação de aspartame visto que outros componentes presentes na amostra não são capazes de fluorescer.

Na tentativa de contornar os entraves correspondentes ao uso da cromatografia, encontramos na técnica do UV-Vis maior facilidade e rapidez (Llamas et al., 2008), que possui baixo custo e é livre de solvente (Wang et al., 2020) quando comparado à cromatografia. Essa técnica será utilizada para a determinação do acessulfame que possui resposta à esse método. Para o aspartame, como dito anteriormente, o método que mais se adequa à análise desse edulcorante é a fluorescência já que essa molécula é capaz de emitir radiação.

5. Materiais e métodos

5.1. Reagentes

- Acessulfame grau P.A, Sigma-Aldrich;
- Aspartame grau P.A, Sigma-Aldrich;
- EDTA, Sigma-Aldrich;
- Ácido cítrico, Sigma-Aldrich;

5.2. Equipamentos

- Balança analítica, Shimadzu AX200, precisão de 0,0001 g;
- Balões volumétricos de 25 mL;
- Banho ultrassom Unique, Ultracleaner, 1400;
- Espectrofotômetro UV-Vis Agilent Technologies, Cary 8454;
- Cubetas de quartzo com tampa 3,5 mL;
- Papel filtro quantitativo
- Tiras indicadoras de pH, MQuant, Supelco;
- Espectrofluorímetro Cary Eclipse, Agilent;

5.3. Amostras

5.3.1. Amostras em pó

Suco em pó 1	Suco em pó 2
Maltodextrina	Maltodextrina
Vitamina C	Suco de limão desidratado
Suco de limão desidratado	Acidulante ácido cítrico
Vitamina A	Aromatizante aroma natural de limão
Vitamina B6	Antiumectante fosfato tricálcico
Vitamina B1	Aspartame na concentração 38,6 mg em 100 mL
Acidulante ácido cítrico	Acessulfame na concentração 5,7 mg em 100 mL
Regulador de acidez citrato de sódio	Regulador de acidez citrato de sódio
Aspartame na concentração 44 mg em 100 mL	Estabilizantes: carboximetilcelulose sódica e goma xantana
Acessulfame na concentração 5,6 mg em 100 mL	Corante inorgânico dióxido de titânio
Antiumectante fosfato tricálcico	Corante artificial tartazina
Aromatizante	
Espessantes: goma guar e carboximetilcelulose sódica	
Corantes: dióxido de titânio e tartrazina	

5.3.2. Amostras líquidas

Bebida gaseificada sabor limão 1	Bebida gaseificada sabor limão 2	Bebida gaseificada sabor limão 3
Vitaminas B3, B5 e B6	Água gaseificada	Água gaseificada
Aromatizante	Suco de limão	Suco concentrado de limão
Benzoato de sódio	Aroma natural	Aromatizante
Sorbato de potássio	Sorbato de potássio	Aspartame na concentração de 34,8 mg em 100 mL
Acidulante ácido cítrico	Benzoato de sódio	Acessulfame na concentração de 9 mg em 100 mL
Aspartame na concentração de 21,1 mg em 100 mL	Aspartame na concentração de 21 mg em 100 mL	Conservador benzoato de sódio
Acessulfame na concentração de 5,3 mg em 100 mL	Acessulfame na concentração de 5 mg em 100 mL	Acidulante ácido cítrico
EDTA	EDTA	

5.4. Preparo de Amostras

5.4.1. Bebidas gaseificadas

As bebidas gaseificadas foram colocadas por 20 minutos no ultrassom para a retirada do seu gás e então diluídas de acordo com a concentração final desejada. Essas amostras foram preparadas em balões volumétricos com concentrações crescentes de edulcorante

para a aplicação de uma curva de adição de padrão com faixa de concentração entre 1,0 mg/L a 5,0 mg/L. Utilizando a equação encontrada para a curva a partir da leitura das amostras no UV-Vis, calculada sua concentração e verificada sua conformidade em relação ao informado pelo fabricante no rótulo.

5.4.2. Bebidas em pó

Para bebidas em pó, foram preparadas soluções dissolvendo uma massa de amostra em água destilada. As soluções foram colocadas no ultrassom para dissolução completa. Para que fosse possível sua leitura no UV-Vis.

5.4.3. Construção das curvas

As curvas de calibração externa utilizadas neste estudo foram construídas a partir de soluções de padrão de ASP e ACS preparadas em água destilada com concentrações 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg/L.

As medidas foram feitas em triplicata e relacionadas entre a média das absorvâncias ou intensidades obtidas e suas respectivas concentrações. As concentrações e preparo foram os mesmos para a determinação da fluorescência.

6. Resultados e discussão

6.1. Análises por UV-Vis

6.1.1. Calibração externa para determinação de ACS e ASP nas amostras

A partir da análise dos espectros obtidos no espectrofotômetro (Figura 5) foi verificado que o comprimento de onda de máxima absorção do ACS é 227 nm. Já para o ASP, o comprimento de onda de máxima absorção é menor do que 200 nm, o que dificulta a visualização, porém a sua análise é realizada considerando o comprimento de onda de 210 nm (Grembecka et al., 2014).

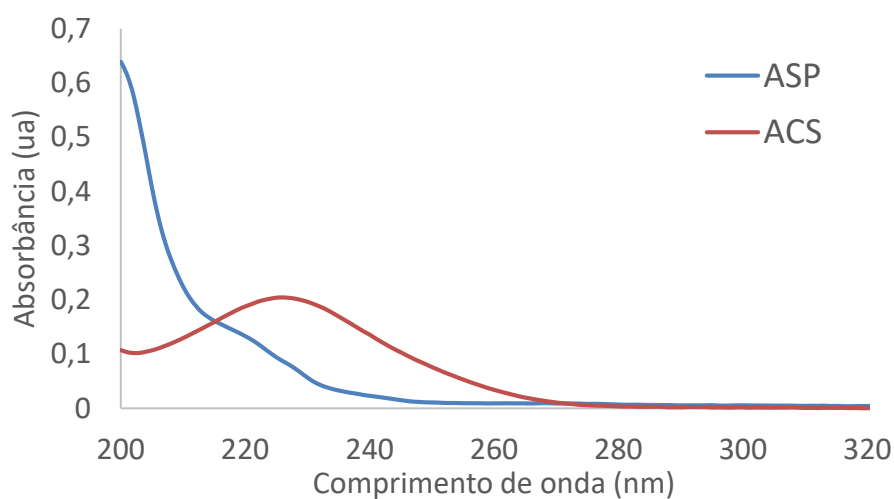


Figura 5 Espectros de absorção no UV do ASP e ACS.

Para a quantificação do ACS e ASP nas diversas amostras de bebidas dietéticas foram construídas curvas de calibração externa nas faixas de concentração de 1,0 a 5,0 mg/L dispostas na figura 6.

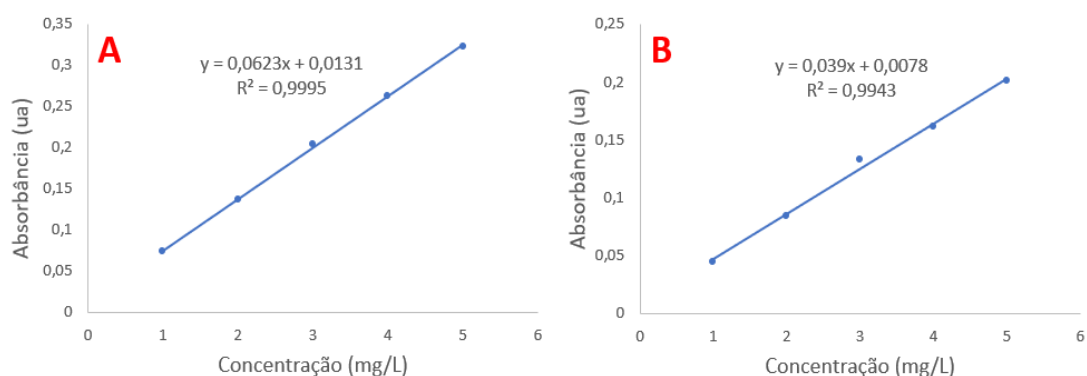


Figura 6 Curvas de calibração UV-Vis do (A) ACS e (B) ASP.

Com base nas curvas analíticas e nos espectros, é possível identificar que o ACS possui melhor resposta para a técnica do UV-Vis do que o ASP pois o ACS demonstrou melhor linearidade. Além da linearidade, o método demonstrou maior sensibilidade para o ACS já que a inclinação relacionada para a sua equação da reta, é maior quando comparado com o ASP. Essas condições se dão pela presença dos grupos cromóforos no ACS que absorvem em um maior comprimento de onda que consegue ser melhor detectado pelo equipamento gerando melhor sinal já que a molécula possui maior absorvidade molar.

As amostras diluídas foram analisadas nos comprimentos de onda de 210 e 227 nm. As absorbâncias obtidas foram calculadas na curva de calibração externa e resultaram nos valores da Tabela 2.

Tabela 1. Relação entre os resultados do rótulo e os obtidos para as análises das amostras.

	Acessulfame		Aspartame	
	Rótulo	Obtido	Rótulo	Obtido
<hr/>				
Bebida				
gaseificada	50 mg/L	541,41 mg/L	211 mg/L	3.028,15 mg/L
sabor limão 1				
Bebida				
gaseificada	90 mg/L	490,05 mg/L	348 mg/L	4.603,21 mg/L
sabor limão 2				
Bebida				
gaseificada	50 mg/L	475, 50 mg/L	210 mg/L	3.217,70 mg/L
sabor limão 3				
<hr/>				

Visto que os valores obtidos diferem muito dos valores descritos nos rótulos, chega-se à conclusão de que há um grande efeito de matriz e, por esse motivo, foi contruída a curva analítica de adição de padrão.

6.1.2. Adição de padrão para determinação de ACS

Amostras como as bebidas gaseificadas sabor limão são zero açúcar e, neste caso, são adoçadas com dois edulcorantes sendo eles ASP e ACS. Suas concentrações e demais

componentes estão dispostos no item 4.4.

As amostras foram diluídas até a obtenção de uma concentração estimada de 0,6 mg/L de ACS para as bebidas gaseificadas 1 e 2 e 0,9 mg/L de ACS para a 3, de acordo com o rótulo do fabricante (item 4.3.1). As soluções foram lidas no UV-Vis (Figuras 7A, B e C) e foram construídas as curvas de calibração considerando a absorbância em 227 nm (Figuras 8A, B e C).

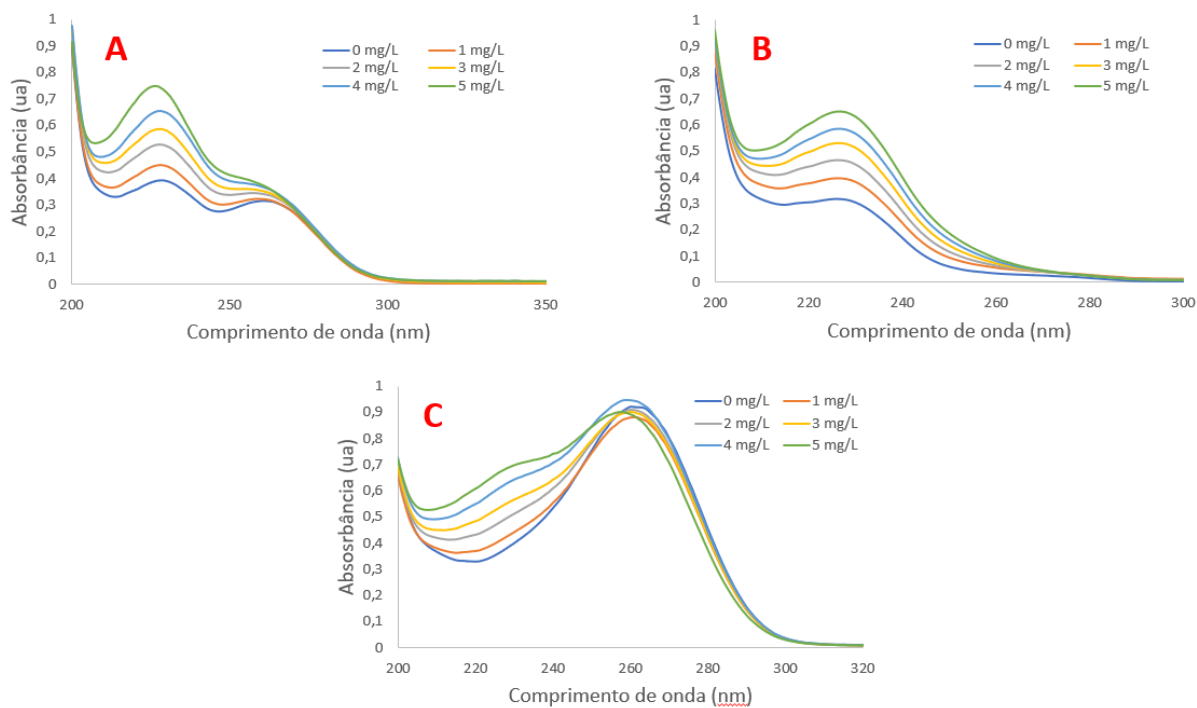


Figura 7. Espectros das curvas de adição de padrão de ACS nas bebidas gaseificadas (A) 1, (B) 2 e (C) 3.

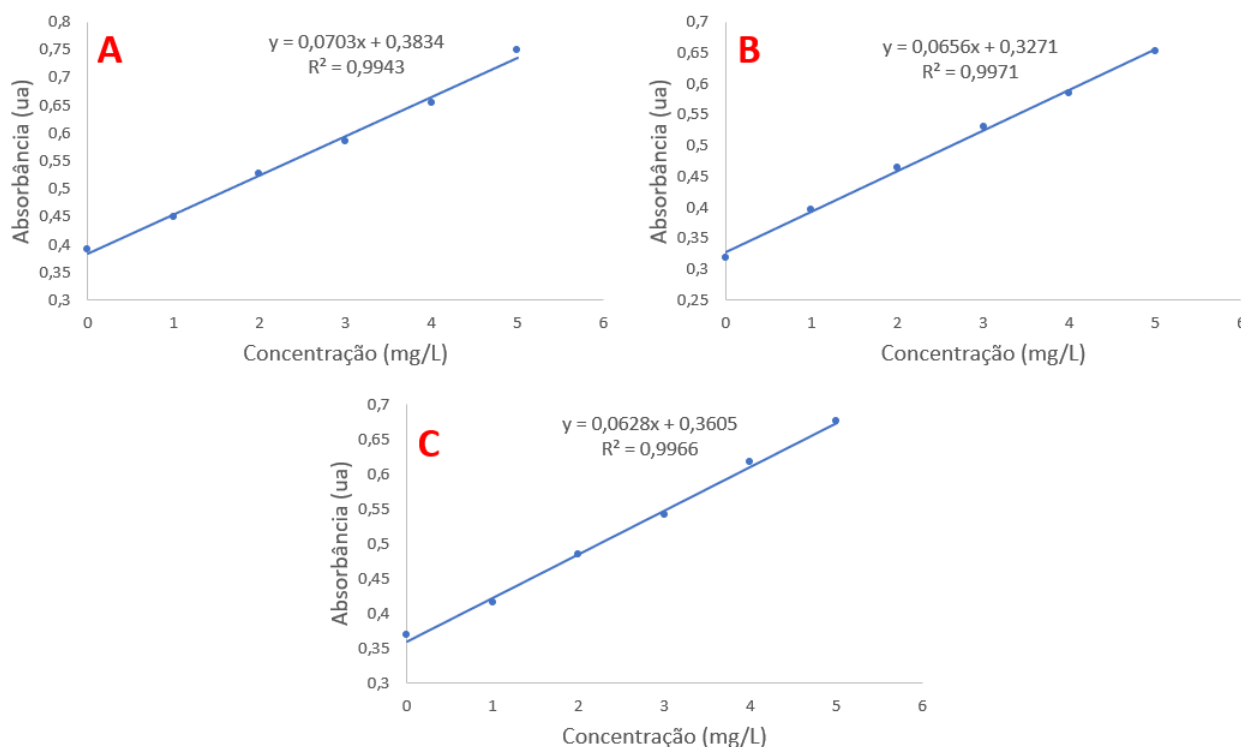


Figura 8. Curvas de adição de padrão de ACS nas bebidas gaseificadas (A) 1, (B) 2 e (C) 3.

Analisando os espectros da Figura 7A e B obtidos para as bebidas 1 e 2 é possível perceber que houve uma boa resposta à adição de padrão gerando um pico bem definido na faixa aproximada de 227 nm. Porém, a partir da equação da reta para a curva de adição de padrão da Figura 8A e B, foram calculadas as concentrações de ACS de 486,94 mg/L para a bebida gaseificada 1 e 498,63 mg/L para a bebida gaseificada 2 o que não está em conformidade com o rótulo das amostras uma vez que, no rótulo da 1, é informada a concentração de 5 mg em 100 mL e para a 2, a concentração de 9 mg em 100 mL. Sendo assim, em um litro de amostra da bebida gaseificada 1 e 2 teríamos 50 e 90 mg, respectivamente, de ACS. Esse resultado demonstra que os compostos interferentes também estão absorvendo no mesmo comprimento de onda do ACS. Para minimizar esse efeito, o ideal seria realizar a separação dos interferentes antes de realizar a leitura no UV-Vis, retirando o máximo possível dos interferentes.

Já para o espectro da Figura 7C é possível perceber que a aplicação de adição de padrão à bebida gaseificada 3 não gerou bons resultados já que o pico a 227 nm não se mostrou definido provavelmente por causa dos interferentes presentes na amostra que também possuem pico de absorção no comprimento de onda de 227 nm. Calculando a concentração de ACS presente na amostra a partir da equação da reta obtida na Figura 8C encontra-se o valor de 478,37 mg/L o que também não possui conformidade com o

informado no rótulo já que este informa a concentração de 5 mg a cada 100 mL o que seria 50 mg/L. Este resultado também demonstra que houve efeito de matriz, o que indica a necessidade de um preparo de amostra para melhores resultados.

Foram analisadas duas amostras diferentes de sucos em pó. Ambas soluções precisaram ser filtradas pois continham partículas suspensas porém o espectro obtido para as duas amostras não foi satisfatório já que os mesmos não apresentaram pico de absorção a 227 nm. O espectro obtido para as duas amostras está ilustrado na Figura 9.

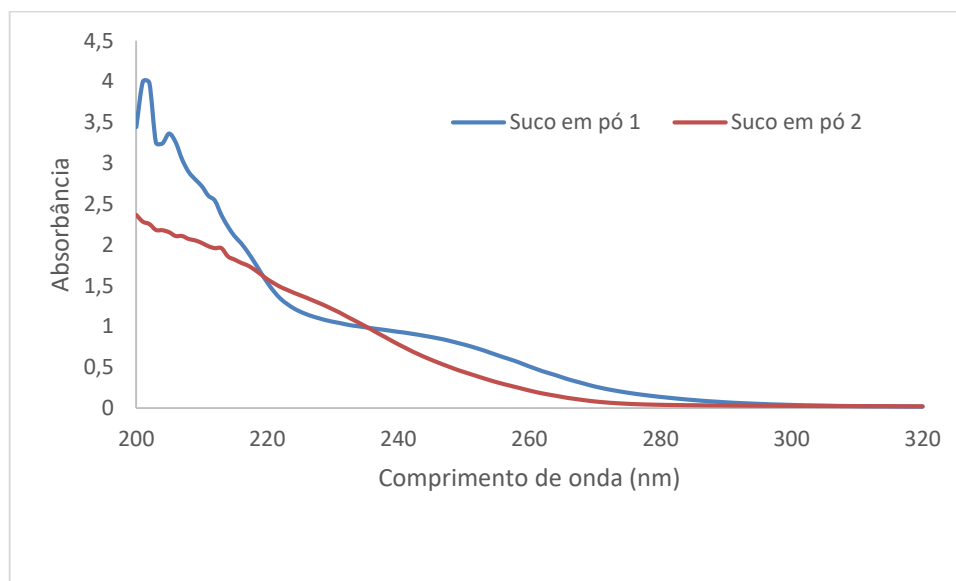


Figura 9 Espectros no UV-Vis dos sucos em pó FIT e Clight.

A partir dos valores obtidos das análises das amostras das bebidas gaseificadas, em relação aos informados pelo fabricante no rótulo é possível perceber que há uma diferença grande. Para melhor visualização foi calculado o erro relativo referente à esses resultados. Os valores obtidos estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 2. Valor de concentração de ACS encontrado após análises por UV-Vis.

Bebida gaseificada	Valor do Rótulo	Valor Obtido	Erro Relativo
1	50 mg/L	486,94 mg/L	873,88%
2	50 mg/L	478,37 mg/L	856,74%
3	90 mg/L	498,63 mg/L	454,03%

O Erro relativo foi calculado a partir da seguinte equação:

$$\text{Erro Relativo} = \frac{\text{Valor Obtido} - \text{Valor do Rótulo}}{\text{Valor do Rótulo}} \cdot 100\%$$

Levando em consideração a diferença entre os valores encontrados e os informados pelo fabricante e o erro relativo calculado (Tabela 2) pode-se inferir que há efeito de matriz. Como o rótulo das bebidas apresenta sua composição química, foi verificado se os possíveis interferentes podem estar absorvendo radiação eletromagnética no mesmo comprimento de onda que está sendo utilizado.

Tabela 3. Possíveis interferentes relacionados aos seus comprimentos de onda de absorção.

Composto	Faixa de absorção (nm)	Pico máximo de absorção (nm)
Benzoato de Sódio	~190 – 290 (Howard et al., 2009)	~228
Ácido Cítrico	~260 – 450 (Krishnaswamy et al., 2019)	~288
Sorbato de Potássio	~200 – 280 (John Wiley & Sons, I)	~250
EDTA	~200 – 230	~200
Vitamina B3	~ 253 – 270 (John Wiley & Sons, I)	~256,5
Vitamina B5	~190 – 228 (Muhamad et al., 2015)	~195
Vitamina B6	~288 – 296 (John Wiley & Sons, I)	~292

De acordo com o rótulo dos fabricantes, alguns componentes são comuns para as três amostras analisadas sendo um deles o benzoato de sódio. Baseado em pesquisas feitas (Howard et al., 2009), o benzoato de sódio possui absorção no intervalo de comprimento de onda 190 a 290 nm com pico máximo de absorção a 228 nm. Dessa forma ele se torna um potencial interferente pois sua faixa de absorção compreende o comprimento de onda

analisado.

Outro componente comum entre as amostras é o ácido cítrico que, apesar de estar presente na composição química da amostra, ele não se caracteriza como um interferente já que sua absorção máxima está próxima de 288 nm (Krishnaswamy et al., 2019), e a faixa de absorção está entre 260 e 450 nm como está relacionado na Tabela 4. O pico de 288 nm se dá pela presença de três ácidos carboxílicos (Krishnaswamy et al., 2019) na molécula gerando um comprimento de onda que não compreende a faixa estudada.

Para as amostras das bebidas gaseificadas 1 e 2, o sorbato de potássio é adicionado à composição. Como disposto na Tabela 2, sua absorção máxima está próxima de 250 nm porém sua faixa de absorção está entre 200 e 280 nm. Sendo assim, no comprimento de onda de 227 nm, há uma pequena absorção. Dessa forma o sorbato de potássio se caracteriza como um interferente.

Assim como o benzoato de sódio, o EDTA está presente nas amostras de bebidas gaseificadas 1 e 2. De acordo com a Tabela 2, é possível afirmar que esse composto se caracteriza como um interferente já que a sua faixa de absorção compreende o comprimento de onda de 200 a 230 nm onde, apesar de baixa, há absorção em 227 nm.

Na bebida 1, além desses compostos também estão presentes as vitaminas B3, B5 e B6. Como relacionado na Tabela 2, é possível afirmar que a vitamina B3 não é um interferente já que o início de sua absorção é por volta de 253 nm, sendo seu pico máximo de absorção aproximada em 256,5 nm. Já a vitamina B5 possui uma pequena absorção a 227 nm já que sua faixa de absorção está entre 190 e 228 nm, sendo assim ela se caracteriza como um interferente. A vitamina B6 não se caracteriza como um interferente já que sua faixa de absorção está entre 288 e 296 nm.

As faixas de absorção e pico máximo para o sorbato de potássio, vitamina B3 e B6 utilizam o metanol como solvente (John Wiley & Sons, I). Isso pode gerar um deslocamento do pico máximo de absorção.

6.1.3. Adição de padrão para determinação de ASP

No caso do ASP, foi feita análise apenas na amostras da bebida gaseificada 1, esta foi diluída até a obtenção de uma concentração estimada de 0,6 mg/L de ASP de acordo com o rótulo do fabricante (item 4.3.1). As soluções foram lidas no UV-Vis (Figura 10A) e, a partir da curva analítica obtida (Figura 10A), a concentração obtida foi de 1142,61 mg/L.

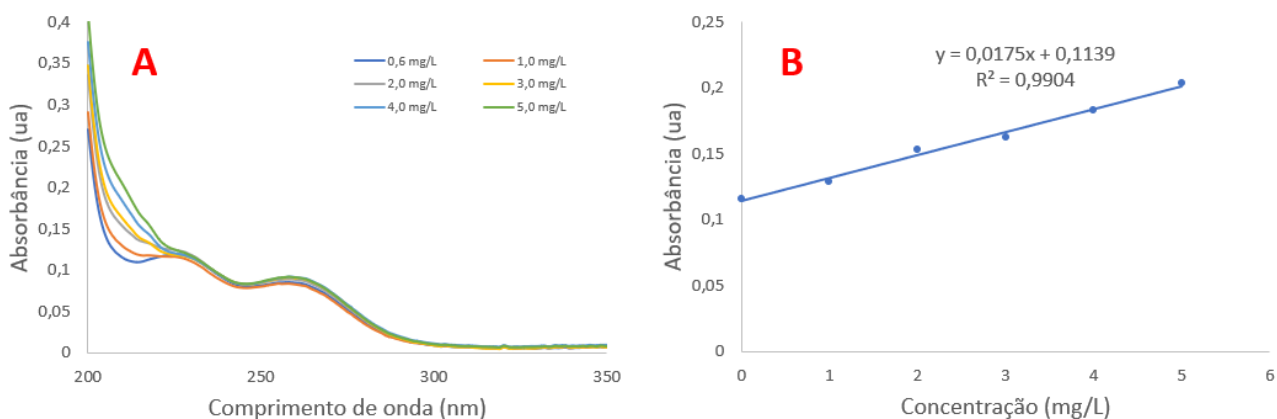


Figura 10. Espectros (A) da curva (B) de calibração interna do ASP na bebida gaseificada 1.

Tendo em vista os resultados obtidos para o ASP pelo método de UV-Vis e percebendo que ocorre um grande efeito de matriz, a saída encontrada foi realizar as análises das amostras através da fluorimetria já que, nesse método, apenas o aspartame possui as características necessárias para fluorescer.

6.1.4. Curva de calibração externa do aspartame por espectrofluorimetria

Primeiramente foi realizando o estudo para determinar os comprimentos de onda máximos para excitação e emissão. Para isso fez-se a varredura do aspartame em solução de concentração 5 mg/L. Encontrou-se o par $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ em 206/285 nm, obtidos com fenda de 20 nm.

A partir do aspartame grau P.A foi feita a curva de calibração com concentrações crescentes de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg/L utilizando água destilada por osmose reversa como solvente. O espectro e a curva estão dispostos nas Figuras 11A e B, respectivamente.

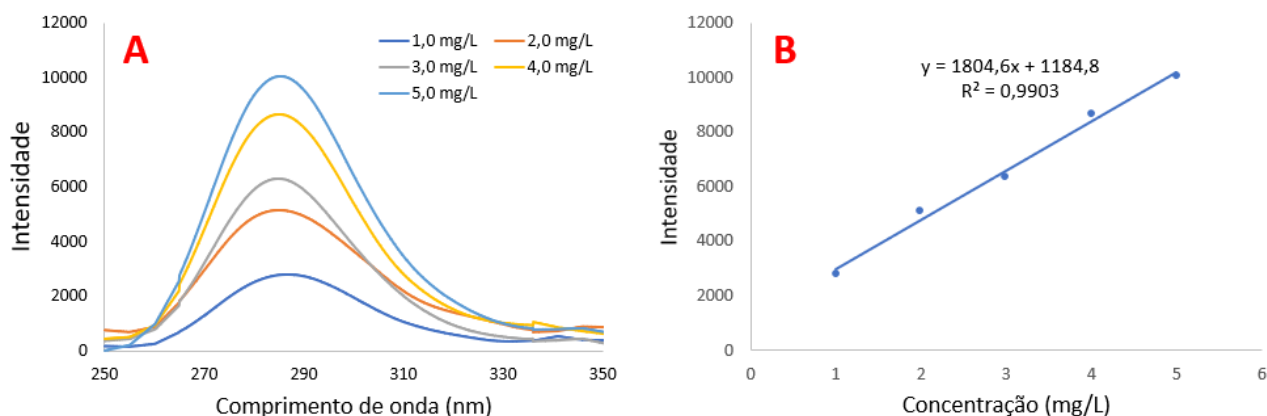


Figura 11. Espectro de emissão (A) e curva de calibração (B) do ASP no fluorímetro.

Analisando o espectro relacionado na Figura 11A é possível inferir que houve boa resposta do aspartame sendo analisado por espectrofluorimetria e que seu pico máximo de emissão está próximo de 285 nm.

Para verificar se o ACS gera alguma interferência na análise, foi realizada a leitura de uma solução de uma amostra de acessulfame em água na concentração aproximada de 2,5 mg/L para a verificação da fluorescência. Analisando a curva é possível observar que há apenas o ruído do equipamento com intensidade em torno de 900. O espectro foi disposto juntamente com o do ASP para facilitar a visualização.

Como, em todas as amostras analisadas neste trabalho, há a mistura do acessulfame e aspartame foi então realizada uma leitura no espectrofluorímetro nas concentrações de 2,5 mg/L e 3,0 mg/L, respectivamente (Figura 12).

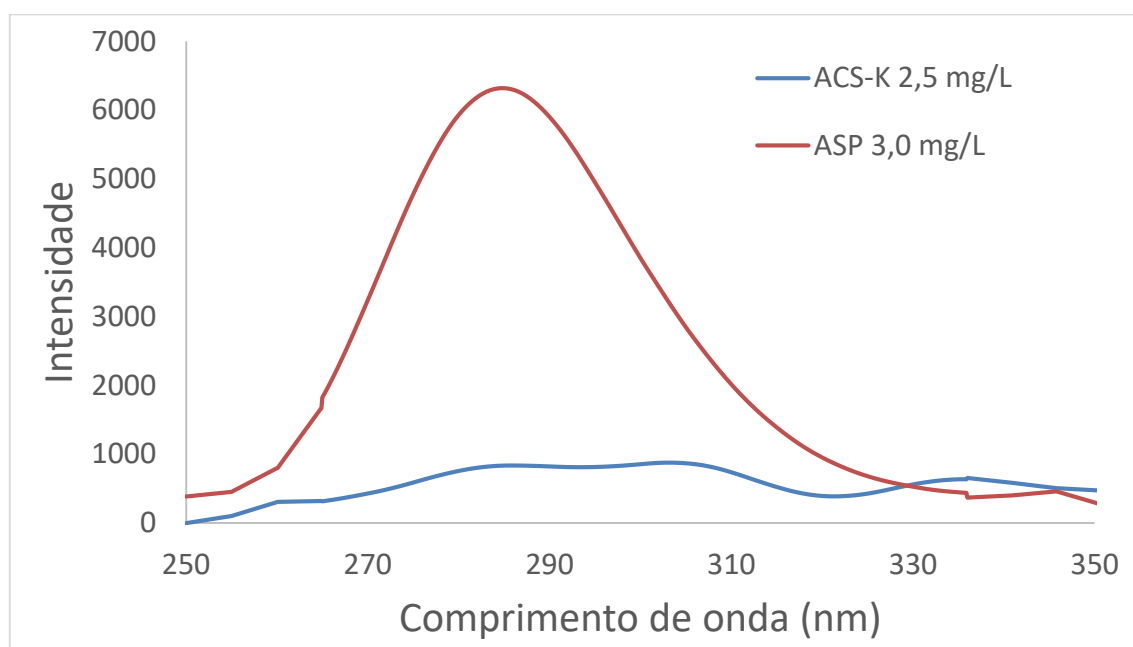


Figura 12. Espectro obtido para o ACS-K e ASP.

Observando a estrutura molecular do aspartame descrita na Figura 12 é possível perceber que a molécula possui elétrons π além de heteroátomos em sua cadeia principal. A presença de heteroátomos faz com que ocorra a transição eletrônica do tipo $n \rightarrow \pi^*$, que possui menos energia quando comparada à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ que acontece na ausência de heteroátomos. Essa mudança na transição gera a diminuição da fluorescência. (Silva, 2016) Dessa forma, a presença do grupo $-NH$ gera a diminuição da fluorescência, o que é um fator que pode explicar a baixa intensidade de fluorescência do aspartame.

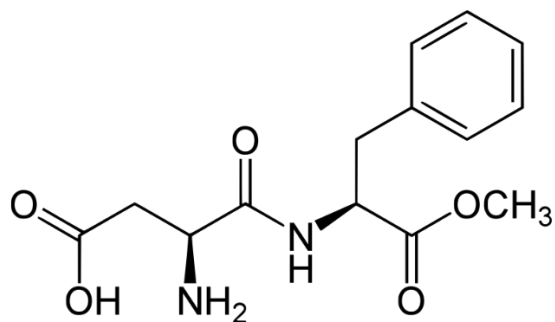


Figura 13. Estrutura molecular do aspartame.

Diferentemente do aspartame, o acessulfame não é capaz de fluorescer pois observando sua molécula na Figura 14, é possível perceber que a sua estrutura é composta por um heterociclo que não possui nenhum outro anel conjugado o que é uma justificativa para que ele não fluoresça.

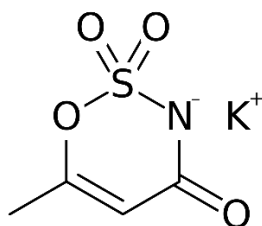


Figura 14. Estrutura molecular do ACS

As amostras diluídas foram analisadas nos comprimentos de onda de 285 nm. As intensidades obtidas foram calculadas na curva de calibração externa e resultaram nos valores da Tabela 4.

Tabela 4. Relação entre os resultados do rótulo e os obtidos para as análises das amostras.

Aspartame		
	Rótulo	Obtido
<hr/>		
Bebida gaseificada		
sabor limão 1	211 mg/L	10, 34 mg/L
Bebida gaseificada		
sabor limão 2	348 mg/L	68, 95 mg/L
Bebida gaseificada		
sabor limão 3	210 mg/L	260, 42 mg/L
<hr/>		

A análise dos valores calculados para as concentrações das amostras pode ser feita pensando que, na fluorescência, pode haver a supressão do sinal que se dá pela absorção de outros componentes no comprimento de onda de emissão do analito que, no caso, está na faixa de 285 nm. Isso é bastante visível observando os valores calculados para a concentração das bebidas gaseificadas 1 e 2, percebendo que os dois ficaram muito abaixo do que era esperado. Dessa forma é possível inferir que outros componentes absorvem nesse comprimento caracterizando efeito de matriz. Apesar da bebida gaseificada 3 ter apresentado boa resposta ao método, ela, assim como as demais amostras, também foi submetida à adição de padrão como uma forma de tentar minimizar o efeito de matriz presente.

6.1.5. Análise das amostras

Assim como realizado no UV-Vis, para a análise das amostras, foi feita a adição de padrão partindo das soluções diluídas e adicionando a solução estoque de aspartame 100 mg/L até as concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg/L.

As amostras foram diluídas até a obtenção de uma concentração estimada de 0,6 mg/L de ASP, de acordo com o rótulo do fabricante (item 4.3.1). As soluções foram lidas no fluorímetro e, analisando os espectros obtidos descritos nas Figuras 15A, B e C, é possível perceber que todas as amostras responderam bem à adição de padrão havendo o aumento da intensidade no comprimento de onda relacionado ao aspartame, porém, a partir de suas curvas analíticas obtidas, descritas na Figura 16A, B e C, as concentrações foram estimadas como de 292,22 mg/L, 497,17 mg/L e 569,84 mg/L para as bebidas

gaseificadas 1, 2 e 3, respectivamente, considerando uma diluição de 352,11 vezes, 350,14 vezes e 580,05 vezes para as bebidas 1, 2 e 3, respectivamente.

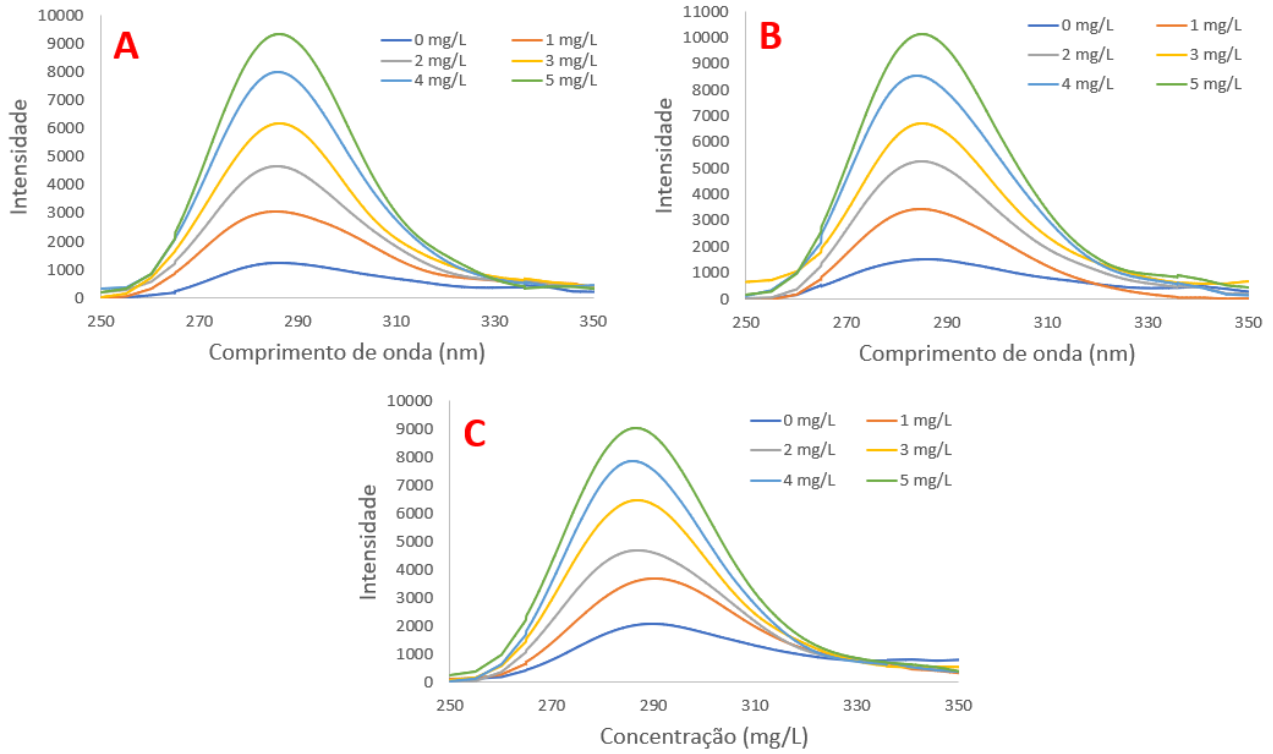


Figura 15. Espectros da curva de adição de padrão de ASP nas bebidas gaseificadas (A) 1, (B) 2 e (C) 3

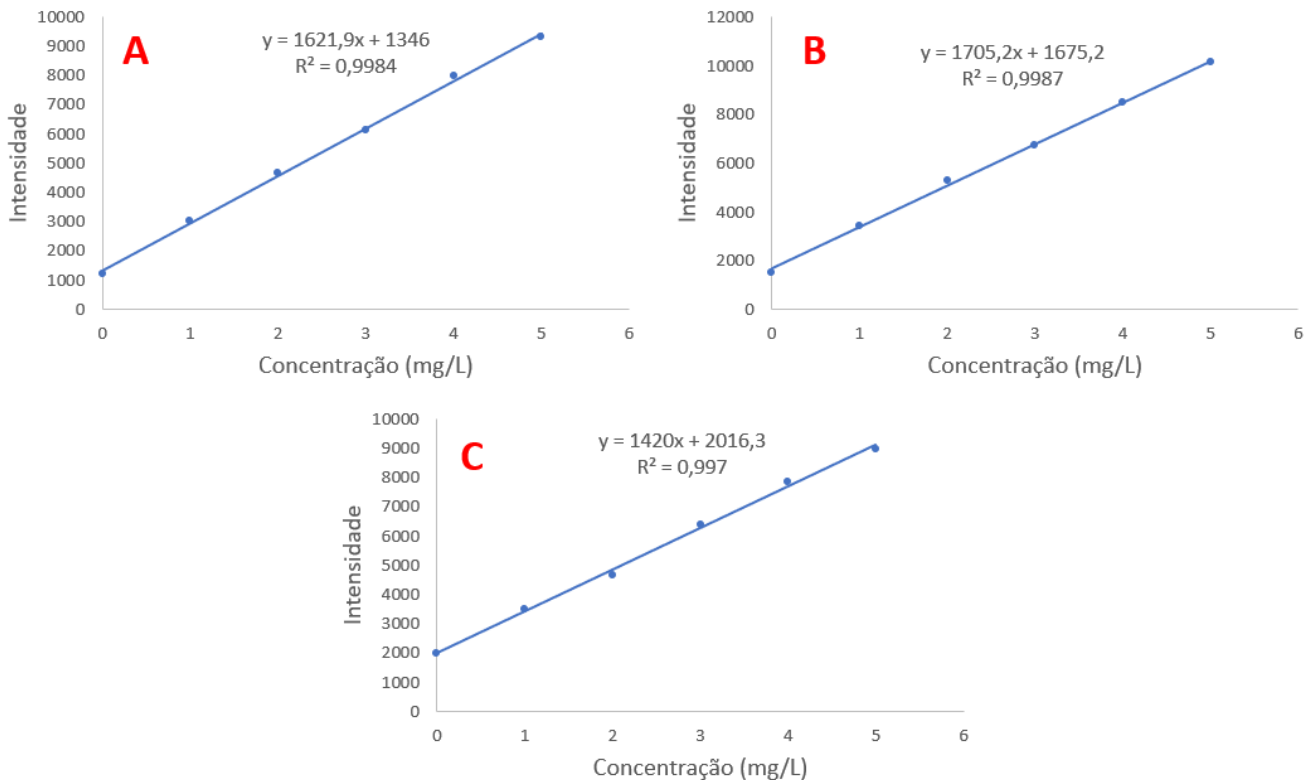


Figura 16. Curva de calibração interna do ASP nas bebidas gaseificadas (A) 1, (B) 2 e (C) 3.

A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que houveram processos de interação molecular que resultaram no aumento da intensidade da fluorescência gerando o aumento da concentração de ASP nas amostras.

6. Conclusão

A determinação dos adoçantes por UV-Vis e fluorescência não se mostrou eficaz na quantificação do ASP e ACS sendo necessário que haja um preparo de amostra ou tratamento de dados para que sejam eliminados os componentes interferentes das amostras.

Pela análise dos espectros e resultados encontrados a partir das curvas analíticas de adição de padrão foi possível perceber que não é possível realizar a análise direta de amostras complexas como refrigerantes e sucos em pó. Para o UV-Vis, existem muitos interferentes que absorvem no mesmo comprimento de onda dos analitos e, para a fluorescência, pode ter ocorrido interações intermoleculares dos interferentes com o ASP, já que é o único composto que provavelmente fluoresce nesses tipos de amostras.

7. Perspectivas futuras

Com base nos resultados obtidos neste trabalho a sugestão para esse tipo de determinação é a realização do preparo das amostras por extração em fase sólida ou derivatização, ou tratamento dos dados por quimiometria já que se trata de uma amostra complexa.

8. Referências bibliográficas

- ANVISA. (2018, July 27). *RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 239, DE 26 DE JULHO DE 2018*. https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34380515/doi-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-239-de-26-de-julho-de-2018-34380387
- Buyukgoz, G. G., Bozkurt, A. G., Akgul, N. B., Tamer, U., & Boyaci, I. H. (2015a). Spectroscopic detection of aspartame in soft drinks by surface-enhanced Raman spectroscopy. *European Food Research and Technology*, 240(3), 567–575. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2357-y>
- Cantarelli, M. A., Pellerano, R. G., Marchevsky, E. J., & Camiña, J. M. (2009a). Simultaneous determination of aspartame and acesulfame-K by molecular absorption spectrophotometry using multivariate calibration and validation by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 115(3), 1128–1132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.101>
- Cesar Santos de Sousa, R., & Beatriz Abreu Gloria, M. (n.d.-a). *DETERMINAÇÃO DE EDULCORANTES EM ALIMENTOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA: UMA REVISÃO* (Vol. 26).
- Cheng, C., & Wu, S. C. (2011a). Simultaneous analysis of aspartame and its hydrolysis products of Coca-Cola Zero by on-line postcolumn derivatization fluorescence detection and ultraviolet detection coupled two-dimensional high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(20), 2976–2983. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.03.033>
- Duarte, L. M., Paschoal, D., Izumi, C. M. S., Dolzan, M. D., Alves, V. R., Micke, G. A., dos Santos, H. F., & de Oliveira, M. A. L. (2017). Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in powder tabletop sweeteners by FT-Raman spectroscopy associated with the multivariate calibration: PLS, iPLS and siPLS models were compared. *Food Research International*, 99, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.006>
- Fernandes, V. N. O., Fernandes, L. B., Vasconcellos, J. P., Jager, A. V., Tonin, F. G., & Leal De Oliveira, M. A. (2013). Simultaneous analysis of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K by CZE under UV detection. *Analytical Methods*, 5(6), 1524–1532. <https://doi.org/10.1039/c3ay26187e>

- Flávia Ferreira de Carvalho Marques. (2009). *Desenvolvimento de métodos analíticos espectroluminescentes e eletroforéticos para determinação de alcaloides (beta-carbolinas, camptotecina e derivados) de interesse farmacológico*. PUC.
- George, V., Arora, S., Wadhwa, B. K., & Singh, A. K. (2010a). Analysis of multiple sweeteners and their degradation products in lassi by HPLC and HPTLC plates. *Journal of Food Science and Technology*, 47(4), 408–413. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0067-4>
- Grembecka, M., Baran, P., Błażewicz, A., Fijałek, Z., & Szefer, P. (2014). Simultaneous determination of aspartame, acesulfame-K, saccharin, citric acid and sodium benzoate in various food products using HPLC-CAD-UV/DAD. *European Food Research and Technology*, 238(3), 357–365. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2111-x>
- Howard, K. S., Nagy, Z. K., Saha, B., Robertson, A. L., Steele, G., & Martin, D. (2009). A process analytical technology based investigation of the polymorphic transformations during the antisolvent crystallization of sodium benzoate from IPA/Water mixture. *Crystal Growth and Design*, 9(9), 3964–3975. <https://doi.org/10.1021/cg900108e>
- Huff, J., & Ladou, J. (n.d.). *Aspartame Bioassay Findings Portend Human Cancer Hazards*. <http://presidiotex.com/nutrapoison/stuff>.
- John Wiley & Sons, I. (n.d.-a). *Sorbato de Potássio*. Retrieved September 27, 2022, from <https://spectrabase.com/spectrum/KgCINGdkrAU>
- John Wiley & Sons, I. (n.d.-b). *Vitamina B3*. Retrieved September 27, 2022, from <https://spectrabase.com/spectrum/GHMJC11PBOh>
- John Wiley & Sons, I. (n.d.-c). *Vitamina B6*. Retrieved September 27, 2022, from <https://spectrabase.com/spectrum/EoohsgBZQ0j>
- Jonas, A. (2018). *O AUMENTO DA OBESIDADE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES E SEUS PRINCIPAIS FATORES DETERMINANTES 2018*.
- Karstadt, M. (2010). Inadequate Toxicity Tests of Food Additive Acesulfame. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 16(1), 89–96. <https://doi.org/10.1179/107735210800546092>
- Khurana, H. K., Cho, I. K., Shim, J. Y., Li, Q. X., & Jun, S. (2008). Application of

- multibounce attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics for determination of aspartame in soft drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 778–783. <https://doi.org/10.1021/jf0724116>
- Kitzinger, H. B., & Karle, B. (2013). The epidemiology of obesity. *European Surgery - Acta Chirurgica Austriaca*, 45(2), 80–82. <https://doi.org/10.1007/s10353-013-0196-x>
- Krishnaswamy, S., Ragupathi, V., Raman, S., Panigrahi, P., & Nagarajan, G. S. (2019). Study of optical and electrical property of NaI-doped PPy thin film with excellent photocatalytic property at visible light. *Polymer Bulletin*, 76(10), 5213–5231. <https://doi.org/10.1007/s00289-018-2650-1>
- Landrigan, P. J., & Straif, K. (2021a). Aspartame and cancer – new evidence for causation. In *Environmental Health: A Global Access Science Source* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12940-021-00725-y>
- Lim, H. S., Park, S. K., Kwak, I. S., Kim, H. il, Sung, J. H., Jang, S. J., Byun, M. Y., & Kim, S. H. (2013). HPLC-MS/MS analysis of 9 artificial sweeteners in imported foods. *Food Science and Biotechnology*, 22(SUPPL. 1), 233–240. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0072-2>
- Lindseth, G. N., Coolahan, S. E., Petros, T. v., & Lindseth, P. D. (2014a). Neurobehavioral effects of aspartame consumption. *Research in Nursing and Health*, 37(3), 185–193. <https://doi.org/10.1002/nur.21595>
- Liu, T., Jiang, Z. T., Li, R., & Tan, J. (2014). Simultaneous Determination of Cyclamate, Acesulfame, and Aspartame in Beverages by Titania-Based RP-HPLC. *Food Analytical Methods*, 7(7), 1400–1406. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9762-x>
- Llamas, N. E., di Nezio, M. S., Palomeque, M. E., & Fernández Band, B. S. (2008). Direct Determination of Saccharin and Acesulfame-K in Sweeteners and Fruit Juices Powders. *Food Analytical Methods*, 1(1), 43–48. <https://doi.org/10.1007/s12161-007-9006-z>
- MAPA. (2013). *Instrução de trabalho: Quantificação de Edulcorantes (sacarina, ciclamato, aspartame e acessulfame de K) em Bebidas por CLAE*.
- Martins, F. C. O. L., Sentanin, M. A., & de Souza, D. (2019). Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. In *Food*

Chemistry (Vol. 272, pp. 732–750). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.060>

Muhamad, N., Yusoff, M. M., & Gimbut, J. (2015). Thermal degradation kinetics of nicotinic acid, pantothenic acid and catechin derived from Averrhoa bilimbi fruits. *RSC Advances*, 5(90), 74132–74137. <https://doi.org/10.1039/c5ra11950b>

Organização Pan-Americana da Saúde. (2022, March 4). *Dia Mundial da Obesidade 2022: acelerar ação para acabar com a obesidade*. <https://www.paho.org/pt/noticias/4-3-2022-dia-mundial-da-obesidade-2022-acelerar-acao-para-acabar-com-obesidade>

Pierini, G. D., Llamas, N. E., Fragoso, W. D., Lemos, S. G., di Nezio, M. S., & Centurión, M. E. (2013). Simultaneous determination of acesulfame-K and aspartame using linear sweep voltammetry and multivariate calibration. *Microchemical Journal*, 106, 347–350. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.09.006>

Sardesai, V. M., & Waldshan, T. H. (1991). *Review Natural and synthetic intense sweeteners*.

Silva, I. (2016). *Espectrofluorimetria para a determinação de aspartame como adulterante em adoçantes*. Universidade Federal Fluminense.

Wang, Y. T., Li, B., Xu, X. J., Ren, H. bin, Yin, J. Y., Zhu, H., & Zhang, Y. H. (2020). FTIR spectroscopy coupled with machine learning approaches as a rapid tool for identification and quantification of artificial sweeteners. *Food Chemistry*, 303. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125404>

Wrobel, K., & Wrobel, K. W. (1997). Determination of aspartame and phenylalanine in diet soft drinks by high-performance liquid chromatography with direct spectrofluorimetric detection. In *Journal of Chromatography A* (Vol. 773).

Yang, D. J., & Chen, B. (2009). Simultaneous determination of nonnutritive sweeteners in foods by HPLC/ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(8), 3022–3027. <https://doi.org/10.1021/jf803988u>

Zamzam, N. S., Rahman, M. H. A., & Ghani, M. F. A. (2019). Environmentally evaluated new HPLC/UV method for the simultaneous determination of acesulfame-k, butylated hydroxytoluene, and aspartame and its degradant in chewing gum. *Journal of AOAC International*, 102(6), 1892–1900. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19->

[0037](#)

