

DETERMINAÇÃO DE ADITIVOS, ALDEÍDOS FURÂNICOS, AÇÚCARES E CAFEÍNA EM BEBIDAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS¹

Francisco Wendel Batista de AQUINO², Adriany G. Nascimento AMORIM², Laércio Favilla PRATA³,

Ronaldo Ferreira do NASCIMENTO^{2,*}

RESUMO

Metodologias cromatográficas foram adaptadas e validadas para a determinação dos compostos cafeína, furfural, 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF), sacarina, benzoato de sódio, glicose, frutose, ácido cítrico e ácido ascórbico em cajuínas, xaropes de guaraná, refrigerantes e sucos de fruta produzidos no Ceará. Constatou-se que 66% das cajuínas apresentam baixa qualidade por causa do processo de cozimento, enquanto que para refrigerantes 12% excederam o limite de benzoato de sódio permitido pela legislação brasileira e 29% apresentaram adição ilegal de sacarina. As metodologias foram validadas em função da precisão intralaboratorial, recuperação experimental, linearidade da curva analítica, limite de detecção e de quantificação para cada composto estudado. A precisão e recuperação de cada composto variaram de 2,85 – 8,35 (D.P.R%) e 95,1 – 105,5%, respectivamente. As curvas analíticas apresentaram linearidade satisfatória com coeficiente de correlação maior que 0,990. O limite de detecção e quantificação de cada composto foram determinados em nível de µg/L.

Palavras-chave: CLAE; aditivos; aldeídos furânicos; cafeína; alimentos.

SUMMARY

DETERMINATION OF ADDITIVES, FURANIC ALDEHYDES, SUGARS AND CAFFEINE IN BEVERAGES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC: VALIDATION OF METHODOLOGIES. In this work methodologies chromatographic have been evaluated and validated for the determination of caffeine, furfural, 5-HMF, saccharin, sodium benzoate glucose, fructose, acid citric and acid ascorbic in different food products of Ceara State, Brazil. The study has been evidenced that 66% of the cajuínas, present low quality because of the process of heating, and 12% of the soft drinks presented content of sodium benzoate above the limit tolerated by Brazilian legislation and 29% of the soft drinks illegal saccharin addition. The methodologies were validated in function of the precision, experimental recovery, linearity of the analytical curves, limit of detection and quantification for each compound studied. The precision (R.S.D%) of the determination of each compound varied of 2.85 to 8.35 % and recovery was between 95.1 to 105.5 %. The linearity of the analytical curves were satisfactory with coefficients of correlation greater than 0.990. The limit of detection and quantification of each compound were obtained in level of µg/L.

Keywords: HPLC; additives; furanic aldehydes; caffeine; food products.

1 – INTRODUÇÃO

Os aditivos, segundo a legislação brasileira [5, 7], são “substâncias intencionalmente adicionadas aos alimentos com o objetivo de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudiquem seu valor nutritivo”. Esta mesma legislação obriga os produtores a mencionarem nas embalagens de alimentos e bebidas os aditivos utilizados [5, 7] e também proíbe que os aditivos substituam a matéria-prima básica, alterem o valor nutritivo, sejam tóxicos ou mascarem falhas de fabricação. Muitos aditivos utilizados em alimentos e bebidas apresentam propriedades toxicológicas. Portanto, é dever dos órgãos competentes fiscalizar a qualidade dos alimentos industrializados para preservar a saúde dos consumidores.

No Brasil, as metodologias oficiais disponíveis para a análise de aditivos, cafeína, aldeídos furânicos, ácido ascórbico e açúcares são pouco sensíveis, pouco confiáveis, não seletivas e morosas [5,7,19,26] quando comparadas aos métodos cromatográficos [1, 2, 9, 12, 13, 14, 18,

20, 21, 22, 23, 24]. Fatores como estes as tornam obsoletas requerendo a implementação de métodos mais sensíveis, rápidos e passíveis de automação. Os métodos oficiais executados pelo laboratório vinculado ao Ministério da Agricultura e Abastecimento–Ceará para a determinação de cafeína, ácido ascórbico e açúcares são exemplos notórios da morosidade de suas metodologias [5, 7].

Tendo em vista estes problemas objetivou-se no presente trabalho uma adaptação, validação e aplicação de métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) baseados nos descritos por ARGOUDELIS [2], BORGES, FERRARI & STUTION [4], JEURING & KUPPERS [14], LEE, ROUSEFF & NAGY [15] e NISPEROS, BUSLIG & SHAW [22] para a determinação respectiva de aditivos (cafeína, benzoato, sacarina), açúcares (glicose, frutose), aldeídos furânicos (5-HMF, Furfural) e ácidos (ascórbico, cítrico) em bebidas comerciais produzidas e consumidas no Estado do Ceará e monitoramento pelo Laboratório de Análise de Bebidas e Vinagres (LABV-CE) do Ministério da Agricultura e de Abastecimento.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Material

2.1.1 – Amostragem

Foram investigados aditivos, ácidos, açúcares, aldeídos furânicos e cafeína em 24 refrigerantes, 13 cajuín-

¹ Recebido para publicação em 11/10/2001. Aceito para publicação em 06/11/2003 (000757).

² Departamento de Química Analítica e Físico Química (DQAFQ), Centro de Ciências, CEP 60451-970, Fortaleza-CE, Br. *ronaldo@ufc.br.

³ Laboratório de Análise de Bebidas e Vinagre (LABV-CE) – Ministério da Agricultura e Abastecimento – Ceará.

*A quem a correspondência deve ser enviada.

nas, 7 xaropes de guaraná e 13 sucos de fruta produzidos no Estado do Ceará, cedidos pelo LABV-CE ou coletados no comércio local.

2.1.2 – Padrões e solventes

Todos os solventes utilizados (metanol, acetona, etanol) foram de grau CLAE (Merck). Os padrões cromatográficos investigados furfural (bidestilado), 5-HMF, cafeína, sacarina benzoato de sódio (Aldrich), ácido cítrico e ácido ascórbico (Carlo Erba) foram de pureza não inferior a 95%. Todas as soluções dos padrões foram analisadas por CLAE nas mesmas condições das determinações e as impurezas não apresentaram interferências significativas para a detecção em 214nm. A água usada foi purificada pelo sistema Milli-Q.

2.1.3 – Instrumentação

Para as análises cromatográficas dos aldeídos furânicos, cafeína e dos aditivos foi utilizado um sistema isocrático CLAE VARIAN (Dynamax SD200), com um sistema de injeção manual Rheodyne com loop de 20µL, conectados a um detector Dynamax SD200 UV-1. As colunas empregadas foram uma Shimadzu Shim-pack CLC-SIL (15cm x 6,0mm D.I, partículas de 5µm) e uma Lichrospher Merck CH-18 (25cm x 4,0mm D.I; 5mm).

Para a análise dos açúcares foi utilizado um sistema isocrático CLAE da CG Analítica (480C), equipado com um detector de índice de refração (modelo 410) e uma coluna analítica CG-02-LB-sugar (25cm x 4,6mm D.I; 5µm).

Na filtragem de todas as amostras usou-se um sistema manual Hamilton, com filtros de 13mm de diâmetro e poros de 0,45µm.

2.2 – Métodos

2.2.1 – Determinação de aldeídos furânicos e cafeína

As determinações de cafeína (em xarope de guaraná), 5-HMF e furfural (em cajuína), foram realizadas empregando-se o método do padrão externo nos cinco pontos de concentrações: 1,00; 3,00; 5,00; 7,00 e 10,00mg/L para cafeína, 10,00; 30,00; 50,00; 80,00 e 100,00mg/L para 5-HMF, 0,25; 0,50; 1,50; 3,00 e 5,00mg/L para furfural. Aliquotas de 25µL de cada amostra (filtrada) foram manualmente injetadas no sistema CLAE, ao passo que as mais concentradas foram diluídas com água, na proporção conveniente (1:25), para fixar a concentração dos analitos dentro da faixa de concentração dos padrões utilizados na construção das curvas analíticas.

A separação foi realizada numa coluna Lichrospher Merck CH-18 (25cm x 4,0mm D.I; partículas de 5µm) utilizando a fase móvel de acetona:água 20:80 v/v em modo isocrático com um fluxo de 1,0mL/min e detecção a 285nm.

2.2.2 – Determinação de ácido cítrico e ascórbico

Os ácidos cítrico e ascórbico foram determinados em amostras de cajuínas em coluna C-18 empregando-

se fase móvel $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, pH 4,5, com fluxo de 0,8mL/min. A detecção foi a 214nm. As amostras foram previamente diluídas e quantificadas pelo método do padrão externo. As curvas analíticas foram construídas, em meio aquoso, nas concentrações de 6,25; 18,00; 40,00; 100,00 e 140,00mg/L para ácido cítrico, 6,25; 18,00; 40,00; 70,00 e 100,00mg/L para o ácido ascórbico.

2.2.3 – Determinação de açúcares

Os açúcares (glicose e frutose) foram determinados nas amostras de cajuínas e xaropes de guaraná empregando-se uma coluna CG-02-LB-SUGAR (25cm x 4,6mm D.I x 5µm). A temperatura do forno foi de 85°C e o fluxo da fase móvel (água) foi de 0,5mL/min. Após a detecção por índice de refração a 45°C a quantificação foi realizada por padronização externa utilizando-se concentrações de 200,00; 300,00; 500,00; 800,00 e 1200,00mg/L para glicose e frutose respectivamente.

2.2.4 – Determinação de sacarina e benzoato de sódio

Estes aditivos foram determinados em amostras de refrigerantes e sucos de fruta nas seguintes condições cromatográficas: separados em uma coluna Shimadzu CLC-SIL (15cm x 6mm D.I.; partículas de 5µm), em fase móvel isocrática de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, pH 4,5, com fluxo de 1,0mL/min e detecção a 214nm. As amostras de refrigerantes foram degaseificadas, filtradas (membrana de poros 0,45µm), diluídas e injetadas no sistema CLAE, ao passo que amostras de sucos foram centrifugadas, filtradas e diluídas antes da injeção. As curvas analíticas dos compostos analisados foram construídas, em meio aquoso, nas seguintes concentrações: 6,25; 18,00; 40,00; 70,00 e 100,00mg/L para sacarina para sacarina e 10,00; 30,00; 60,00, 180,00 e 250,00mg/L para benzoato de sódio.

2.2.5 – Validação dos métodos

As regiões de linearidade das curvas analíticas [6,16] foram determinadas avaliando-se a proporcionalidade entre a resposta do detector e a concentração dos padrões aquosos (10 pontos) nas seguintes faixas: 0,25 – 150,00mg/L para furfural, 5-HMF e cafeína; 5,00-200,00mg/mL para ácido cítrico, ácido ascórbico e sacarina; 10,00 – 250,00mg/mL para benzoato de sódio e 100,00 – 1500,00mg/L para glicose e frutose. As curvas analíticas foram construídas, plotando-se área do pico dos compostos *versus* concentração, utilizando-se cinco pontos de cada solução padrão nas faixas concentrações descritas anteriormente em métodos.

A precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) das medidas quantitativas dos analitos [6,8,16] foi determinada pelo cálculo do desvio padrão relativo (D.P.R%) após a injeção no sistema CLAE (em duplicatas) de 5 amostras de uma mesma marca de cajuína, xarope de guaraná e refrigerante durante dois dias consecutivos. A exatidão do método (percentagem de recuperação) [6, 8, 16] foi determinada fortificando-se com quantidades conhecidas de furfural (50,00mg/L), 5-HMF (5,00mg/L),

ácido cítrico (2,0g/L), ácido ascórbico (20,00mg/L), glicose (100,00g/L) e frutose (100,00g/L) em amostras de cajuína; cafeína (5,00mg/L) em xarope de guaraná; sacarina (6,00mg/L) e benzoato de sódio (45,00mg/L) em amostras de refrigerante. As percentagens de recuperações foram determinadas usando a equação [6,25]:

$$R = \frac{\text{Concentração do analito na amostra}}{\text{Concentração do analito na amostra fortificada}} \times 100$$

O limite de detecção (LD), menor quantidade de analito detectável sem interferência do ruído, foi determinado e medido-se através da análise de soluções contendo concentrações decrescentes (0,50–0,05 µg/L) do analito até o menor nível determinável (relação sinal:ruído 3:1) com precisão e exatidão aceitáveis [6,16], empregando-se a equação:

$$LD = \frac{3xDP}{b}$$

O limite de quantificação (LQ), menor quantidade de analito quantificada com precisão e exatidão, foi estabelecido através da análise de soluções contendo concentrações decrescentes (0,50–0,050mg/L) do analito até o menor nível determinável usando-se a equação [6,16].

$$LQ = \frac{10xDP}{b}$$

onde: DP = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de várias curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao limite de quantificação e b = inclinação da curva de calibração ($y = a + b.X$).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Validação das metodologias

3.1.1 - Curvas analíticas

As curvas analíticas, obtidas por regressão linear (área do pico *versus* concentração do padrão), utilizando-se cinco pontos de concentrações de cada padrão (descritos anteriormente em métodos) apresentaram boa linearidade. A maioria dos valores dos coeficientes de correlação (r) de cada equação da reta esteve acima de 0,990 (Tabela 1), possibilitando desta forma a quantificação dos analitos pelo método do padrão do externo.

TABELA 1: Características analíticas dos métodos: coeficientes de correlação, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

| Composto | r* | LD (mg/L) | LQ (mg/L) |
|-------------------|-------|-----------|-----------|
| Cafeína | 0,999 | 0,10 | 0,32 |
| Furfural | 0,999 | 0,11 | 0,35 |
| 5-HMF | 0,998 | 0,12 | 0,37 |
| Glicose | 0,994 | 50,00 | - |
| Frutose | 0,995 | 50,00 | - |
| Ác. Cítrico | 0,999 | 0,25 | 0,72 |
| Ác. Ascórbico | 0,999 | 0,25 | 0,78 |
| Sacarina | 0,999 | 0,20 | 0,75 |
| Benzoato de sódio | 0,999 | 0,25 | 1,00 |

*Coeficiente de correlação obtido a partir da equação da reta ($y = a + bx$)

3.1.2 - Estudo da precisão

Os valores dos desvios padrões relativos (D.P.R, %) obtidos das medidas de 5-HMF, furfural, glicose, frutose, ácido cítrico, ácido ascórbico, cafeína, sacarina e benzoato (Tabela 2) foram entre 2,85% e 8,35% estes valores indicam uma precisão aceitável para a validação de um método analítico, uma vez que, valores em torno de $\pm 15\%$ são considerados admissíveis de acordo com a literatura [6,8,25].

TABELA 2. Precisão e desvio padrão das determinações dos compostos estudados.

| Composto | Reprodutibilidade | | |
|-------------------|-----------------------|-------------|-----------|
| | X (mg/L) ⁿ | D.P | D.P.R (%) |
| 5-HMF | 240,00 | $\pm 17,10$ | 7,12 |
| 2-Furfural | 18,80 | $\pm 1,57$ | 8,35 |
| Cafeína | 182,00 | $\pm 12,00$ | 6,60 |
| Ácido cítrico | 25,20 | $\pm 0,72$ | 2,85 |
| Glicose | 58,00 | $\pm 2,00$ | 3,44 |
| Frutose | 54,00 | $\pm 3,00$ | 5,55 |
| Ácido ascórbico | 26,90 | $\pm 0,80$ | 2,97 |
| Sacarina | 12,20 | $\pm 0,75$ | 6,14 |
| Benzoato de sódio | 78,90 | $\pm 4,72$ | 5,98 |

n = média de 10 determinações.

D.P = Desvio padrão

D.P.R = Desvio padrão relativo

3.1.3 - Estudo da recuperação

No estudo da exatidão dos métodos (Tabela 3) obtiveram-se recuperações na faixa de 95,1 – 100,3% para os compostos adicionados na cajuína (5-HMF, furfural, ácido cítrico, ácido ascórbico, glicose e frutose), enquanto que a recuperação do teor de cafeína adicionado na amostra de xarope de guaraná foi 101,1%. As recuperações para o benzoato e sacarina adicionados em amostras de refrigerantes foram, respectivamente, de 99,0% e 105,5%. Estes resultados indicam que as metodologias utilizadas têm exatidões confiáveis, uma vez que a região de recuperação entre 80,0 e 110,0% é considerada aceitável em estudos de validação de um método [6, 8, 16, 25].

TABELA 3. Variação da percentagem de recuperação de aldeídos, ácidos, açúcares, sacarina e benzoato em cajuína, xarope de guaraná e refrigerante.

| Amostra | Composto | Teor na amostra | Teor adicionado | Teor encontrado | R |
|-------------------|----------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------|
| Cajuína | 5-HMF (mg/L) | 48,00 \pm 3,2 | 50,00 | 98,2 | 100,2 |
| Cajuína | Furfural (mg/L) | 3,20 \pm 0,10 | 5,00 | 7,80 | 95,1 |
| Xarope de guaraná | Cafeína (mg/L) | 3,60 \pm 0,20 | 5,00 | 8,70 | 101,1 |
| Cajuína | Ác. Cítrico (g/L) | 2,52 \pm 0,70 | 2,00 | 4,32 | 95,5 |
| Cajuína | Ác. Ascórbico (mg/L) | 26,9 \pm 0,08 | 20,00 | 47,00 | 100,2 |
| Cajuína | Glicose (g/L) | 58,00 \pm 2,00 | 100,00 | 160,00 | 100,3 |
| Cajuína | Frutose (g/L) | 54,00 \pm 5,00 | 100,00 | 152,00 | 98,7 |
| Refrigerante | Sacarina (mg/L) | 13,70 \pm 0,09 | 6,00 | 19,50 | 99,0 |
| Refrigerante | Benzoato (mg/L) | 81,90 \pm 1,15 | 45,00 | 134,00 | 105,5 |

R = percentagem de recuperações em 5 determinações.

3.1.4 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

Os limites de detecção e quantificação, estimados por diluições sucessivas de uma solução padrão de cada analito [6,8,16,25], uma vez que não foi possível obter uma amostra isenta dos analitos avaliados, encontram-se na região de 0,10 – 50,00mg/L para os diferentes compostos estudados (levando-se em consideração a rela-

ção sinal-ruído 3:1). O limite de quantificação obtido para os mesmos foi na faixa de 0,32 – 1,00 mg/L (*Tabela 1*). Estes resultados aliados a uma elevada sensibilidade, seletividade e rapidez da análise (10 minutos) credenciaram os métodos como uma poderosa ferramenta a serviço de laboratórios de controle de qualidade.

3.2 – Determinações cromatográficas

3.2.1 – Aldeídos furânicos e cafeína em xarope de guaraná.

A separação cromatográfica da mistura dos padrões (50mg/L), selecionados em virtude da relevância como indicadores de qualidade do produto e do potencial toxicológico, e de uma amostra de cajuína está representada na *Figura 1*. Observa-se que a separação total dos componentes ocorre em torno de 8min. Este tempo de corrida é muito próximo dos obtidos por outros pesquisadores [2, 14, 20, 26], a vantagem neste caso é que a separação dos três componentes ocorre numa única corrida cromatográfica.

A determinação de cafeína é um importante parâmetro empregado no controle de qualidade da produção de xarope de guaraná. Os resultados da aplicabilidade do método CLAE –fase reversa na determinação simultânea de cafeína, 5-hidroxi metilfurfural (5-HMF) e furfural em amostras de xarope de guaraná são apresentados na *Tabela 4*. O tratamento dos dados quantitativos forneceu uma larga faixa de variação na concentração desses compostos analisados: 25,80 – 657,00mg/100mL para o 5-HMF; 0,45 – 3,15mg/100mL para o furfural e 0,72 – 86,39mg/100mL para a cafeína, estes dados indicam uma elevada dispersão em relação à quantidade de 5-HMF, provavelmente devido à adição indiscriminada de açúcar, e de cafeína na composição de cada xarope, provavelmente em virtude da má qualidade da matéria-prima. Por outro lado, os níveis de concentração de cafeína nos xaropes encontram-se na mesma ordem de grandeza dos obtidos em bebidas carbonatadas [2] e produtos alimentares [18], ao passo que os teores de aldeídos furânicos foram comparáveis aos obtidos em mel [14], sucos de cítricos [15] e extrato de tomate [26].

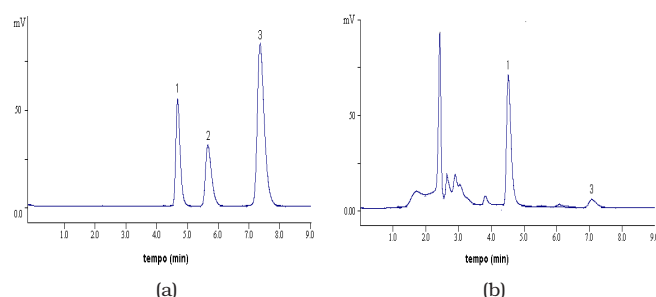


FIGURA 1. Cromatograma de uma solução padrão 50mg/L (a) e amostra de cajuína (b), analisadas em uma coluna analítica -Lichrospher Merck CH-18 (25cm x 4,0mm D.I; 5mm) em fase móvel isocrática água-acetonitrila (80:20% v/v) a um fluxo de 1,0mL/min e detecção a 285nm. Identificação: 1 = 5-hidroxi metil furfural (5-HMF), 2 = cafeína, 3 = furfural.

3.2.2 – Aldeídos furânicos, ácidos e açúcares em amostras de cajuínas

De acordo com os resultados obtidos para os aldeídos furânicos em amostras de cajuínas (*Tabela 4*), foi observado que o teor médio de 5-HMF 27,49mg/100mL é muito maior que o de furfural 1,07mg/100mL. Após a observação do perfil quantitativo dos aldeídos nas amostras de cajuínas (*Figura 2*) foi verificado que a concentração média de 5-HMF (46,50mg/100mL) nas amostras de cajuínas de cor escura é muito maior que as cajuínas claras (16,16mg/100mL) possivelmente em virtude do elevado e ou prolongado tempo de aquecimento destas bebidas durante a etapa de cozimento [1]. Este resultado foi de acordo com o esperado, uma vez que os estudos indicam que a degradação térmica das hexoses em alimentos é um dos processos que mais contribui para formação do 5-HMF [14, 15, 20, 26].

Da classe de acidulantes, os ácidos, ascórbico e cítrico são usados em bebidas para dar o sabor ácido, imitando o gosto das frutas, mas também atuam como conservantes [7]. Os resultados obtidos das análises dos referidos ácidos, por CLAE com fase reversa (C-18), em amostras comerciais de cajuínas são apresentados na *Tabela 4*. A concentração mínima permitida pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento [5, 7] para ácido cítrico em cajuína é de 0,25g/100mL. As amostras investigadas apresentaram teores que variaram de 0,40 a 0,84g/100mL indicando normalidade por parte deste composto, uma vez que a quantidade adicionada, acima da mínima, fica a critério de cada fabricante.

Em relação ao ácido ascórbico, quatro amostras apresentaram concentrações inferiores ao que é permitido pela legislação em vigor, que estabelece um mínimo de 60,00mg/100mL amostra. Os teores médios de ácido cítrico e ascórbico encontrados nas cajuínas (*Tabela 4*) estão na mesma ordem de grandeza em relação aos encontrados para outros tipos de bebidas e produtos alimentares (refrigerantes, sucos de frutas, frutas, vegetais, etc.) [12, 13, 17, 22, 27].

Os cromatogramas ilustrados pelas *Figuras 3a e 3b* mostram uma típica separação dos padrões e de uma amostra de cajuína.

Os teores de frutose e glicose são parâmetros importantes no controle de qualidade do processamento de bebidas [3,11]. Os açúcares quantificados são listados na *Tabela 4*, observa-se que em nenhuma amostra foi detectada sacarose, provavelmente devido ao processo de inversão (transformação de sacarose em glicose e frutose) em meio ácido, favorecido pela elevação da temperatura [3]. Os teores de açúcar total nas amostras variaram de 5,25 a 12,03g/100mL, não ultrapassando portanto a faixa permitida que é 5,00 – 15,00g/100mL [5]. Estes resultados aliados à ausência de sacarose, normalmente adicionada após a diluição, indicam que as amostras de cajuínas estudadas provavelmente não foram diluídas em água.

TABELA 4. Resultados da análise quantitativa de furfural, 5-HMF, cafeína, ácidos e açúcares nos xaropes de guaraná e cajuínas comerciais.

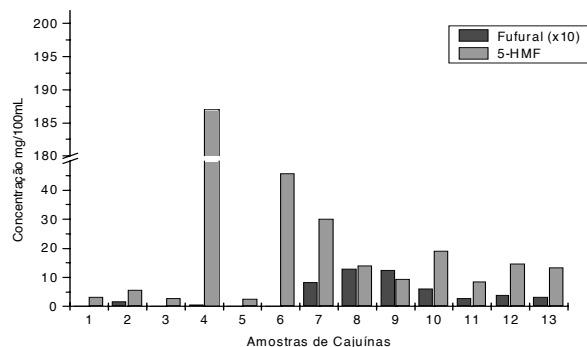
| Amostras | 5-HMF (mg/100mL) | 2-furfural (mg/100mL) | cafeína (mg/100mL) | Ac. cítrico (g/100mL) | Ac. ascórbico (mg/100mL) | Frutose (g/100mL) | Glicose (g/100mL) | Açúcar total (g/100mL) | |
|-------------------|------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|------------------------|-------|
| Xarope de Guaraná | 1 | 30,40 | 1,50 | 15,04 | - | - | 6,86 | 5,63 | 12,49 |
| | 2 | 657,00 | 2,75 | 86,40 | - | - | 7,54 | 6,31 | 13,85 |
| | 3 | 223,00 | 0,56 | <L.D | - | - | 6,40 | 5,59 | 11,99 |
| | 4 | 25,80 | 0,45 | 61,60 | - | - | 4,86 | 4,13 | 8,99 |
| | 5 | 78,40 | 0,71 | 0,72 | - | - | 3,54 | 3,00 | 6,54 |
| | 6 | 510,00 | 3,15 | 7,25 | - | - | 3,72 | 3,13 | 6,85 |
| | 7 | 290,00 | 1,35 | 21,10 | - | - | 2,63 | 2,45 | 5,08 |
| Cajuína | 8 | 3,43 | 2,75 | - | - | - | - | - | - |
| | 9 | 5,85 | 0,56 | - | - | - | - | - | - |
| | 10 | 3,11 | 0,45 | - | - | - | - | - | - |
| | 11 | 187,00 | 0,71 | - | 0,40 | 29,97 | 3,57 | 4,36 | 7,93 |
| | 12 | 2,64 | 3,15 | - | 0,56 | 83,35 | 4,36 | 4,99 | 9,35 |
| | 13 | 45,80 | 1,35 | - | 0,29 | 26,61 | 4,20 | 5,00 | 9,20 |
| | 14 | 30,11 | 0,82 | - | 0,35 | 4,25 | 3,89 | 4,67 | 8,56 |
| | 15 | 14,10 | 1,29 | - | 0,64 | 56,01 | 2,47 | 2,78 | 5,25 |
| | 16 | 9,59 | 1,25 | - | 0,43 | 11,82 | 5,78 | 6,25 | 12,03 |
| | 17 | 18,90 | 0,60 | - | 0,65 | 64,93 | 4,36 | 5,37 | 9,73 |
| | 18 | 8,81 | 0,30 | - | 0,84 | 9,73 | 3,86 | 4,87 | 8,73 |
| | 19 | 14,60 | 0,41 | - | 0,51 | 72,22 | 2,35 | 2,85 | 5,20 |
| | 20 | 13,50 | 0,33 | - | - | - | 3,86 | 4,87 | 8,73 |

Valores médios de duplicatas

L.D = limite de detecção

- Não investigado

*Legislação do Ministério Agricultura e Abastecimento

**FIGURA 2.** Teores de 5-HMF e 2-furfural (x10) em cajuínas comerciais.

3.2.3 – Sacarina, benzoato de sódio e cafeína em amostras de refrigerantes e sucos de fruta

Os aditivos sacarina, benzoato e cafeína possuem a função de melhorar o sabor e conservar os produtos. O limite estabelecido pela legislação brasileira em vigor [5, 7] é de no máximo 50 mg/100mL e 100mg/100mL para benzoato de sódio em refrigerante e suco de fruta, respectivamente. Em relação à sacarina não é permitida a adição da mesma em refrigerantes não dietéticos. A cafeína, por apresentar propriedades estimulantes, pode ser adicionada em refrigerantes. O teor mínimo de cafeína permitido é de 0,6mg/100mL (refrigerantes tipo guaraná) e máximo de 20,0mg/100mL (refrigeran-

tes tipo cola) [5, 7]. Os resultados quantitativos obtidos em refrigerantes e sucos de fruta via CLAE – fase normal são apresentados na Tabela 5. Observa-se que a faixa de concentração para benzoato de sódio situa-se entre LD e 91,85mg/100mL, e que apenas três amostras de refrigerantes apresentaram teores de benzoato de sódio acima do normal. Constatou-se também que sete amostras de refrigerantes são ilegais, segundo a legislação vigente [5, 7], por conterem teor de sacarina. Os refrigerantes do “tipo cola” apresentaram níveis de concentração de cafeína (LD – 12,50mg/100mL) dentro das normas, ao passo que quatro amostras de refrigerantes “tipo guaraná” apresentaram teor de cafeína (0,27 – 3,04mg/100mL) inferior ao mínimo permitido (0,60mg/100mL) pela legislação [5, 7].

Em relação à análise destes aditivos nos sucos de fruta (Tabela 5) não foram observadas irregularidades nos produtos. O limite de 100mg/100mL para benzoato de sódio exigido pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento foi respeitado pelos fabricantes. De acordo com estes resultados quantitativos verifica-se que os mesmos estão na mesma ordem de grandeza dos encontrados para outras marcas de bebidas, refrigerantes, vegetais fermentados, conservas, molhos de tomate e soja [2, 10, 21, 22].

A separação cromatográfica dos padrões de aditivos estudados foi muito eficiente e rápida (10min). Os cromatogramas ilustrados nas Figuras 3a e 3b mostram a eficiente separação dos padrões de benzato e sacari-

na (via CLAE – fase normal), bem como numa amostra de refrigerante.

TABELA 5. Teores médios de cafeína, sacarina sódica e benzoato de sódio em refrigerantes e sucos de fruta.

| Amostras | Cafeína (mg/100 mL) | Sacarina (mg/100 mL) | Benzoato (mg/100 mL) |
|-----------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1* | 0,84 | < LD | 34,57 |
| 2* | 7,61 | < LD | 46,00 |
| 3* | 8,62 | < LD | 32,91 |
| 4* | 4,51 | 8,56 | 25,68 |
| 5* | 1,21 | < LD | 26,12 |
| 6* | 12,50 | < LD | 25,77 |
| 7 ^a | < LD | < LD | 6,97 |
| 8* | 7,91 | < LD | < LD |
| 9 [#] | 0,93 | < LD | 17,63 |
| 10* | 0,78 | < LD | 33,58 |
| 11* | 0,27 | 11,93 | 41,73 |
| 12* | 0,33 | < LD | 26,80 |
| 13* | 0,44 | < LD | 42,64 |
| 14* | 0,91 | < LD | 35,94 |
| 15* | 1,17 | < LD | 21,66 |
| 16* | 3,04 | < LD | 42,34 |
| 17* | 1,14 | < LD | 40,19 |
| 18* | 0,52 | < LD | 35,11 |
| 19 [#] | < LD | 11,89 | 91,85 |
| 20 [#] | < LD | 11,93 | 64,41 |
| 21 [#] | < LD | 5,73 | 45,10 |
| 22 [#] | < LD | 11,10 | 32,75 |
| 23 [#] | < LD | < LD | 60,50 |
| 24 [#] | < LD | 12,67 | 33,06 |
| 25 | - | - | 80,15 |
| 26 | - | - | 50,00 |
| 27 | - | - | 61,00 |
| 28 | - | - | 20,20 |
| 29 | - | - | 42,11 |
| 30 | - | - | 56,00 |
| 31 | - | - | 47,91 |
| 32 | - | - | 61,60 |
| 33 | - | - | 29,40 |
| 34 | - | - | 100,00 |
| 35 | - | - | 28,40 |
| 36 | - | - | 38,60 |
| 37 | - | - | 63,90 |

Análises em duplicata
L.D = limite de detecção
* tipo cola
^a tipo guarana
outros tipos (laranja, caju)

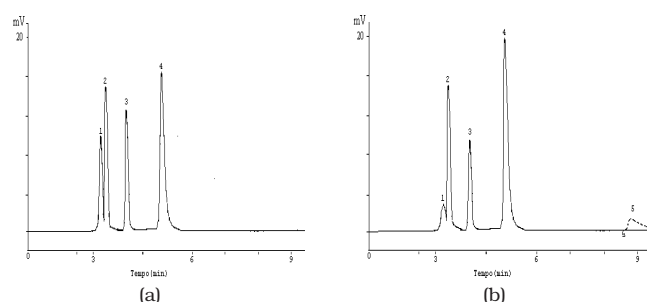


FIGURA 3. Cromatograma de uma solução padrão 50mg/L (a) e de uma amostra de refrigerante (b) analisados em uma coluna CLC-SIL (15cm x 6mm; 5 μ m); eluídos em fase móvel de tampão fosfato de amônia dibásico (pH4,5), com velocidade de fluxo 0,8mL/min e detecção monitorada a 214nm. 1= ácido cítrico, 2 = ácido ascórbico, 3 = sacarina, 4 = benzoato de sódio.

4 – CONCLUSÕES

Os métodos cromatográficos padronizados para a determinação de cafeína, furfural, 5-HMF, glicose, frutose, sacarina, ácido cítrico e ácido ascórbico, em

cajuína, refrigerantes, sucos de fruta e xaropes de guaraná apresentaram linearidade, curva de calibração, precisão, exatidão, limites de detecção, limite de quantificação e tempo de análise satisfatórios, credenciando-os para a execução pelo LABV-CE, e possibilitando desta forma, uma fiscalização mais rigorosa e eficiente de bebidas industrializadas no Estado do Ceará.

Constatou-se nas determinações que 66% das cajuínas produzidas no Estado do Ceará apresentam baixo teor de ácido ascórbico, devido à falta de padronização no processo de cozimento. Dos refrigerantes analisados 12% apresentaram teores de benzoato acima do valor permitido, 29% contém sacarina, o que os tornaram ilegais perante a legislação em vigor e 40% dos refrigerantes de guaraná encontraram-se com o teor de cafeína abaixo do mínimo exigido legalmente. Quanto aos Xaropes de Guaraná apenas uma amostra foi reprovada em função da ausência de cafeína. Com relação aos sucos de fruta, nenhuma amostra excedeu o limite para benzoato ou apresentou compostos não permitidos.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AQUINO, F.W.B.; PRATA, L.F.; VARGAS, M.E.S.; NASCIMENTO, R.F. Determinação do perfil de aldeídos furânicos via HPLC em cajuínas. **XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, agosto/ 2000. Fortaleza-CE
- [2] ARGOUDELIS C.J. Isocratic liquid chromatography method for the simultaneous determination of aspartame and other additives in soft drinks. **J. Chromatogr.**, v. 303, p. 1256-262, 1984.
- [3] BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P.A. 1995. Introdução à Química de Alimentos. p11-70, Livraria Varela, Brasil.
- [4] BORGES, M.T.M.R.; FERRARI, S.E.; STUTION, A.C. Cromatografia Líquida de alta Eficiência na Análise de Açúcares – Um Estudo Preliminar. **STAB**, v. 38, 1984.
- [5] BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria 544. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 de novembro de 1998.
- [6] BRENDOLAN, G. **Validação de Métodos Cromatográficos**. (Ed.) Explolabor e Isolabro Consultoria e Treinamento. Pedreira, 2000. 72p. Apostila., SGB Consultoria Química Ltda.
- [7] www.bevtech.com.br
- [8] CAULCUTT, R.; BODDY, R. 1994. **Statistics for Analytical Chemists**. Chapman & Hall, London.
- [9] GAMIZ, G. L.; CASTRO, L.M.D. A HPLC Method for the Determination of Vitamin B1, Caffeine, Acetylsalicylic Acid, and the Impurities of Salicylic Acid in a Pharmaceutical Preparation, **J. liquid Chromatogr. & Related Techn.**, v. 20, p. 2123, 1997.
- [10] HAMANO, T.; MITSUHASHI, Y.; AOKI, N.; SEMMA, M.; ITO Y. Enzymic method for the spectrophotometric determination of benzoic acid in soy sauce and pickles. **Analyst.**, v. 122, p. 259-262, 1997.
- [11] HENDERSON, S.K.; FENN, C.A; DOMIJAN, J.D. Determination of sugar content in commercial beverages by density – A novel experiment for general chemistry courses. **J. Chemical Education.**, v. 75, p.1122-1123, 1998.
- [12] IWASE, H.; ONO, I. Determination of ascorbic acid in food by column liquid chromatography with

- electrochemical detection using eluent for pre-run sample stabilization. **J. Chromatogr.**, v. 806, p. 361-364, 1998.
- [13] IWASE, H. Use of an amino acid in the mobile phase for the determination of ascorbic acid in food by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **J. Chromatogr.**, v. 881, p. 317-326, 2000.
- [14] JEURING, H.J.; KUPPERS, F.E.M. High Performance liquid Chromatography of Furfural and Hydroxymethylfurfural in Spirits and Honey. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 63, p. 1215, 1980.
- [15] LEE, H.S.; ROUSEFF, R.L.; NAGY, S. HPLC determination of furfural and 5-hydroxymethylfurfural in citrus juices. **J. Food Sci.**, v. 51, p. 1075-1076, 1986.
- [16] LEITE, F. 1996. **Validação em Análise Química**. Editora Átomo.
- [17] LUQUE-PEREZ, E.; RIOS A.V.L.M. Flow-injection spectrophotometric determination of citric acid in beverages based on a photochemical reaction. **Analytica Chimica Acta.**, v. 366, p. 231-240, 1998.
- [18] MUHTADI, F.J.; EL-HAWARY, S.S.; HIFNAWY, M.S. Comparative HPLC and GLC determination of caffeine in different food products. **J. Liquid Chromatogr.**, v. 13, p. 1029, 1990.
- [19] NASCIMENTO, R.F.; CERRONI, J.L.; CARDOSO, D.R.; LIMA NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Comparação dos Métodos Oficiais de Análise e Métodos Cromatográficos para a Determinação dos Teores de Aldeídos e Ácidos Carboxílicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 18, p. 350, 1998.
- [20] NASCIMENTO, R.F.; CUNHA, J.M.; DE KEUKELEIRE, D.; LIMA NETO, B.S.; FRANCO, W.F. Qualitative and Quantitative High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Aldehydes in Brazilian Sugar Cane Spirits and Other Distilled Alcoholic Beverages. **J. Chromatogr.**, v. 13, p. 782, 1997.
- [21] NAKAIE, Y.; YOGI, T.; KAKEHI, K.; INOUE, D.; HIROSE H.; HASHIMOTO S.; TONOGAI Y. Simultaneous and simple determination of saccharin and acesulfame K in foods by GC-NPD. **J. Food Hygienic Society of Japan.**, v. 40, p. 223-229, 1999.
- [22] NISPEROS, C.M., BUSLIG, B.S., SHAW, P.E., Simultaneous Detection of Dehydroascorbic, Ascorbic, and Some Organic Acids in Fruits and Vegetables by HPLC. **J. Agricultural Food Chem.**, v. 40, p. 1127, 1992.
- [23] NOJIRI, S.; SAITO, K.; TAGUCHI, N.; OISHI, M.; MAKI, T. Liquid chromatographic determination of sugar alcohols in beverages and foods after nitrobenzoylation. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 82, p. 134-140, 1999.
- [24] PESEK, J.J.; MATYSKA, M.T. Determination of aspartame by high-performance capillary electrophoresis. **J. Chromatogr.**, v. 781, p. 423-428, 1997.
- [25] PINTO, G.M.F.; JARDIM, I.C.S.F. Use of solid-phase extraction and high - performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method. **J. Chromatogr.**, v. 869, p. 463-469, 2000.
- [26] PORRETTA, S.; SANDEI, L. Determination of 5-(Hydroxymethyl)-2-Furfural (HMF) in tomato Products: Proposal of a rapid HPLC method and its comparison with the colorimetric method. **Food Chemistry.**, v. 39, p. 51-57, 1991.
- [27] PRODROMIDIS, M.I.; TZOUWARA KARAYANNI, S.M.; KARAYANNIS, M.I.; VADGAMA, P.M. Bioelectrochemical determination of citric acid in real samples using a fully automated flow injection manifold. **Analyst.**, v. 122, p. 1101-1106, 1997.

6 - AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e FUNCAP pelo apoio financeiro.