

ADOÇANTES ARTIFICIAIS

Orlando Fatibello-Filho*, Iolanda da Cruz Vieira, Sandro Thomaz Gouveia, Silvana Aparecida Calafatti

Grupo de Química Analítica - Departamento de Química - Universidade Federal de São Carlos - Rod. Washington Luiz - km 235 CP 676 - 13560-970 - São Carlos - SP

Antônio José Moraes Guaritá-Santos

Laboratório de Química Analítica Ambiental - Departamento de Química - Universidade de Brasília - Campus Universitário - Asa Norte - CP 04478 - 70910-900 - Brasília - DF

Recebido em 5/4/95; aceito em 16/2/96

ARTIFICIAL SWEETENERS. A review with 210 references on the synthesis, properties, characteristics, metabolism and methods of determination of artificial sweeteners such as acesulfame-K, aspartame, cyclamate and saccharin are discussed.

Keywords: review; sweeteners; acesulfame-K; aspartame; cyclamate; saccharin; dietary products.

INTRODUÇÃO

Com o aumento significativo da população mundial neste século, novas prioridades foram estabelecidas para promover um aumento da quantidade e da qualidade de alimentos disponíveis. Os alimentos industrializados surgiram proporcionando redução de custos e aumento do tempo de conservação. A indústria passou a utilizar diversos compostos capazes de conferir aos alimentos algumas características necessárias, tais como: antioxidantes, aromatizantes, adoçantes entre outros. Esses compostos são conhecidos como aditivos e podem ser de origem natural ou sintética. A utilização e identificação de cada aditivo estão regidas por normas e códigos específicos. Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)¹, aditivos são "substâncias não nutritivas que melhoram a aparência, o sabor, a textura e o tempo de armazenamento dos alimentos". No entanto, em alguns casos, estes podem aumentar a capacidade nutritiva de certos produtos.

O uso de aditivos em alimentos industrializados no Brasil, foi regulamentado pelo decreto nº 55.871/65 (D.O.U. 20/05/65) e atualizado pelo decreto nº 63.526/68 (D.O.U. 04/11/68).

Os aditivos são classificados em onze grupos de acordo com as funções e/ou características conferidas aos alimentos². A tabela 1 apresenta estes aditivos, bem como uma breve descrição de suas funções. Dentre os aditivos mostrados nessa tabela, os edulcorantes (adoçantes) destacam-se por conferirem sabor doce aos produtos alimentícios. Estes, podem ser naturais ou artificiais e, dentre as propostas de classificação descritas na literatura, a mais aceita é a de Candebat e Roché³, que divide os adoçantes em nutritivos e não nutritivos, como mostrado na figura 1.

Dos adoçantes nutritivos, a sacarose é a mais empregada nas dietas alimentares. Entretanto, seu consumo deve ser restrito ou mesmo eliminado em alguns casos, como por exemplo em pacientes diabéticos por aumentar a taxa de glicose no sangue, e em dietas de pessoas obesas, pela sua conversão em lipídeos, causando assim um aumento de peso nestes consumidores. Devido a isso, a sacarose vem sendo substituída em diversos produtos dietéticos pelos adoçantes não nutritivos naturais e/ou sintéticos, os quais oferecem a mesma sensação doce do açúcar, sem causar privações e/ou diminuição da qualidade de vida destes indivíduos.

Idealmente, um adoçante artificial deve ser incolor e inodoro em solução, estável e solúvel em soluções aquosas, atóxico, barato, não deixar sabor residual e, não ser metabolizado ou produzir metabólitos que não prejudiquem o organismo⁴.

Tabela 1. Classificação dos aditivos empregados em produtos industrializados.

Aditivos	Função
Acidulante	Promove ou intensifica o gosto ácido dos alimentos
Antiespumante	Evita a formação de espuma, através da variação da tensão superficial dos alimentos
Antioxidante	Inibe o processo de oxidação
Antiumectante	Diminui as características higroscópicas dos produtos.
Aromatizante e Flavorizante	Conferem e reforçam o sabor e o aroma dos alimentos
Conservante ou Conservador	Impossibilita ou atrasa a deterioração microorgânica ou enzimática dos alimentos (aumento da durabilidade)
Corante	Confere ou intensifica a cor dos produtos
Edulcorante (Adoçante)	Promove ou transmite sabor doce aos produtos
Espessante	Eleva a viscosidade de soluções, emulsões e suspensões
Estabilizante	Ajuda e conserva as características físicas das emulsões e suspensões
Umectante	Evita perda de umidade dos alimentos

Além do uso em produtos dietéticos (e.g. adoçante de mesa, pudins, gelatinas, geléias, produtos lácteos, sorvetes, conservas de frutas, gomas de mascar, refrigerantes entre outros), os adoçantes artificiais são usados em medicamentos para encobrir ou mascarar as características organolépticas dos fármacos, e em produtos de higiene bucal para diminuir a incidência de cáries nos usuários, pois não são metabolizados pelas bactérias (e.g. *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces viscosus*), geralmente encontradas na boca⁵⁻⁷. Muitos fatores afetam a doçura destes compostos. Diversos métodos têm sido

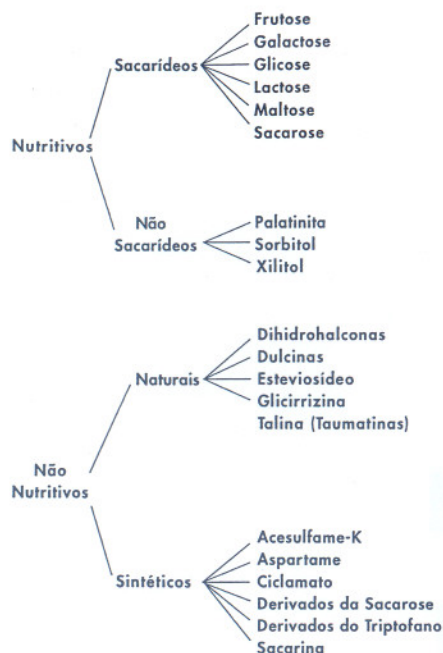


Figura 1. Adoçantes nutritivos e não-nutritivos.

empregados na determinação da doçura relativa^{8,9}. Nestas determinações, soluções de sacarose são usadas como padrão (doçura igual a 1) e a doçura dos demais adoçantes determinadas por testes organolépticos.

Os valores de doçura relativa apresentados na tabela 2 são aproximados, uma vez que dependem tanto das condições do padrão de sacarose usado, como da concentração do adoçante, da temperatura, do pH da solução, do meio iônico e principalmente da sensibilidade de cada provador.

Os edulcorantes ou adoçantes podem pertencer às diversas classes químicas¹⁰. Devido a esta diversidade estrutural, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de conhecer a relação existente entre suas propriedades físico-químicas e o sabor doce apresentado por essas substâncias^{11,12}.

Tabela 2. Doçura relativa de alguns adoçantes.

Edulcorantes	Doçura Relativa (Sacarose = 1)
Lactose	0,4
Maltose	0,5
Sorbitol	0,5 - 0,7
Galactose	0,6
D-Glicose	0,7
D-Xilose	0,7
Glicina	0,7
Manitol	0,7 - 1,4
Glicerol	0,8
Sacarose	1,0
Xilitol	1,0
D-Frutose	1,2 - 1,7
Cloroderivados de Sacarose	5 - 2000
Ciclamato	30 - 40
Glicirizina	50 - 100
Dulcina (p-etoxifeniluréia)	70-350
Acesulfame - K	180 - 200
Aspartame	180 - 200
Stévia	300
Dihidrohalconas	300 - 2000
Sacarina	400 - 500
Talina	2500
5-Nitro-propoxianilina (P-4000)	4000

Dentre as diversas teorias relatadas na literatura, aquela desenvolvida por Shallemberger^{13,14} e complementada por Kier^{15,16} tem ampla repercussão. Esta hipótese fundamenta-se na propriedade biológica estruturalmente específica do edulcorante (Figura 2). Nos edulcorantes, existem grupos funcionais constituídos por átomos eletronegativos (A e B) distanciados entre si de 2,5 a 4 Å. O átomo A está ligado covalentemente a um próton (H^+). A manifestação do sabor doce depende principalmente do "encaixe" destes grupos funcionais (AH-B) ao sítio receptor dos papilos da língua (receptor, A'H-B'). Este "encaixe" corresponde a formação de duas pontes de hidrogênio (Figura 2d). Kier propôs, além destas ligações, a formação de uma terceira ligação, estando relacionada com a região hidrofóbica do edulcorante com o sítio receptor. Esta hipótese poderia explicar o alto poder adoçante de certas substâncias. Roberto-Neto e Ornellas¹⁷ fizeram uma análise teórica do modelo proposto por Shallemberger escolhendo para estudo a classe das 2-alkil-5-nitroanilinas. Este estudo mostrou que o modelo apresentado por Shallemberger não poderia ser aplicado para esta classe funcional. Para essas substâncias o sabor doce pode estar relacionado com propriedades macroscópicas não específicas.

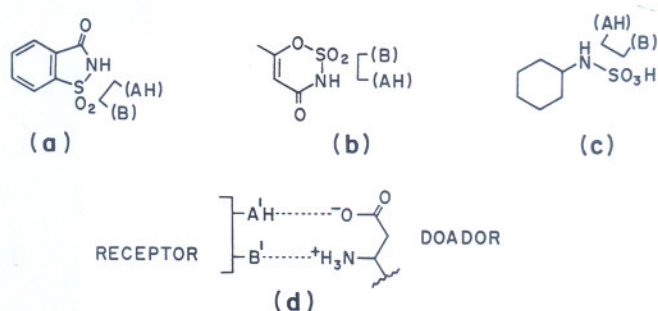


Figura 2. Representação dos grupos funcionais (AH-B) de cada adoçante (a-Sacarina, b-Acesulfame-K e c-Ciclamato) e d-representação esquemática da interação entre o sítio receptor (A'H-B') e o sítio doador (AH-B) do dipeptídeo Aspartame.

No Brasil, são quatro os edulcorantes artificiais não nutritivos encontrados no mercado consumidor: acesulfame-K, aspartame, ciclamato e sacarina fabricados pela Hoechst, Monsanto, Brastanta e Pan Americana, respectivamente. Estes edulcorantes, foram liberados para o consumo no início da década de 80, sendo o mercado atualmente constituído por mais de 50 empresas, com uma estimativa superior a 40 milhões de consumidores¹⁸.

1. ACESULFAME -K

1.1 Síntese, Propriedades e Características

Acesulfame-K ($C_4H_4NO_4KS$) ou sal de potássio do 6-metil-1,2,3-oxatiazina-4(3H)-ona-2,2-dióxido (Figura 3) foi descoberto em 1967 por pesquisadores alemães da Hoechst¹⁹ de Frankfurt. Também foi descoberto que as variações do posicionamento dos substituintes no anel causavam forte influência em

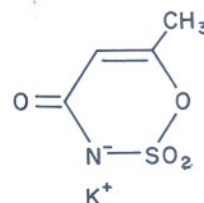


Figura 3. Estrutura do Acesulfame-K.

sua doçura, concluindo-se que o sal de potássio era o mais adequado para aplicações em alimentos.

Acesulfame-K é um pó cristalino branco praticamente inodoro, solúvel em soluções aquosas (270 g/L (20°C) e 1300 g/L (100°C)) e doçura de 180-200 vezes superior a da sacarose (Tabela 2). Devido a sua boa estabilidade a seco (decompõe-se em torno de 225°C) vem sendo empregado em diversos produtos^{19,20} que incluem em seu processamento, etapas de pasteurização, esterilização e/ou aquecimento a temperaturas elevadas. É comercializado pela Hoechst com o nome de Sunett.

Diversos processos de fabricação de acesulfame($C_4H_4NO_4HS$)(I) e acesulfame-K(II) têm sido recentemente patenteados por aquela indústria multinacional²¹⁻²³. Basicamente nestes processos de síntese, o acesulfame(I) é obtido por ciclização do $MeCOCH_2CONHSO_3H$ na presença de SO_3 , seguido pela hidrólise do aduto formado entre o composto (I) e SO_3 . Neutralizando-se o acesulfame(I) produzido nesta etapa com solução de KOH, obtém-se o acesulfame-K(II) com um rendimento de 75%.

1.2 Metabolismo

Os estudos e testes de inocuidade do acesulfame-K em seres humanos, ratos, macacos e coelhos têm sido feitos por diversas agências internacionais e pesquisadores diversos²⁴⁻²⁷. Estes estudos mostraram que acesulfame-K não é metabolizado, não afetando assim as funções normais do organismo humano. Ele é absorvido rapidamente no intestino e sua concentração no sangue cresce rapidamente após a sua ingestão, não sendo acumulado no organismo, uma vez que é excretado. Estudos farmacocinéticos nos animais supracitados e em seres humanos²⁵ mostraram que sua excreção, além de rápida, é total.

Em 1983, a World Health Organization (WHO) reconheceu a inocuidade deste adoçante e recomenda uma ingestão diária aceitável (IDA) de até 9 mg/kg de peso corpóreo. Hoje, tanto a WHO como a FDA aceitam uma ingestão diária de acesulfame-K de até 15 mg/kg de peso corporal.

1.3 Métodos de Determinação

Acesulfame (ou seu sal de potássio (acesulfame-K)) pode ser determinado por volumetria²⁸ com ácido perclórico $1,0 \times 10^{-1}$ M (titulante) em ácido acético anidro, usando-se como indicador diversos corantes dissolvidos em ácido acético anidro-metanol. Neste mesmo trabalho, este adoçante foi titulado em metilisobutilcetona ou benzeno-metanol (3:1 v/v) com metóxido de sódio $1,0 \times 10^{-1}$ M usando azul de o-toluidina como indicador.

Hannisdal e Schroeder²⁹ desenvolveram um método polarográfico para a determinação deste adoçante em refrigerantes. Um eletrólito de suporte contendo iodeto de tetrabutilamônio $4,0 \times 10^{-3}$ M e NaCl $1,0 \times 10^{-1}$ M (pH 1,9) e potencial de -1,4 V foram selecionados para a construção da curva de calibração. Esta curva foi linear no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ M de acesulfame-K com um limite de detecção estimado de $5,0 \times 10^{-5}$ M. Tanto ácido sórbico como alguns corantes artificiais interferiram no método.

Acesulfame-K foi determinado por cromatografia gasosa³⁰ em diversos refrigerantes, sucos de frutas e algumas substâncias dietéticas. Previamente a estas determinações, este adoçante foi dialisado com HCl $1,0 \times 10^{-1}$ M, extraído com acetato de etila e metilado com diazometano em éter.

A maioria dos métodos de determinação de acesulfame-K encontrados na literatura são por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)³¹⁻⁴² usando detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta^{31-33,35-42}, e também no visível³⁴ (par iônico do adoçante com cristal violeta).

Uma adaptação do método polarográfico²⁹ em fluxo usando um eletrodo de filme de mercúrio no lugar do eletrodo gotejante está sendo feito por pesquisadores do nosso grupo.

Investigaram-se também métodos espectrofotométricos na região do visível em "batelada" e em fluxo, baseados na formação de pares iônicos do ânion deste adoçante com diversos indicadores (e.g. verde brilhante, cristal violeta, verde de malaquita, azul de metileno, azul do nilo, rodamina-B, azul de o-toluidina entre outros) em solvente orgânico.

2. ASPARTAME

2.1 Síntese, Propriedades e Características

Aspartame ($C_{14}H_{18}N_2O_5$) ou éster metílico do N-L- α - β -aspartil-L-fenilalanina (Figura 4), foi descoberto acidentalmente nos Estados Unidos em 1965 por J. M. Schlatter^{43,44}, quando este tentava desenvolver um sedativo para úlceras. É um dipeptídeo branco, cristalino, inodoro, de baixa caloria e com uma doçura de 180-200 vezes a da sacarose⁴⁵⁻⁴⁷ (Tabela 2). Possui ponto de fusão de 246-247°C, solúvel em água (10,2 g/L (25°C)) sendo insolúvel em óleos e gorduras. A solubilidade em água a 25°C é mínima em pH 5,2 (ponto isoelétrico) e máxima em pH 2,2.

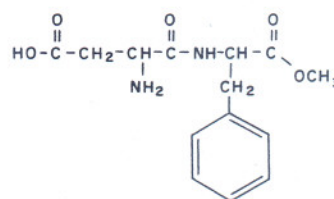


Figura 4. Estrutura do Aspartame.

Introduzido sob o nome comercial de NutraSweet, o aspartame, é atualmente o adoçante artificial de maior comercialização no mundo, sendo sintetizado por métodos químicos, enzimáticos e de tecnologia do DNA recombinado⁴⁸⁻⁵⁰. Entretanto, a síntese química é a mais utilizada industrialmente e por esse motivo será abordada e discutida com maiores detalhes.

O método clássico⁴⁸ consiste na condensação da N-benziloxycarbonil-(β -benzil)ácido L-aspartico com o éster metílico da L-fenilalanina na presença de N,N'-diciclohexilcarbodiimida para formar o éster metílico da N-benziloxycarbonil-(β -benzil)-L-aspartil-L-fenilalanina. Esse composto é reduzido a aspartame pela hidrogenação catalítica usando paládio metálico como catalisador. Entretanto, este método não é adequado para uso industrial porque o reagente de condensação é caro e a esterificação seletiva do grupo β -carbonila não é viável economicamente (Figura 5a).

O método mais empregado industrialmente⁴⁸ é o da reação de acoplamento do ácido L-aspartico anidro com éster metílico da L-fenilalanina, formando uma mistura de α e β isômeros (ocorrendo frequentemente uma predominância do α -isômero) (Figura 5b).

A NutraSweet, líder mundial na área de aspartame, tem como representante no Brasil, desde 1985, a Monsanto situada em São José dos Campos-SP.

A estabilidade do aspartame foi bastante estudada⁵¹⁻⁵⁵ e sob certas condições de umidade, temperatura e pH, o aspartame pode ser hidrolisado formando aspartilfenilalanina ou dicetopiperazina com eliminação de metanol. Um esquema das reações de conversão de aspartame nestes compostos acima mencionados é mostrado na figura 6. Observa-se uma queda acentuada de sua estabilidade no intervalo de pH 6-8 e em temperaturas elevadas (70-80°C). Assim, a estabilidade deste edulcorante diminui com o aumento do pH e da temperatura, não sendo portanto recomendado seu uso em produtos alimentícios que possuam pH alcalino, e nos que necessitam de aquecimento acima de 100°C durante muito tempo, tais como bolos, pães, biscoitos e bolachas.

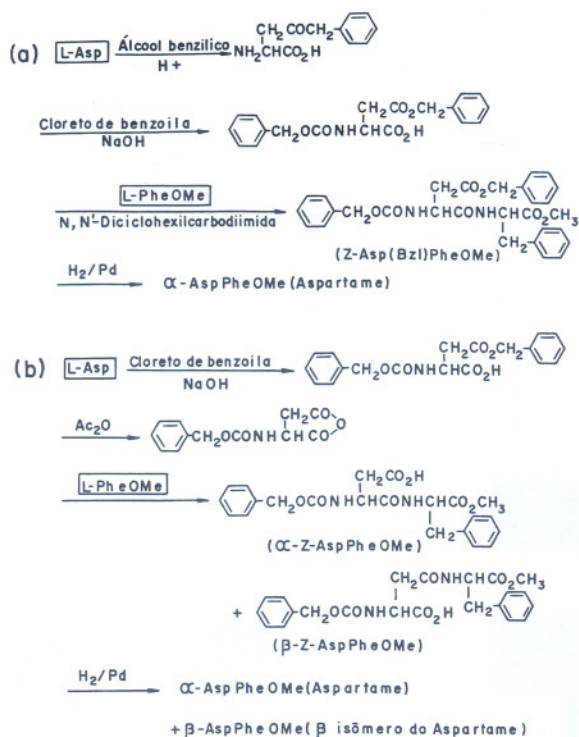


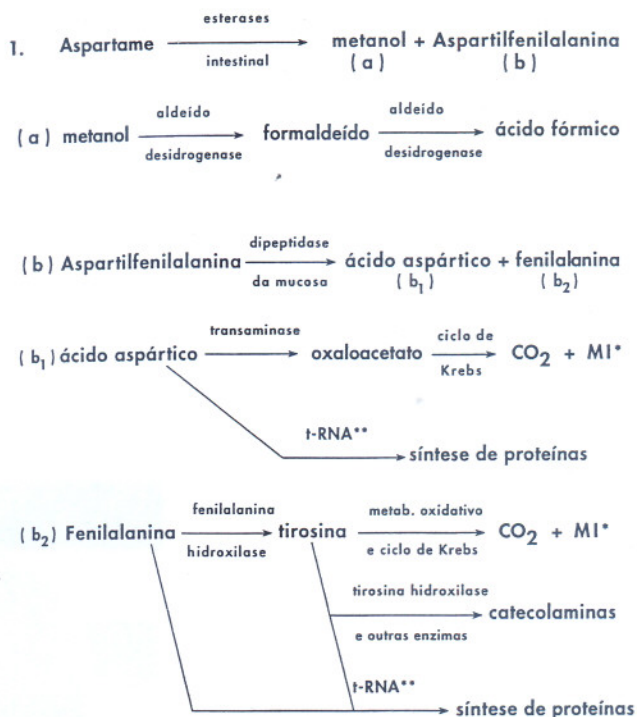
Figura 5. Síntese do Aspartame usando: (a)- N-benziloxycarbonil-(β -benzil)-ácido L-aspartico; (b)- N-benziloxycarbonil-ácido L-aspartico anidro. L-Asp: ácido aspártico; L-PheOMe: aspartame.

O aspartame na forma sólida possui boa estabilidade, sendo estável durante um ano em temperaturas menores ou igual a 40°C. Em solução aquosa é estável no intervalo de pH de 3 a 5, tendo a melhor estabilidade em temperaturas de 20-25°C e pH igual a 4,3. Em pH 4, a 20°C, perde 20% de sua doçura em um período de quatro a cinco meses.

2.2 Metabolismo

O metabolismo do aspartame é motivo de discussão e foi bastante estudado em seres humanos, macacos, ratos e coelhos⁵⁶⁻⁶⁵.

Ranney et al⁵⁶ realizaram estudos em seres humanos por via oral, utilizando o aspartame, marcado com ¹⁴C. Neste estudo, comprovou-se que a *esterase intestinal*, hidrolisa o estér metílico, produzindo metanol e o dipeptídeo aspartilfenilalanina. Em seguida, aspartilfenilalanina é hidrolisada pela *dipeptidase* da mucosa em ácido aspártico e fenilalanina, como é mostrado na figura 7.



* MI - Metabólitos Intermediários

** t-RNA - RNA transportador

Figura 7. Metabolismo do Aspartame.

O risco de sua ingestão estaria na toxicidade dos produtos de seu metabolismo: fenilalanina, metanol e ácido aspártico. Como um dos seus metabólitos é a fenilalanina, seu uso não é recomendado para pessoas portadoras de fenilcetonúria, indivíduos com carência de *fenilalanina hidroxilase*, enzima responsável pela transformação deste aminoácido em tirosina. Assim, doses elevadas de fenilalanina no organismo podem levar a mudanças de comportamento como depressão, insônia, cefaléias, alteração da visão e até mesmo retardamento mental, especialmente em crianças.

Stegink⁶⁰ estudou o efeito da ingestão de aspartame por pessoas adultas normais nas concentrações de 34, 50, 100, 150 e 200 mg/kg de peso corpóreo. O acompanhamento das concentrações de fenilalanina no plasma sanguíneo, mostrou que estas não ultrapassaram os níveis de concentração encontrados quando ingeridas por alimentação normal, sendo que as concentrações máximas de fenilalanina encontradas, após 45-60

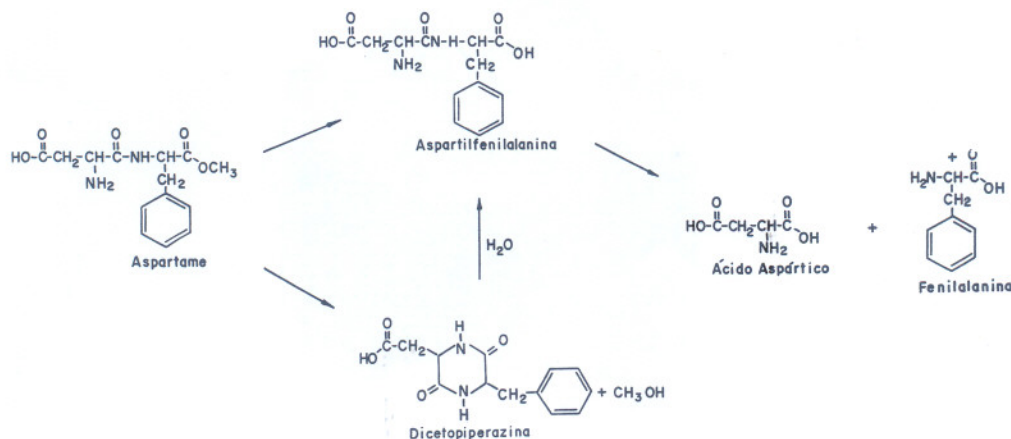


Figura 6. Produtos de conversão do Aspartame.

min de ingestão de aspartame foram de 2,0; 3,0; 3,5; 5,8 e 8,5 mg/dL, respectivamente. Estes níveis de fenilalanina no plasma retornam aos níveis normais (0,8 - 1,0 mg/dL) após 4 horas da ingestão. Por outro lado, a concentração de aspartato manteve-se muito próxima dos níveis normais, indicando assim seu rápido metabolismo. Finalmente, uma produção elevada de metanol e/ou formiato pode causar acidoses e até mesmo cegueira. No entanto, se o consumidor ingerir quantidades inferiores a ingestão diária aceitável (IDA) de 34 mg de aspartame por quilograma de peso corporal, este adoçante não é tóxico, uma vez que produzirá concentrações de metanol e/ou formiato menores que 0,4 mg/dL no soro sanguíneo, concentração considerada não prejudicial ao organismo⁵⁸.

2.3 Métodos de Determinação

Renneberg et alii⁶⁶ desenvolveram um biossensor amperométrico para este adoçante imobilizando células de *Bacillus subtilis* sob uma membrana de um eletrodo de oxigênio. Este eletrodo apresentou boa estabilidade e sensibilidade, com trocas de correntes lineares no intervalo de concentração de aspartame entre 7×10^{-5} - 6×10^{-4} M. No entanto, glicose, L-fenilalanina e L-aspartato causaram interferências significativas, comprometendo assim a seletividade do método.

No método desenvolvido por Mulchandani et alii⁶⁷ a reação foi monitorada pelo consumo de oxigênio durante a oxidação enzimática por *glutamato oxidase*. O procedimento foi aplicado para a determinação de aspartame em vários produtos dietéticos até a concentração de 2×10^{-5} M.

Villarta et alii⁶⁸ desenvolveram um biossensor amperométrico para este adoçante, imobilizando *aspartame-hidrolase* (50 U), *aspartato-aminotransferase* (10 U) e *glutamato-oxidase* (1U) sobre um eletrodo de Pt polarizado à +650mV vs eletrodo Ag/AgCl.

Guilbault et alii⁶⁹ desenvolveram um eletrodo enzimático para aspartame utilizando *L-aspartase* imobilizada diretamente na membrana de um eletrodo de amônia. A resposta foi linear na faixa de concentração de 1×10^{-3} a 1×10^{-2} M com uma inclinação de -30 mV/década e um tempo de vida de apenas 8 dias. Em continuidade a este trabalho, um novo eletrodo bienzimático⁷⁰ foi construído pela co-imobilização da *carboxipeptidase A* e *L-aspartase* com glutaraldeído e soro de albumina bovino, diretamente na membrana de teflon de um eletrodo sensível a amônia. A resposta do eletrodo foi linear no intervalo de concentração de $4,2 \times 10^{-4}$ a $8,1 \times 10^{-3}$ M com uma inclinação de -45 mV/década. Este biossensor foi estável por mais de 25 dias e empregado na determinação de aspartame em diversos produtos dietéticos comercializados no mercado americano.

Outro método potenciométrico⁷¹ para a determinação de aminoácidos, dopamina e aspartame baseado na detecção de suas reações com o 2,4-dinitrofluorbenzeno usando um eletrodo seletivo a fluoreto foi desenvolvido. A curva analítica foi linear na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ M, e o método segundo os autores é simples, prático e rápido.

Atmaca et alii⁷² propuseram um procedimento fluorimétrico para a determinação de aspartame. O edulcorante foi excitado em 436 nm e sua fluorescência foi medida em 523 nm. No entanto, o método se mostrou demorado (30 min por determinação) e trabalhoso, exigindo aquecimento das amostras à 70°C, antes das determinações quantitativas. A recuperação média do aspartame adicionado para seis determinações foi de 98,95 %, com um desvio padrão relativo de 1,02%.

A determinação quantitativa do aspartame pode ser feita também pelo método volumétrico. Prasad et alii⁷³ desenvolveram uma técnica alternativa para determinação desse edulcorante usando como titulante a N-bromosuccinimida (NBS), ácido perclórico e metóxido de sódio. Foram utilizados vários indicadores como azul sudan GN, azul de o-toluidina, violeta catecol e vermelho de bromo-pirgalol (BPR). O método

foi comparado com o espectrofotométrico e, apesar de trabalhoso, mostrou-se sensível para aplicação em análises de rotina.

Tyler⁷⁴ determinou aspartame em refrigerantes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa, onde a amostra foi diluída em água e injetada em uma coluna μ Bondapak C₁₈ da Waters Associates. A fase móvel utilizada foi acetonitrila 15% v/v em tampão de fosfato de trietilamônio (pH 4,3). O tempo de eluição foi de 10 min e a absorbância foi medida em comprimento de onda igual a 214 nm. Aspartame em diversos refrigerantes foi determinado por CLAE de fase reversa⁷⁵. Tsang et alii⁷⁶ utilizaram este método analítico para a determinação da degradação de aspartame em refrigerantes estocados a $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Este edulcorante foi também determinado por CLAE em outras amostras com detecção no ultravioleta⁷⁷⁻⁸⁸, e por fluorimetria⁸⁹.

Há poucos métodos espectrofotométricos na região do visível para a determinação de aspartame relatados na literatura. Lau et alii⁹⁰ determinaram aspartame em diversos produtos dietéticos num intervalo de concentração de $2,5 \times 10^{-5}$ - $1,2 \times 10^{-4}$ M. Após sua extração com carbonato de propileno, o aspartame foi colocado para reagir com ninidrina durante 20 min a 100°C, e a absorbância da espécie formada foi medida em 585 nm. Nesse comprimento de onda, tanto os corantes como os aminoácidos presentes nestas amostras não causaram nenhuma interferência no método. No entanto, o aspartame é pouco solúvel nesse solvente e o tempo requerido para a análise de uma amostra é demasiadamente longo. Outros pesquisadores⁹¹⁻⁹³ determinaram aspartame em refrigerantes utilizando um analisador de aminoácidos, onde os aminoácidos livres não interferem. Tuncel & Araman⁹⁴ também usaram ninidrina como reagente colorimétrico para aspartame nos estudos de sua estabilidade em muitos produtos dietéticos comercializados no mercado turco.

Além dos métodos espectrofotométricos usando ninidrina, existem outros usando 4-dimetilaminobenzaldeído⁹⁵ ($\lambda = 407$ nm), dietilditiocarbamato de sódio^{96,97} ($\lambda = 436$ nm) e p-benzoquinona⁹⁸ ($\lambda = 480$ nm). Enquanto nos dois primeiros leucina e alguns corantes sintéticos causam fortes interferências, aquele usando p-benzoquinona é afetado pela presença de corantes orgânicos (amaranto, tartrazina, amarelo crepúsculo, bordeaux-s e indigotina).

Hamano et alii⁹⁹ desenvolveram um método espectrofotométrico sensível para a determinação de aspartame em refrigerantes. O método envolve a conversão enzimática do aspartame em formaldeído pelas enzimas α -quimotripsina e álcool oxidase, seguido da formação de um cromóforo com 4-aminopenta-3-en-2-ona (Fluoral-P). A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de $6,8 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ M de aspartame. Outro método enzimático foi desenvolvido por Dinçkaya et alii¹⁰⁰.

O Grupo de Química Analítica do DQ da UFSCar, vem desenvolvendo métodos alternativos de determinação deste edulcorante. Alguns métodos espectrofotométricos, potenciométricos e amperométricos usando eletrodo íon seletivo de membrana líquida estão sendo investigados.

Desenvolveu-se um método espectrofotométrico usando a ninidrina como reagente colorimétrico. Inicialmente, o efeito de diversos solventes orgânicos (puros e em mistura), concentração de ninidrina, concentração de KOH, temperatura, tempo de reação e substâncias concomitantes, normalmente presentes nos produtos dietéticos, sobre a reação colorimétrica de aspartame com ninidrina foi investigado¹⁰¹⁻¹⁰³.

Similarmente à reação da ninidrina com aminoácidos, em uma primeira etapa, este reagente promove a oxidação descarboxilativa do aspartame com formação de hidridantina, aldeído, dióxido de carbono e amônia. A amônia e a hidridantina formados reagem com uma segunda molécula de ninidrina produzindo um composto azul (composto de Ruhemann). Este azocomposto apresenta duas absorbâncias máximas nos comprimentos de onda de 400 e 603 nm. Apesar de apresentar

maior sensibilidade em 400 nm, a maioria dos corantes encontrados nos produtos dietéticos como amarelo crepúsculo, tartrazina, amaranço, eritrosina, vermelho 40 e ponceau 4R, absorvem nesta região espectral. Assim, o comprimento de onda 603 nm foi usado. O melhor meio reacional encontrado neste trabalho foi metanol/isopropanol 1:1 v/v e KOH $3,0 \times 10^{-2}$ M, sendo que este mostrou-se prático e mais sensível que o proposto por Lau e colaboradores⁹⁰.

Este método foi adaptado em análise por injeção em fluxo^{104,105} e o aspartame determinado em adoçante de mesa, gelatina, pudim e pó para refresco dietéticos em um intervalo de concentração deste edulcorante de $3,4 \times 10^{-4}$ a $2,4 \times 10^{-3}$ M, velocidade analítica de 36 resultados/h e um desvio padrão relativo menor que 3,5% ($n = 6$) para todas as amostras. O efeito catalítico do hidróxido de potássio sobre a reação de ninidrina com este adoçante está sendo estudado¹⁰⁶, objetivando entender melhor a cinética de reação na mistura de solventes como também, explorar outro possível método analítico.

3. CICLAMATO

3.1 Síntese, Propriedades e Características

O ciclamato ou ácido ciclohexenossulfâmico ($C_6H_{11}NO_3S$) (Figura 8) foi descoberto por Sveda¹⁰⁷ em 1937, quando este pesquisador investigava a síntese de sulfamatos em seu trabalho de doutoramento. Inicialmente foi sintetizado sob a forma ácida e de sais de amônio, prata, bário, sódio e cálcio. O seu poder adoçante foi descoberto acidentalmente, e apenas em 1949 iniciou-se a comercialização do ácido e dos seus sais de sódio e de cálcio.

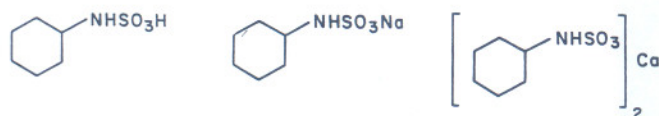


Figura 8. Estrutura do Ácido Ciclâmico e seus Sais de Sódio e Cálcio.

A síntese do ácido ciclâmico¹⁰⁷ é realizada em duas etapas distintas (Figura 9). Na primeira etapa há a formação do ciclohexilssulfamato de bário pela adição de sais de amina à solução de hidróxido de bário. Logo após a adição, o excesso de ciclohexilamina é evaporado à pressão reduzida (Equação 1). O rendimento desta etapa é de 57%.

A segunda etapa consiste na formação do ácido ciclohexilssulfâmico através da adição de ácido sulfúrico à solução contendo ciclohexilssulfamato de bário. Esta adição é feita a frio para que o ácido livre possa ser hidrolisado. O sulfato de bário formado é removido por etapas sucessivas de filtração e lavagem, fornecendo os cristais de ácido ciclâmico (Equação 2).

Seu poder adoçante é de 30 a 40 vezes superior ao da sacarose (Tabela 2), e comumente é empregado com a sacarina, uma vez que este mascara o sabor residual amargo deixado por este edulcorante (sacarina). Devido a sua alta estabilidade térmica pode ser empregado no processamento industrial de diversos

alimentos. O ácido ciclâmico e seus sais ocorrem como um pó cristalino branco¹⁰⁸.

3.2 Metabolismo

No final da década de 60, iniciaram-se alguns estudos^{109,110} sobre o metabolismo e a toxicidade do ciclamato em seres humanos e em alguns animais. Desde então, diversas investigações foram realizadas a fim de se comprovar a carcinogenicidade desse adoçante.

O mecanismo metabólico do ciclamato é mostrado na figura 10. O organismo humano tem demonstrado tendência diferenciada ao metabolizar ciclamato. Aproximadamente de 8 a 10% da população consumidora deste adoçante pode converter 1% de ciclamato em ciclohexilamina, uma vez que esta conversão depende da flora intestinal existente e das características fisiológicas de cada indivíduo.

O metabolismo da ciclohexilamina também é objeto de estudos e diversas rotas metabólicas desta substância foram identificadas. Os estudos toxicológicos¹¹¹ foram realizados em diferentes espécies de animais e seres humanos com ingestões orais e subcutâneas de soluções de ciclamato. Os resultados obtidos demonstraram dados discrepantes sobre a ação carcinogênica do ciclamato, gerando controvérsia. Outros estudos^{111,112} apresentaram indícios de que este adoçante não é carcinogênico. A ingestão diária aceitável (IDA) de ciclamato é de 0,1-11 mg/kg de peso corporal.

3.3 Métodos de Determinação

O ciclamato devido a sua ampla utilização e pelas controvérsias existentes quanto ao seu processo metabólico e sua toxicidade, requer métodos quantitativos eficientes para a determinação de seu teor em produtos comerciais. Richardson¹¹³ e Barnes¹¹⁴ publicaram dois artigos de revisão, onde são abordados diferentes metodologias e várias técnicas analíticas para a determinação deste adoçante.

Os métodos gravimétricos são os mais antigos e consistem basicamente na determinação de sulfato na forma de sulfato de bário. O ânion sulfato é gerado pela reação do ciclamato com nitrito de sódio em meio ácido, sendo precipitado com excesso de cloreto de bário. O teor deste adoçante em sucos de frutas¹¹⁵, adoçantes dietéticos¹¹⁵ e vinhos¹¹⁶ foi determinado gravimetricamente. A AOAC¹¹⁷ e o Instituto Adolfo Lutz¹¹⁸ recomendam esse método gravimétrico. No entanto este procedimento demanda longo tempo de análise.

O ciclamato pode ser determinado através da titulação com o nitrito utilizando-se iodometria¹¹⁹ para dosar o excesso de titulante na presença de amido como indicador. Vercillo e Manzone¹²⁰ trataram os sais de ácido ciclâmico com excesso de ácido nítrico e o sulfato (de sódio ou cálcio) liberado foi titulado com solução padrão de cloreto de bário, utilizando-se a hidroxiquinona como indicador.

Kurayuki et al¹²¹ propuseram um método indireto onde o íon sulfato, produzido na reação do ciclamato com nitrito em meio ácido foi precipitado com chumbo e o excesso desse

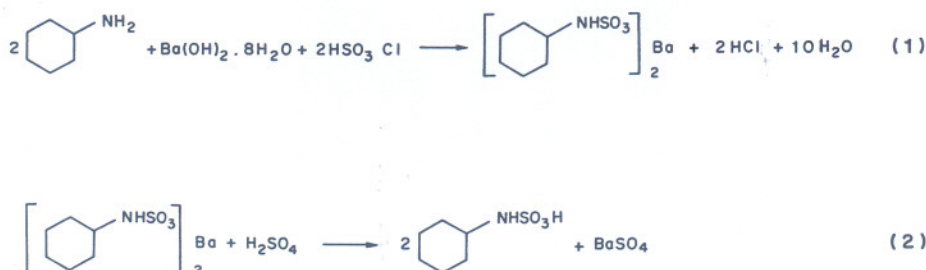


Figura 9. Síntese do Ciclamato.

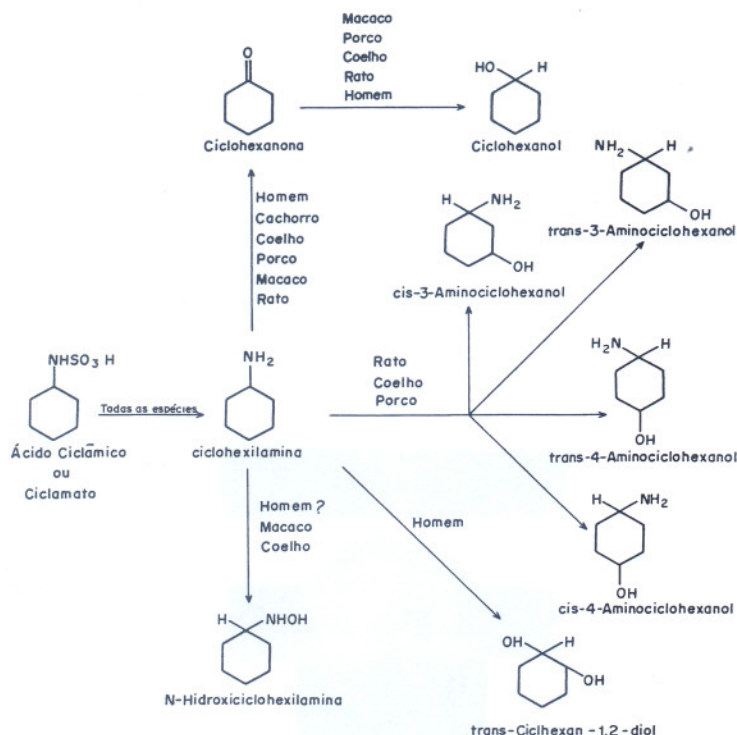


Figura 10. Metabolismo do Ciclamato.

cátion foi monitorado polarograficamente. Esse método requer etapas de filtração e de lavagem de precipitado, acarretando assim um aumento no tempo de análise.

Daming e Chenazhi¹²² desenvolveram um eletrodo de membrana líquida seletivo a ciclamato utilizando pares iônicos de sais de amônio quaternário e ânion do ciclamato imobilizados em PVC. O par iônico formado pelo triotildodecilamônio apresentou melhores resultados com uma linearidade de $8,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ M e coeficiente angular de 58 mV/década.

O teor de ciclamato foi determinado em sucos de frutas e em xaropes utilizando-se nitrito de sódio como titulante. O nitrito foi monitorado amperometricamente¹²³. O método possui uma faixa de recuperação de 98,3 a 102,2% com coeficiente de variação inferior a 4,5%.

Os métodos cromatográficos são amplamente empregados na determinação de ciclamato, podendo ser qualitativos como a cromatografia de papel, camada delgada e troca iônica ou ainda quantitativos como a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência.

A cromatografia de papel e de camada delgada apresentam diferentes metodologias quanto a composição da fase móvel e reagentes reveladores^{124,125} para a separação e identificação do ciclamato em amostras compostas e são geralmente utilizados para uma avaliação preliminar de produtos suspeitos de adulteração. A cromatografia de troca iônica foi utilizada apenas como técnica preparativa na separação do ciclamato e outros constituintes¹²⁶.

O ciclamato pode ser determinado indiretamente por cromatografia gasosa pela detecção de ciclohexeno e/ou ciclohexilamina¹²⁷, que se formam devido a reação do ciclamato com o ácido nítrico. Este método possui uma faixa de recuperação de 98 a 100% para uma solução contendo $5,6 \times 10^{-6}$ M. Essa técnica pode ser utilizada para a avaliação de possíveis rotas metabólicas¹²⁸ através da avaliação dos excrementos de animais após ingestão deste adoçante.

A escolha do detector para a CLAE na determinação de ciclamato pode ser decisiva para a eficiência do método. O emprego de detectores ultravioleta pode comprometer a sensibilidade do método pois o ciclamato possui baixa absorvidade molar nessa região espectral. Utilizam-se, no entanto, processos

derivativos que possam gerar compostos que absorvam nesses comprimentos de onda¹²⁹. Esse processo derivativo possibilita a detecção em 485 nm por absorção molecular e emissão por fluorescência em 530 nm, com limite de detecção de 0,4 a 5 mg/kg e faixa de recuperação de 88 a 104%.

Para amostras complexas empregam-se colunas de troca iônica¹³⁰ antes do detector de UV. Assim, os demais constituintes da amostra são detectados no UV e o ciclamato por fluorescência ou absorção molecular no visível; esse método possui limite de detecção de $1,1 \times 10^{-5}$ M¹³¹. Em amostras complexas pode-se também utilizar a detecção por fotometria indireta¹³² que consiste na utilização de um eluente capaz de gerar um sinal elevado de absorbância. A eluição de um íon de baixa absorvidade (ciclamato) gera um decréscimo desse sinal, o qual será proporcional a concentração desse íon. Esse método possui uma linearidade de $1,1 \times 10^{-6}$ - $2,8 \times 10^{-6}$ M com um fator de recuperação médio de 91% e desvio padrão relativo de 4%.

Entre as modalidades de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a cromatografia iônica de alta eficiência¹³³ apresenta-se como alternativa às metodologias citadas pois não utiliza solventes orgânicos e emprega detectores eletroquímicos, como amperométrico ou condutométrico. Esse método possui uma linearidade de $1,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-6}$ M e desvio padrão relativo de 0,5%.

No infravermelho (IV) o ciclamato foi determinado¹³⁴ diretamente em 800 cm^{-1} . No entanto, essa metodologia apresentou erros iguais ou superiores a 10%, necessitando de correções algébricas para a determinação deste adoçante em amostras complexas. Outra possibilidade é a determinação indireta através do ciclohexeno em 1650 cm^{-1} proveniente da transformação do ácido ciclâmico pelo método de Rees¹³⁵, com limite de detecção de 10 mg.

O ciclamato foi determinado em bebidas¹³⁶ e em alimentos sólidos¹³⁷ espectrofotometricamente no ultravioleta (UV). Através da reação deste adoçante com hipoclorito ocorreu a conversão do ciclamato em N,N-diclorociclohexilamina e esse composto foi monitorado em 314 nm com valores médios de recuperação de 102% para doze tipos de bebidas. Um estudo interlaboratorial¹³⁸ revelou que o método possui um desvio

padrão relativo de 4,7 - 6,5% para refrigerantes e 6,9 - 8,5% para sobremesas, sendo comparável ao método proposto pela AOAC¹¹⁷.

A determinação deste adoçante pode ser realizada indiretamente pela absorção da ciclohexilamina na região do visível, produzida na hidrólise ácida deste edulcorante. A ciclohexilamina pode ser extraída com solventes orgânicos na presença de cátions orgânicos, formando complexos ou pares iônicos coloridos. A tabela 3 mostra alguns métodos espectrofotométricos descritos na literatura empregando esse procedimento.

Tabela 3. Métodos espectrofotométricos para determinação de ciclamato.

Reagente	Limite de Detecção (M)	λ (nm)	Extrator	Ref.
quinidrona	-	355	água	139
azul do nilo	$1,1 \times 10^{-5}$	632	metilisobutilcetona	140
1,10-fenantrolina	$7,8 \times 10^{-5}$	516	nitrobenzeno	141
p-quinona	$8,4 \times 10^{-5}$	493	clorofórmio	142
piridina	-	340	água	143

Johnson e Shenton^{144,145} propuseram dois procedimentos em fluxo contínuo segmentado para a determinação de ciclamato, baseado na reação do excesso de nitrito com safranina¹⁴⁴ e reagente de Bratton-Marshall¹⁴⁵. Estes métodos apresentaram limite de detecção de $5,6 \times 10^{-3}$ M e faixa de recuperação de 103 a 109% e 99 a 103%, respectivamente. Os diagramas de fluxo projetados são complexos e empregam extração por solventes, o que acarreta maior demanda no tempo de análise e maior complexidade mecânica do sistema.

Psarellis et alii¹⁴⁶ desenvolveram um novo método empregando análise por injeção em fluxo. O método tem como princípio a oxidação do sulfito, grupo presente na molécula do ciclamato, pelo cério(IV). A detecção foi feita por quimioluminescência e o método apresentou uma linearidade de $5,6 \times 10^{-6}$ - $2,8 \times 10^{-4}$ M de ciclamato e frequência analítica de 100 determinações por hora. Essa metodologia destaca-se por ser a primeira a empregar análise por injeção em fluxo na determinação de ciclamato, mas necessita de estudos complementares sobretudo em relação à sua seletividade, visto que todos os adoçantes sintéticos interferem no método.

Ciclamato reage com nitrito em meio ácido formando nitrogênio, ciclohexeno e ácido sulfúrico. Desta maneira é muito importante conhecer métodos de determinação de nitrito, uma vez que poderão ser utilizados na determinação indireta deste adoçante.

A determinação espectrofotométrica de nitrito foi inicialmente proposta por Griess¹⁴⁷ e baseia-se na formação de azocompostos (corante azo). Esse método teve diversas modificações, sobretudo quanto aos reagentes empregados.

O nitrito reage inicialmente com uma amina aromática primária formando um sal de diazônio. Em seguida, esse sal sofre um acoplamento com um composto aromático contendo um grupo amino ou um grupo fenólico, com formação de um azo composto colorido que é determinado por espectrofotometria. A formação deste corante depende do pH da solução, da temperatura, como também da concentração e do tipo de reagente usado¹⁴⁸. Comumente são empregados a sulfanilamida ou ácido sulfâmico e o N-naftiletilenodiamina como reagente de Griess modificado. Empregando essas reações foram desenvolvidos métodos para determinação de nitrito utilizando sistemas de injeção em fluxo^{149,150}.

Um procedimento espectrofotométrico por injeção em fluxo para análise de ciclamato em refrigerantes dietéticos e adoçantes artificiais foi desenvolvido pelo nosso grupo¹⁵¹⁻¹⁵³. Este sistema baseia-se na reação deste adoçante com nitrito em meio de ácido fosfórico $1,0 \times 10^{-1}$ M e o excesso desse redutor

foi determinado pelo método de Griess. O sistema foi projetado levando-se em conta a velocidade da reação redox e interferências de corantes naturais e/ou sintéticos foram eliminados com uma coluna de alumina. Após injeção da amostra, esta coluna foi regenerada com um fluxo em sentido contrário de uma solução contendo hidróxidos de amônio e sódio. Ciclamato foi determinado em nove amostras com uma velocidade analítica de 24 resultados/h. O limite de detecção foi igual a $3,0 \times 10^{-5}$ M e o desvio padrão relativo foi menor que 0,5% para uma solução contendo $8,0 \times 10^{-4}$ M de ciclamato ($n = 12$).

Um procedimento simples, preciso e exato para a determinação de ciclamato em produtos dietéticos como pudim, gelatina, adoçantes de mesa, coca-cola e guaraná foi recentemente proposto¹⁵⁴⁻¹⁵⁷. O ciclamato foi titulado com solução de nitrito de sódio em solução de ácido fosfórico 1,0 M e o ponto final da titulação foi determinado biamperometricamente^{154,156,157} pelo aumento abrupto de corrente observado em dois eletrodos de platina polarizados com um potencial de 0,7 V, quando um pequeno excesso de titulante é adicionado. Sacarose, glicose, frutose, sacarina, sorbitol, ácido benzóico, ácido salicílico, ácido fumárico, lactose, amarelo crepúsculo e bordeaux-S não interferem, mesmo em concentrações significativas. O limite de detecção foi de $1,3 \times 10^{-3}$ M e o desvio padrão relativo foi igual a 1% para soluções contendo $5,0 \times 10^{-3}$ M deste adoçante ($n = 9$). Uma recuperação variando de 97,6 a 102,5% foi obtida nos estudos com quatro produtos dietéticos, indicando assim boa precisão deste método. Uma adaptação deste método em fluxo¹⁵⁵⁻¹⁵⁷, permitiu determinar ciclamato em alguns produtos dietéticos do mercado nacional, com uma velocidade analítica de 90 resultados/h.

4. SACARINA

4.1 Síntese, propriedades e características

Sacarina (o-benzóico sulfimida, $C_6H_4COSO_2NH$) (Figura 11) é o mais antigo dos edulcorantes artificiais, tendo sido acidentalmente descoberta e sintetizada em 1879 por Fahlberg¹⁵⁸. Segundo Bakal¹⁵⁹, a sacarina é o substituto da sacarose mais empregado em todo o mundo. São cristais incolores com ponto de fusão de 228-230°C. Um grama deste adoçante se dissolve em 290 mL de água a 25°C, e em 25 mL a 100°C. Sua solubilidade é maior em álcool, acetona, clorofórmio e acetato de etila.

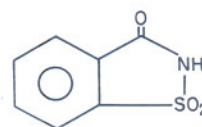


Figura 11. Estrutura da Sacarina.

A sacarina é usada em alimentos, bebidas, cosméticos, medicamentos, ração para animais e em processos industriais, devido ao seu poder edulcorante de 400-500 vezes a da sacarose (Tabela 2), estabilidade e baixo custo. O inconveniente deste edulcorante é seu gosto residual amargo⁸.

4.2 Metabolismo

A absorção de sacarina pelo homem está em torno de 95% e ainda existem controvérsias sobre sua toxicidade. Em 1969 descobriu-se que provocava câncer em ratos quando estes ingeriam em grandes quantidades, e seu uso em bebidas dietéticas e alimentos tornou-se motivo de controvérsia. Seu emprego em produtos dietéticos e/ou medicamentos nos E.U.A. foi proibido em 1977, baseado no critério da proibição do consumo de uma substância quando há dúvidas sobre seu caráter carcinogênico, mesmo que tais dúvidas sejam discutíveis. Como

se supõe que a utilização da sacarina como adoçante não acarreta riscos a saúde, ela ainda é usada em produtos dietéticos em muitos países. Em vários países da Europa seu consumo é autorizado em baixas concentrações. Em 1984, o Comitê Misto FAO/OMS autorizou o consumo de 2,5 mg de sacarina / kg de peso corpóreo. No Brasil a legislação limita o consumo em 30 mg/100 g, para alimentos, e 30 mg/100 ml, para bebidas (D.O.U., 19/12/1988).

4.3 Métodos de Determinação

A existência de normas ou limites máximos permissíveis para sacarina em alimentos, pressupõe o emprego de métodos analíticos adequados para garantir uma eficiente vigilância sanitária.

O mais antigo e menos sensível método para determinação de sacarina é o método gravimétrico baseado na determinação de sulfato, como sulfato de bário, formado na reação desse adoçante com bromo na presença de NaOH. Nessa reação de substituição, há formação de uma N-bromoamida¹⁶⁰ - primeira etapa da degradação de Hoffmann. A quantidade de sulfato formado é, em seguida, determinada gravimetricamente com bário. Este método é recomendado pela Association of Official Analytical Chemists¹⁶¹ e pelo Instituto Adolfo Lutz¹⁶², sendo um dos maiores inconvenientes o elevado tempo requerido para a análise.

Helak e colaboradores¹⁶³, utilizando a técnica polarográfica de pulso diferencial, obtiveram uma relação linear ($r = 0.9999$) entre a concentração de sacarina e a corrente de difusão na faixa de $9,8 \times 10^{-7}$ a $2,1 \times 10^{-3}$ M, com uma faixa de recuperação de 91,9 - 101,5%. A AOAC¹⁶⁴ adota este método como oficial.

Polarografia também foi usada por Lasheen¹⁶⁵ na quantificação de sacarina em extratos de vegetais enlatados, onde uma etapa prévia de conversão de sacarina sódica em sacarina foi realizada utilizando-se uma coluna Dowex-50 (na forma ácida). A faixa útil de trabalho foi entre $1,2 \times 10^{-7}$ - $9,7 \times 10^{-6}$ M, apresentando índice de recuperação entre 91,8 a 99,0%. O método se mostrou sensível e reproduzível, possível de ser adaptado para diferentes materiais vegetais.

Sontag e Kral¹⁶⁶, também empregaram resina Dowex 50W-X8 para converter sacarina sódica em sacarina ácida, previamente à sua determinação por polarografia de pulso diferencial. O limite de detecção foi de $2,4 \times 10^{-6}$ M. Outro método polarográfico de pulso diferencial usando iodeto de tetrabutilamônio 4×10^{-3} M-cloreto de sódio 1×10^{-1} M para a determinação de acesulfame-K e sacarina foi também desenvolvido²⁹.

Sacarina é também usada como abrlhantador em galvanoplastia e sua determinação em banhos eletroquímicos foi feita por polarografia de pulso diferencial e por polarografia de corrente contínua (d.c.) e de corrente alternada (a.c.)¹⁶⁷. A extração da sacarina foi realizada com uma mistura de acetato de etila e tetracloreto de carbono, seguida da adição de cianeto para mascarar metais nobres. As faixas úteis de trabalho situam-se entre $1,9 \times 10^{-5}$ - $5,6 \times 10^{-4}$ M (polarografia de pulso diferencial) e $9,7 \times 10^{-6}$ - $2,2 \times 10^{-4}$ M (polarografia a. c.), com limites de detecção de $2,4 \times 10^{-5}$ M e $1,2 \times 10^{-4}$ M, respectivamente. Os métodos são aplicáveis para a determinação de sacarina em banhos eletrolíticos contendo Pd, Au e Ni. O método por polarografia d.c. é o mais recomendado, pois não envolve a separação prévia do edulcorante.

A determinação quantitativa de sacarina pode ser feita também por métodos cromatográficos. Existem métodos que empregam sílica gel para a separação de sacarina por cromatografia em camada delgada¹⁶⁸.

Dois métodos cromatográficos (cromatografia em papel e cromatografia em camada delgada) são citados pelo Instituto Adolfo Lutz para a determinação quantitativa de sacarina¹⁶⁹. O primeiro emprega papel Whatman nº1 e uma mistura eluente composta de acetona, hidróxido de amônio e acetato de etila (5:1:1). A revelação é feita com nitrato de prata em

álcool amoniacal e solução de pirogalol. O segundo procedimento emprega placa de vidro com sílica gel G, em cuba cromatográfica. A revelação foi feita com solução de rodamina-B, após eluição com solução de clorofórmio-ácido acético. Ambos os métodos são aplicáveis na separação de sacarina, ciclamato e dulcina.

A determinação por cromatografia gás-líquido requer prévia derivatização dos constituintes da amostra antes da injeção^{170,171}. Um acoplamento de cromatografia gasosa e espectrometria de massa para determinação de sacarina foi proposto por Heitkemper et alii¹⁷². O pré-tratamento pode ser evitado empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)¹⁷³⁻¹⁷⁷. A detecção é geralmente feita em 254 nm e, já algum tempo, detectores de malha de diodos estão sendo utilizados¹⁷⁸. Os métodos que empregam CLAE apresentam maior seletividade e sensibilidade dentre todos os métodos cromatográficos atualmente utilizados para a determinação deste adoçante.

A aplicação de métodos baseados na determinação de sacarina no UV se estende desde produtos alimentícios¹⁷⁹ até banhos de galvanoplastia¹⁸⁰. Nesse último, a determinação foi feita com base na primeira derivada do espectro, obtendo-se um desvio padrão de 1,2%, precisão de $\pm 2,4 \times 10^{-7}$ M e um limite de detecção de $4,9 \times 10^{-7}$ M. Losada et alii¹⁸¹, utilizaram vários métodos de tratamento de sinais (absorbância líquida, área de pico, primeira e segunda derivadas) para a determinação de sacarina. Uma comparação entre esses métodos também foi apresentada. Uma aplicação em produtos dietéticos resultou em uma precisão de 0,8 a 3,2% e uma faixa de recuperação entre 93,6 e 104,5%. Recentemente, Viana-Soares e Martins¹⁸², apresentaram um método espectrofotométrico utilizando segunda (D^2) e quarta (D^4) derivadas, com faixa de concentração de $1,4 \times 10^{-4}$ - $4,8 \times 10^{-4}$ M em uma varedura feita de 240,0 a 320,0 $\pm 0,5$ nm. Foram obtidas nesta metodologia faixas de recuperação de 96,6-99,3% (D^2) e 95,4-104,8% (D^4) para soluções e 95,5-99,7% (D^2) e 98,8-104,5% (D^4) para tabletes.

No método descrito por Hussein e colaboradores¹⁷⁹ determinou-se a absorbância em 235 e 244 nm; a absorbância nesse último comprimento de onda é útil para se corrigir alguma possível interferência. A 235 nm obteve-se uma relação linear até $2,2 \times 10^{-4}$ M com um fator de recuperação entre 83 e 113%.

A formação e extração de pares iônicos de sacarina com certos corantes, oferece uma alternativa para a determinação espectrofotométrica desse edulcorante.

Um método espectrofotométrico mais seletivo para a determinação de sacarina empregando fenolssulfonaftaleína como reagente foi proposto por Fernandez-Flores et alii¹⁸³. Entretanto, um estudo interlaboratorial revelou que o método, apesar de mais seletivo, apresenta um coeficiente de variação maior que 5% não sendo, portanto, indicado como método oficial de análise. Nestes casos, um valor menor do que 5% seria recomendado.

Outros métodos utilizam a reação de sacarina com fenotiazina¹⁸⁴ e clorofenotiazina¹⁸⁵. Ambos apresentaram faixa linear entre $9,7 \times 10^{-5}$ e $1,9 \times 10^{-3}$ M e desvio padrão relativo menor que 2%. Concentrações de ciclamato e ácido benzóico cinco vezes superiores à concentração de sacarina não causaram interferência. A tabela 4 apresenta alguns outros métodos espectrofotométricos na região do visível descritos na literatura¹⁸⁵⁻¹⁸⁹.

Dentre os métodos potenciométricos, os mais utilizados para a determinação de sacarina empregam eletrodos íon-seletivos (ISE) formados por pares iônicos em uma matriz de PVC¹⁹⁰⁻¹⁹⁹.

A construção desses eletrodos envolve geralmente três etapas: a) formação do par iônico; b) extração e dissolução do par iônico e c) formação da película PVC/par iônico sobre uma superfície condutora (grafite). As medidas com esse tipo de eletrodo são influenciadas principalmente pela concentração do par iônico na membrana, concentração do analito em solução, pH, concentração de íons interferentes, intensidade iônica e temperatura.

Todos esses eletrodos sofrem uma maior ou menor influência

Tabela 4. Alguns métodos espectrofotométricos baseados na formação e extração de pares iônicos de sacarina.

Corante	Faixa Linear (M)	λ (nm)	ϵ (L/mol.cm)	Extrator	Ref.
Fucsina básica	$1,0\text{--}5,8 \times 10^{-5}$	545	—	Clorofórmio	185
Azure B	$9,7\text{--}5,8 \times 10^{-5}$	685	$2,4 \times 10^3$	Clorofórmio	186
Azure C	$0,1\text{--}3,6 \times 10^{-4}$	680	$3,1 \times 10^3$	Clorofórmio	187
Azul do Nilo	$0,5\text{--}49,7 \times 10^{-6}$	630	$5,8 \times 10^4$	MIKB	188
Ferroína	$1,2\text{--}5,0 \times 10^{-4}$	510	$8,0 \times 10^2$	Água	189

de substâncias interferentes de acordo com o valor de seus respectivos coeficientes de seletividade, $K_{\text{sac},I}$. O potencial final, na presença de íon interferente monovalente, é dado pela equação empírica de Pungor e Tóth²⁰⁰:

$$E = E^* + RT/F \cdot \ln (C_{\text{sac}} + K_{\text{sac},I} \cdot C_{\text{sac}}/C_I)$$

onde E representa o potencial medido, E^* potencial condicional, $K_{\text{sac},I}$ o coeficiente de seletividade e C_{sac} e C_I as concentrações de sacarina e do íon interferente, respectivamente.

Métodos para determinação de sacarina baseados em titulações em solventes não aquosos também são encontrados na literatura²⁰¹.

Nakamura²⁰² descreveu um método onde a fluorescência foi medida a 410 nm (excitação a 277 nm). A intensidade da fluorescência foi linearmente proporcional à concentração para concentrações de sacarina acima de $3,9 \times 10^{-5}$ M. O método mostrou-se lento e havia etapas onde foi necessário aquecimento (75–80°C). O fator de recuperação para 23 amostras diferentes variou entre 82 e 98%.

Baseado na reação de precipitação do ânion sacarinato com o íon mercurioso, propusemos recentemente três métodos analíticos para a determinação quantitativa deste edulcorante^{203–209}.

Um método gravimétrico^{203,204,206} rápido, preciso e de baixo custo para a determinação de sacarina em adoçantes de mesa usando nitrato mercurioso como reagente de precipitação foi desenvolvido. Os melhores resultados foram encontrados em pH igual a 2 com um desvio padrão relativo de 4,3%. Este método proposto, requer um número bem menor de etapas e pode ser realizado em tempo muito inferior ao atualmente empregado pelo Instituto Adolfo Lutz¹⁶². Ciclamato, ácido benzóico, lactose, frutose, glicose e sacarose não interferem quando presentes, mesmo em concentrações elevadas.

Na titulação de sacarina com nitrato mercurioso^{203,207,208}, ciclamato pode estar presente em concentrações de até vinte vezes superior à de sacarina, sem causar interferência significativa. O ponto de equivalência foi determinado pelo método de Gran modificado, devido a assimetria da curva de titulação e também a baixa definição do salto potenciométrico esteja associado. Esta assimetria deve estar associada a cinética de formação do precipitado, enquanto que o salto potenciométrico a moderada insolubilidade do sacarinato mercurioso. Este método apresentou um percentual de recuperação entre 95,2 e 103,2%.

Este procedimento potenciométrico foi adaptado em um sistema de injeção em fluxo^{203,205} com um filtro relocável, para eliminar “on-line” o precipitado formado, evitando assim um acúmulo do mesmo na superfície do eletrodo indicador potenciométrico. Neste sistema, sacarina foi determinada em diversos produtos dietéticos com uma velocidade de 60 amostras/h, com um consumo de 0,76 mg de $\text{Hg}_2(\text{II})$ por determinação. Os resultados são compatíveis com os obtidos por espectrofotometria UV com coeficiente de correlação entre os dois métodos de 0,9930.

Um eletrodo tubular ion-seletivo a sacarina²⁰⁹ foi construído e aplicado em análise por injeção em fluxo (FIA) deste edulcorante em adoçantes de mesa.

Investiga-se atualmente o desenvolvimento de um método sequencial em FIA para a determinação de ciclamato (detecção

espectrofotométrica) e sacarina (detecção potenciométrica) em diversos produtos dietéticos do mercado nacional.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio financeiro do CNPq (processo no. 50.16338/91), FAPESP (processos n.ºs. 91/ 2637-5 e 94/ 4822-2) e PADCT/CNPq (processo n.º 620060/91.3), as bolsas de mestrado da CAPES e CNPq recebidas pelos Srs. I. C. V., S. T. G., S. A. C. e A. J. M. G. -S., ao IQSC-USP, São Carlos-SP e ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega (DQ-UFSCar) pelo trabalho conjunto no desenvolvimento dos métodos de análise por injeção em fluxo.

REFERÊNCIAS

- Gava, A. J.; *Princípios de Tecnologia de Alimentos*; Livraria Nobel S. A.; Ed; São Paulo, 1988; p. 253.
- Encyclopedia of Food Additives*, 1ª ed., Globe Communication Corp., Boca Raton, 1987.
- Candebat, Z. E. V.; Roché, M. O. G.; *Alimentaria* **1989**, jul/ago, 47.
- Weast, R. C.; *Handbook of Food Additives*; Furia, T. E., Ed.; The Chemical Rubber Co.; 1986; p. 501.
- Ohtmer, D. F.; *Encyclopedia of Chemical Technology*; John Wiley & Sons, Ed.; New York, 1984; p. 448.
- Lehniger, A. L.; *Princípios de Bioquímica*, Sarvier, 1990; p. 541.
- Prista, L. N.; Alves, A. C.; Morgado, R. M. R.; *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica*; Fundação Calouste Gulbenkian, Ed.; vol. 2, São Paulo, 1990; p.102.
- O'Brien, L.; Gelardi, R. C.; *Chemtech* **1981**, May, 274.
- Inglett, G. E.; *Food Technol.* **1981**, Mar., 37.
- Crosby, G. A.; Dubois, G. E.; Wingard Jr., R. E.; *Drug Design*; vol.8.; Ariens, E.J.; Academic Press, Ed.; New York, 1979; p. 215.
- Crosby, G. A.; *Crit. Revs. in Food Sci.* **1976**, 7, 297.
- Grency, T. H.; *Chem. in Brit.* **1991**, 27, 342.
- Schalleberger, R. S.; Acree, T. E.; *Nature* **1967**, 216, 480.
- Schalleberger, R. S.; Acree, T. E.; Lee, C. Y.; *Nature* **1969**, 221, 555.
- Kier, L. B.; *J. Pharm. Sci.* **1972**, 61, 1394.
- Holtje, H. D.; Kier, L. B.; *J. Pharm. Sci.* **1974**, 63, 1722.
- Roberto-Neto, O.; Ornellas, F. R.; *Quím. Nova* **1988**, 11, 271.
- Fuoco, T. H.; *Química e Derivados* **1991**, abril, 21.
- Hood, L. L.; Schoor, M.; *Cereal Foods World* **1990**, 35, 1182.
- Lipinski, G-W. R.; *Food Chem.* **1985**, 16, 259.
- Reuschling, D. B.; Linkies, A. H.; Reimann, W.; Schweikert, O. and Mack, K. E.; Ger. Patent DE 3531359, 1987.
- Schuetz, J.; Schweikert, O.; Ger. Patent DE 3520070, 1987.
- Weber, E.; Eckhard, P.; Reuschling, D. B.; Linkies, A. H.; Ger. Patent DE 3531357, 1987.

24. Sinkeldam, E. J.; Kuper, C. F.; Beems, R. B.; Newman, A. J.; Feron, V. J., *Food Sci. Technol.* **1991**, 47, 43.
25. Beems, R. B.; Til, H. P.; Newman, J.; Mayer, D. G.; *Food Sci. Technol.* **1991**, 47, 59.
26. Jung, R.; Kreiling, R.; Mayer, D. G.; *Food Sci. Technol.* **1991**, 47, 87.
27. Baeder, C.; Horstmann, G.; Wegand, W.; Kramer, M.; *Food Sci. Technol.* **1991**, 47, 115.
28. Sastry, C. S. P.; Prasad, U. V.; Rao, M. V.; Kapur, O. P.; *Acta Indica Chem.* **1990**, 16C, 389.
29. Hannisdal, A.; Schroeder, K.H.; *Electroanalysis* **1993**, 5, 183.
30. Moyiyasu, T.; Saito, K.; Nakazato, M.; Ishikawa, F.; Fijinuma, K.; Nishima, T.; *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* **1993**, 34, 277; apud *Anal. Abstr.* 5608H182.
31. Wu, P. W.; Cheng, C. C.; Chou, S. S.; *Yaowu Shipin Fenxi* **1993**, 1, 373; apud *Anal. Abstr.* 5606H268.
32. Lehr, M.; Schmid, W.; *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* **1993**, 89, 43. apud *Anal. Abstr.* 1993, 5512H274.
33. Hannisdal, A.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, 194, 517.
34. Lawrence, J. F.; *J. Environ. Anal. Chem.* **1990**, 38, 115.
35. Moyiyasu, T.; Saito, K.; Nakazato, M.; Ishikawa, F.; Fijinuma, K.; Nishima, T.; *J. Toxicol. Environ. Health* **1991**, 37, 97.
36. Di Pietra, A. M.; Cavrini, V.; Bonazzi, D.; Benfenati, L.; *Chromatographia* **1990**, 30, 215.
37. Biemer, T. A.; *J. Chromatogr.* **1989**, 463, 463.
38. Lawrence, J. F.; Charbonneau, C. F.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1988**, 71, 934.
39. Klein, H.; Stoya, W.; *Ernaehrung (Vienna)* **1987**, 11, 322.
40. Veerabhadra Rao, M.; Narayan, M. S.; Kapur, O.; Sastry, C. S.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1987**, 70, 578.
41. Lawrence, J. F.; *Analyst* **1987**, 112, 879.
42. Zache, U.; Grending, H.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, 184, 503.
43. Mazur, R. H.; Schlatter, J. M.; Goldkamp, A. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 2684.
44. Mazur, R. H.; *Discovery of Aspartame*; Stegink, L. D.; Filer, L. J., Ed.; Marcel Dekker, New York, 1984; p. 3.
45. O'Sullivan, D.; *Chem. & Engineer. News* **1983**, 24, 29.
46. Cloninger, M. R.; Baldwin, R. E.; *Science* **1970**, 170, 81.
47. Bakal, A. I.; *Chem. and Industry* **1983**, sep., 700.
48. King, R. D.; Cheethan, P. S. J.; *Food Biotechnology*; vol 2, Elsevier Applied Science, Ed.; 1988; p. 219.
49. Signoretti, E. C.; Dell'Utri, A.; Salvo, A.; *Boll. Chim. Farm.* **1983**, 122, 289.
50. Knorr, D.; *Food Biotechnology*, Marcel Dekker, Inc., Ed.; New York, 1987; p.425.
51. Homler, B. E.; *Food Technol.* **1984**, Jul., 50.
52. Vetsch, W.; *Food Chem.* **1985**, 16, 245.
53. Ven, V. A. A.; *Alimentaria* **1988**, Jun., 61.
54. Homler, B. E.; *Aspartame: Implications for Food Scientist*, In: *Aspartame: Physiology and Biochemistry*; Stegink, L. D.; Filer, L. J., Eds.; Marcel Dekker, New York, 1984; p. 247.
55. Fellows, J. W.; Chang, S. W.; Shazer, W. H.; *Science* **1991**, 56, 689.
56. Ranney, R. E.; Opperman, J. A.; Muldoon, E.; McMahon, F. G.; *J. Tox. Env. Health* **1976**, 2, 441.
57. Horwitz, D. L.; Nehrling, L. K. B.; *J. Am. Diet. Assoc.* **1983**, 83, 142.
58. Vallero, R. B. B.; Pizarro, C. G.; Moreno, P. P.; Carmena, L. F.; *Alimentaria* **1990**, Oct., 23.
59. Opperman, J. A.; *Food Sci. Technol.* **1984**, 12, 141.
60. Stegink, L. D.; *Food Technol.* **1987**, Jan., 119.
61. Opperman, J. A., Muldoon, E.; Ranney, R. E.; *J. Nutr.* **1973**, 103, 1454.
62. Opperman, J. A., Muldoon, E.; Ranney, R. E.; *J. Nutr.* **1973**, 103, 1460.
63. Stegink, L. D.; Filer Jr., L. J.; Baker, G. L.; McDonnell, J. E.; *J. Nutr.* **1979**, 109, 708.
64. Rogers, P. J.; Keedwell, P.; Brundell, J. G.; *Phys. & Behav.* **1991**, 49, 739.
65. Black, R. M.; Tanaka, P.; Leiter, L. A.; Anderson, G. H.; *Phys. & Behav.* **1991**, 49, 803.
66. Renneberg, R.; Riedel, K.; Scheller, F.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1985**, 21, 180.
67. Mulchandani, A.; Male, K. B.; Luong, J. H. T.; Gibbs, B. F.; *Anal. Chim. Acta* **1990**, 20, 465.
68. Villarta, R. L.; Suleiman, A. A.; Guilbault, G. G.; *J. Microchem.* **1993**, 48, 60.
69. Guilbault, G. G.; Lubrano, G. J.; Kauffmann, J. M.; Patriarche, G. J.; *Anal. Chim. Acta.* **1988**, 20, 369.
70. Fatibello-Filho, O.; Suleiman, A. A.; Guilbault, G. G.; Lubrano, G. J.; *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2397.
71. Malaki, E. A.; Koupparis, M. A.; *Analyst* **1987**, 112, 757.
72. Atmaca, S.; Iskender, G.; Bayer, E.; *Acta Pharm. Turc.* **1989**, 31, 37.
73. Prasad, U. V.; Davikar, T. E.; Sastry, C. S. P.; Rao, M. V.; Kapur, O. P.; *Food Chem.* **1988**, 28, 269.
74. Tyler, T. A.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1984**, 67, 745.
75. Webb, N. G.; Beckman, D. D.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1984**, 67, 510.
76. Tsang, W. S.; Clarke, M. A.; Parrish, F. W.; *J. Agric. Food Chem.* **1985**, 33, 734.
77. Fox, L.; Anthony, G. D.; Lau, E. P. K.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1976**, 59, 1048.
78. Delaney, M. F.; Pasko, K. M.; Mauro, D. V.; Gsell, D. S.; Korologos, P. C.; *J. Chem. Educ.* **1985**, 62, 618.
79. Issaq, H.J.; Weiss, D.; Ridlon, C.; Fox, S.D.; Muschik, G.M.; *J. Liq. Chromatogr.* **1986**, 9, 1791.
80. Verzella, G.; Bagnasco, G.; Manglia, A.; *J. Chromatogr.* **1985**, 349, 83.
81. Di Pietra, A. M.; Cavrini, V.; Bonazzi, D.; Benfenati, L.; *Chromatography* **1990**, 30, 215.
82. Verzella, G.; Manglia, A.; *J. Chromatogr.* **1985**, 346, 417.
83. Gaines, S. M.; Bada, J. L.; *J. Chromatogr.* **1987**, 387, 219.
84. Argoudelis, C. J.; *J. Chromatogr.* **1984**, 303, 256.
85. Furda, I.; Malizia, P. D.; Kolor, M. G.; Vernieri, P. J.; *J. Agr. Food Chem.* **1975**, 23, 340.
86. Hunssein, M. M.; D'amelia, R. P.; Manz, A. L.; Jacin, H.; Chen, W. T. C.; *J. Food Science* **1984**, 49, 520.
87. Bazylak, G.; *J. Chromatogr.* **1994**, 668, 519.
88. Jimidar, M.; Hamoir, T.P.; Foriers, A.; Massart, D. L.; *J. Chromatogr.* **1993**, 636, 179.
89. Sánchez, F.G.; Gallardo, A. A.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, 270, 45.
90. Lau, O.W.; Luk, S.F.; Chan, W. M.; *Analyst* **1988**, 113, 765.
91. Vasely, Z.; Davidkova, E.; Prudel, M.; *Nahrung* **1980**, 24, 525.
92. Ishiwata, A.; Suzuki, Y.; *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **1975**, 16, 420; apud *Anal. Abstr.* **1977**, 32, 2F11.
93. Prudel, M.; Davidkova, E.; *Prum. Potravín.* **1980**, 31, 329; apud *Anal. Abstr.* **1981**, 40, 1F27.
94. Tuncel, T.; Araman, A.; *Acta Pharm. Turc.* **1989**, 31, 61.
95. Ozol, T.; *Acta Pharm. Turc.* **1984**, 26, 59.
96. Guven, K. C.; Ozol, T.; *Acta Pharm. Turc.* **1984**, 26, 28.
97. Araman, A.; Temiz, D.; *Acta Pharm. Turc.* **1989**, 31, 29.
98. Vacher, J.; *Cesk. Farm.* **1984**, 33, 217; apud *Anal. Abstr.* **1985**, 47, 4E86.
99. Hamano, T.; Mitsuhashi, Y.; Aoki, N.; Yamamoto, S.; Tsuji, S.; Ito, Y.; Oji, Y.; *Analyst* **1990**, 115, 435.
100. Dinçkaya, E.; Çagin, M.; Telefoncu, A.; *Food Chem.* **1994**, 50, 95.

101. Lehninger, A. L.; *Bioquímica*: tradução de José Roberto Magalhães, Sílvia C. Alfieri, C. A. Tanesini e D. J. Muniz e supervisão de José Reinaldo Magalhães, V.1, Ed. Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 1976, p.60.
102. Vieira, I. C.; Dissertação de Mestrado, Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, USP, São Carlos, SP, 1993.
103. Vieira, I. C.; Fatibello-Filho, O.; *Quím. Nova* **1995**, *18*, 250.
104. Vieira, I. C.; Nóbrega, J.A.; Fatibello-Filho, O., In: Anais, 7º Encontro Nacional de Química Analítica, Rio de Janeiro, RJ, 08-10 de setembro de 1993, p. 147.
105. Nóbrega, J. A.; Fatibello-Filho, O.; Vieira, I. C.; *Analyst* **1994**, *119*, 2101.
106. Vieira, I. C. e Fatibello-Filho, O., In: Anais, 16º Reunião Anual da SBQ, Caxambú, MG, 25-29 de maio de 1993, p. QA-87.
107. Sveda, M.; Audrieth, L. F.; *J. Org. Chem.* **1944**, *9*, 89.
108. Breck, K. M.; *Food Technol.* **1957**, *3*, 156.
109. Kojima, S.; Ichibagase, H.; *Chem. Pharm. Bull.* **1968**, *14*, 971.
110. Kojima, S.; Ichibagase, H.; *Chem. Pharm. Bull.* **1968**, *16*, 1622.
111. Ahmed, F. A.; Thomas, D. B.; *CRC Critical Reviews in Toxicology* **1992**, *22*, 81.
112. Boop, B. A.; Sonders, R. C.; Kesterson, J. W.; *CRC Critical Reviews in Toxicology* **1986**, *16*, 213.
113. Richardson, M. L.; *Talanta* **1967**, *14*, 385.
114. Barnes, R. M.; *J. Chem. Educ.* **1972**, *49*, 272.
115. Wilson, J. B.; *J. Assoc. off Agr. Chem.* **1955**, *38*, 559.
116. Keilhöfer, E.; Aumann, H.; Wein-Wiss.; *Beiheft Fachzeit. Deut Weinbau* **1955**, *9*, 1; apud *Chem. Abstr.* **1959**, *50*, 5975e.
117. *Official Methods of Analysis of the AOAC*, 14ª ed., Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, **1984**, 20.180, p. 401.
118. Instituto Adolfo Lutz; "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz", 3ª ed., CIP Brasil, São Paulo, SP, p.114.
119. *National Formulary XII* **1965**, 362, 68.
120. Vercillo, A.; Manzone, A.; *Rend. Ins. Super. Sanita.* **1961**, *24*, 664; apud *Chem. Abstr.* **1962**, *56*, 14679h.
121. Kurayuki, Y.; Mizunoya, Y.; Kojima, H.; *Yakugaku Zasshi* **1966**, *86*, 890; apud *Anal. Abstr.* **1966**, *15*, 1064.
122. Daming, Z.; Chenazhi, T.; *Fenxi Huaxue* **1988**, *16*, 938; apud *Chem. Abstr.* **1989**, *110*, 73968w.
123. Richardson, M. L.; Luton, P. E., *Analyst* **1966**, *91*, 522.
124. Mitchell, L. C.; *J. Assoc. Off Agric. Chem.* **1955**, *38*, 944.
125. Wilson, J. B.; *J. Assoc. Off Agric. Chem.* **1960**, *38*, 583.
126. Komoda, T.; Takeshita, R.; *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* **1961**, *3*, 382; apud *Chem. Abstr.* **1964**, *60*, 6130f.
127. Dalziel, J. A. W.; Johnson, R. M.; Shenton, A. J.; *Analyst* **1972**, *97*, 719.
128. Derse, P. H.; Robert, J. D.; *J. Assoc. Off Agric. Chem.* **1966**, *49*, 1090.
129. Hauck, M.; Kobleler, H.; *Z. Lebensm.-Unters Forsch.* **1990**, *191*, 322.
130. Lawrence, J. F.; Charbonneau, C. F.; *J. Assoc. Off Agric. Chem.* **1988**, *71*, 934.
131. Lawrence, J. F.; *Analyst* **1987**, *112*, 879.
132. Herrmann, A.; Damawandi, E.; Waggmann, M.; *J. Chromatogr* **1983**, *280*, 85.
133. Biemer, T. A.; *J. Chromatogr* **1989**, *463*, 463.
134. Oba, T.; Ukoda, T.; Kawashiro, I.; *Eisei Shikenjo Hokoku* **1959**, *77*, 61; apud *Chem. Abstr.* **1961**, *55*, 14817f.
135. Coppini, D.; Albisini, A.; *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **1968**, *59*, 239, apud *Chem. Abstr.* **1968**, *17*, 3051.
136. Hoo, D.; Hu; Chun-Chuam, H.; *Anal. Chem.* **1972**, *44*, 2111.
137. Alanko, T. A.; Sjöbreg, A. M. K.; *J. Assoc. Off Agric. Chem.* **1987**, *70*, 588.
138. Sjöbreg, A. M. K.; *J. Assoc. Off Agric. Chem.* **1988**, *71*, 1212.
139. Kojima, S.; Ichibagase, H.; *Yakugaku Zasshi* **1963**, *83*, 1108; apud *Chem. Abstr.* **1963**, *60*, 15060fg.
140. Lopez, G. I.; Sanchez-Pedreno, C.; *Anal. Cienc.* **1968**, *45*, 25.
141. Tanaka, R.; *Chem. Pharm. Bull.* **1967**, *15*, 1437.
142. Johnson, D. E.; Nunn, H. B.; *J. Assoc. Off Agric. Chem.* **1968**, *51*, 1274.
143. Ichikawa, M.; Kojima, S.; Ichibagase, H.; *Yakugaku Zasshi* **1964**, *84*, 563; apud *Chem. Abstr.* **1964**, *61*, 10045a.
144. Johnson, R. M.; Shenton, A. J.; *Analyst* **1973**, *98*, 745.
145. Johnson, R. M.; Shenton, A. J.; *Analyst* **1973**, *98*, 749.
146. Psarellis, I. M.; Sarantonis, E. G.; Calokerinos, A. C.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, *272*, 265.
147. Griess, J. P.; *Proc. R. Soc.* **1857**, *9*, 594.
148. Fox, J. B.; *CRC Crit. Rev. in Anal. Chem.* **1985**, *15*, 283.
149. Giné, M. F.; Bergamin, H. F.; Zagato, E. A. G.; Reis, B. F.; *Anal. Chim. Acta* **1980**, *114*, 191.
150. Leif, A.; *Anal. Chim. Acta* **1979**, *110*, 123.
151. Gouveia, S. T.; Nóbrega, J. A.; Fatibello-Filho, O.; In: Anais, 17º Reunião Anual da SBQ, Caxambú, MG, 24-27 de maio de 1994, p. QA-52.
152. Gouveia, S. T.; Dissertação de Mestrado, Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, USP, São Carlos, SP, 1994.
153. Gouveia, S. T.; Fatibello-Filho, O.; Nóbrega, J. de A.; *Analyst* **1995**, *120*, 2009.
154. Calafatti, S. A.; Fatibello-Filho, O.; Capelato, M. D.; Gama, R.; In: Anais, 7º Encontro Nacional de Química Analítica, Rio de Janeiro, RJ, 08-10 de setembro de 1993, p. 270.
155. Calafatti, S. A.; Capelato, M. D.; Fatibello-Filho, O.; Teixeira, M. F. S., In: Anais, 17º Reunião Anual da SBQ, Caxambú, MG, 24-27 de maio de 1994, p. QA-58.
156. Calafatti, S. A.; Dissertação de Mestrado, Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, USP, São Carlos, SP, 1994.
157. Fatibello-Filho, O.; Capelato, M. D.; Calafatti, S. A.; *Analyst* **1995**, *120*, 2407.
158. Tarbell, D. S.; Tarbell, A. T.; *J. Chem. Educ.* **1978**, *55*, 161.
159. Bakal, A. J.; *Food Technol.* **1987**, *41*, 117.
160. Kattab, F. I.; *Anal. Lett.* **1983**, *16*, 1121.
161. *Official Methods of Analysis of the AOAC*, 14ª Ed., Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, **1984**, 20.202, p. 405.
162. Ref. 118, p. 118.
163. Helak, W.; Krinitz, B.; *J. Assoc. Off Anal. Chem.* **1980**, *63*, 163.
164. *Official Methods of Analysis of the AOAC*, 14ª ed., Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, **1984**, 20.204, p. 405.
165. Lasheen, A. M.; *Am. Soc. Hort. Sci.* **1961**, *77*, 135.
166. Sontag, G.; Kral, K.; *Fresenius' Z. Anal. Chem.* **1979**, *294*, 278.
167. Geissler, M.; Schffel, B.; Kuhnhardt, C.; *Anal. Chim. Acta* **1984**, *124*, 237.
168. Korbela, T.; *J. Assoc. Off Agric. Chem.* **1969**, *52*, 487.
169. Ref. 118, p. 115.
170. Koenig, H.; *Fresenius' Z. Anal. Chem.* **1971**, *255*, 123.
171. Robert, J.; *J. Assoc. Off Agric. Chem.* **1971**, *54*, 1140.
172. Heitkemper, D. T.; Jackson, D. S.; Kaine, L. A.; Mulligan, K. A.; Wolnik, K. A.; *J. Chromatogr.* **1994**, *671*, 323.
173. Leuenberger, U.; Gauch, R.; Baumgartner; *J. Chromatogr.* **1979**, *173*, 343.
174. Argoudelis, C.; *J. Chromatogr.* **1984**, *303*, 256.
175. Calull, M.; Marce, R. M.; Sanchez, G.; Borrull, F.; *J. Chromatogr.* **1992**, *607*, 339.

176. Hannisdal, A.; Z. *Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *194*, 517.
177. Lawrence, J. F.; *J. Environ. Anal. Chem.* **1990**, *38*, 115.
178. Hann, J. T.; Gilkinson, I. S.; *J. Chromatogr.* **1987**, *395*, 317.
179. Hussein, M. M.; Jacin, H.; Rodriguez, F. B.; *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 36.
180. Fix, G. L.; Pollack, J. D.; *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 1589.
181. Losada, P. P.; Lozano, J. S.; Gándara, J. S.; *Anal. Bromatol.* **1989**, *XLI-1*, 177.
182. Vianna-Soares, C. D.; Martins, J. L. S.; *Analyst* **1995**, *120*, 193.
183. Fernandez-Flores, E.; Johnson, A. R.; Leber, B.; Larry, D.; Lerner, S.; *J. Assoc. Off Anal. Chem.* **1973**, *56*, 1411.
184. Tanaka, A.; Nose, N.; Suzuki, T.; Kobayashi, S.; Watanabe, A.; *Analyst* **1977**, *102*, 367.
185. Ramappa, P. G.; Sanke Gowda, H.; *Fresenius' Z. Anal. Chem.* **1971**, *255*, 123.
186. Wahbi, A. M.; Abidine, H.; Korany, M. A.; Abdel-Hay, M. H.; *Analyst* **1978**, *103*, 876.
187. Ramappa, P. G.; Nayak, A. N.; *Analyst* **1983**, *108*, 966.
188. Thimme Gowda, A.; Made Gowda, N. M.; Rangappa, K. S.; *Anal. Lett.* **1984**, *17*, 2129.
189. Cordoba, M. H.; Garcia, I. L.; Sanchez-Pedreno, C.; *Talanta* **1985**, *32*, 325.
190. Clark, E. R.; Yacoub, E. A. K.; *Analyst* **1982**, *107*, 414.
191. Hazemoto, N.; Kamo, N.; Kobatake, Y.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1974**, *57*, 1205.
192. Chen, C.; Feng, D.; Lu, A.; Li, H.; *Huaxue Tongbao* **1985**, *13*, 533 apud *Chem. Abstr.* **1988**, *108*, 93190.
193. Zhang, G.; Fu, H.; Lin, A.; *Fenxie Huaxue* **1985**, *13*, 533, apud *Chem. Abstr.* **1985**, *103*, 205106.
194. Yang, Z.; *Zhongguo Tiaoweipin* **1985**, *4*, 26; apud *Chem. Abstr.* **1985**, *103*, 213469.
195. Feng, D.; Chen, C.; Chen, X.; *Fenxie Huaxue* **1987**, *15*, 114, apud *Chem. Abstr.* **1987**, *107*, 167855.
196. Liu, C.; Cai, Q.; Ren, Z.; *Diandu Yu Huanbao* **1987**, *7*, 21; apud *Chem. Abstr.* **1987**, *107*, 190041.
197. Yang, Z.; *Zhongguo Tiaoweipin*, **1985**, *11*, 11; apud *Chem. Abstr.* **1986**, *104*, 108013.
198. Gur'er, I. A.; Grushchina, E. A.; Senina, O. N., Patent; *Chem. Abstr.* **1984**, *104*, 183217.
199. Moges, C.; Bhagwan, S.; Bekele, T.; *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **1988**, *2*, 1; apud *Chem. Abstr.* **1989**, *110*, 6450.
200. Pungor, E.; Tóth, K.; *Anal. Chim. Acta* **1969**, *47*, 291.
201. Vyao, P. N.; Kharat, R. B.; *J. Electrochem. Soc. India* **1988**, *37*, 379.
202. Nakamura, Y.; *J. Fdhyg. Soc. Japan*, **1975**, *16*, 368; apud *Anal. Abstr.*, **1977**, *32*, 2F10.
203. Teixeira, M. F. S.; Fatibello-Filho, O.; Guaritá-Santos, A. J. M.; Calafatti, S. A., In: Anais, 16^o Reunião Anual da SBQ, Caxambú-MG, 25-29 de maio de 1993, p.QA-88.
204. Guaritá-Santos, A. J. M., Dissertação de Mestrado, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, USP, São Carlos, SP, 1993.
205. Guaritá-Santos, A. J. M.; Fatibello-Filho, O.; Nóbrega, J. A., In: Anais, 16^o Reunião Anual da SBQ, Caxambú-MG, 25-29 de maio de 1993, p.QA-89.
206. Fatibello-Filho, O.; Teixeira, M. F. S.; Guaritá-Santos, A. J. M.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **1993**, *4*, 69.
207. Fatibello-Filho, O.; Guaritá-Santos, A. J. M., *Talanta* **1993**, *40*, 737.
208. Guaritá-Santos, A. J. M.; Fatibello-Filho, O., In: Anais, 15^o Reunião Anual da SBQ, Caxambú-MG, 27-31 de maio de 1992, p.QA-60.
209. Fatibello-Filho, O.; Nóbrega, J. A.; Guaritá-Santos, A. J. M.; *Talanta* **1994**, *41*, 731.
210. Fatibello-Filho, O.; Aniceto, C., In: XI Congresso Iberoamericano de Electroquímica/ IX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica, Águas de Lindóia, 4-9 de abril de 1994, p. 465-467.

Publicação financiada pela FAPESP