



Miguel José Domingos Basílio

ACESSULFAME DE POTÁSSIO, SACARINA E ASPÁRTAMO EM BEBIDAS: OCORRÊNCIA E AVALIAÇÃO DO RISCO

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Celeste Matos Lino e co-orientada pela Professora Doutora Angelina Pena e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Junho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**UNIVERSIDADE DE COIMBRA
FACULDADE DE FARMÁCIA**



ACESSULFAME DE POTÁSSIO, SACARINA E ASPÁRTAMO EM BEBIDAS: OCORRÊNCIA E AVALIAÇÃO DO RISCO

Miguel José Domingos Basílio

(Licenciado em Bioquímica)

Trabalho final de Mestrado para obtenção do grau:

Mestre em Segurança Alimentar

(Documento final)

Orientação: Prof. Doutora Celeste Matos Lino

Co – orientação: Prof. Doutora Angelina Pena

MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

2017/2018

“A smooth sea never made a skilled sailor.”

Franklin D. Roosevelt

RESUMO

A separação e quantificação dos edulcorantes em estudo foram realizadas por HPLC recorrendo a uma coluna C18 (5 μ m, 250 x 4.6 mm), a um fluxo de 0,700 mL/min, utilizando uma fase móvel tamponada constituída por KH₂PO₄ 0.05 M / ACN (85:15), com adição de ácido fosfórico (20 %) de modo a manter o pH a 4,2 – 4,4. A deteção foi efetuada por ultravioleta a um comprimento de onda de 254 nm. O método do padrão externo permitiu quantificar os edulcorantes nas amostras.

O presente estudo apresenta como principal objetivo a determinação das concentrações dos edulcorantes acessulfame – K, sacarina e aspártamo em 56 amostras de matrizes líquidas diferentes que foram adquiridas no centro de Portugal, de modo a verificar se de facto as doses máximas de utilização (DMU) estabelecidas pelo Decreto-Lei n.º 394/98 são respeitadas (350 mg/L para o ACE – K, 100 mg/L ou 80 mg/L consoante as bebidas sejam ou não adicionadas com dióxido de carbono para a SAC e 600 mg/L para o ASP).

Para validação da metodologia analítica, para além da determinação dos coeficientes de regressão linear (R^2), foram também avaliadas a exatidão, a precisão intra-dia e inter-dia. Os limites de deteção (LODs) e os limites de quantificação (LOQs) determinados foram de 9,55 e 28,94 mg/L para o ACE-K, 6,86 e 20,77 mg/L para a SAC e 59,86 e 181,30 mg/L para o ASP.

Considerando a análise dos edulcorantes nas amostras, o ACE – K revelou estar presente em 49 das matrizes, surgindo em 100 % das amostras de bebidas desportivas, bebidas energéticas e néctares, em 90 % dos refrigerantes à base de extratos de chás, em 89 % dos refrigerantes tradicionais e em uma amostra de refrigerantes à base de águas minerais, com uma concentração média de 21,89, 202,59, 164,14, 62,55 e 85,29 mg/L, respetivamente. O ASP surgiu em 62,5 % das matrizes analisadas, apresentando uma concentração média de 69,215 mg/L em refrigerantes à base de extratos de chá, 87,82 mg/L em refrigerantes tradicionais, 116,19 mg/L em néctares, 129,33 mg/L em refrigerantes à base de águas minerais e 478,84 mg/L em bebidas energéticas, estando totalmente ausente de bebidas desportivas. A SAC também não foi detetada em bebidas desportivas e em bebidas energéticas, sendo de entre os edulcorantes estudados o menos frequentemente utilizada estando apenas presente em 20 das amostras em estudo, com uma concentração média de

57,27 mg/L em refrigerantes tradicionais, 53,55 mg/L em néctares e 44,31 mg/L em refrigerantes à base de extratos de chás.

De acordo com a legislação portuguesa e da União Europeia, a DMU permitida para o ACE – K foi excedida numa amostra de néctar (641,48 mg/L) e no caso do ASP também se verificou que uma amostra de bebida energética excedeu a DMU (679,8 mg/L). Embora menos frequentemente utilizada, observaram-se três situações em refrigerantes à base de extratos de chá (80,5, 101,76 e 82,69 mg/L) e uma em néctares (93,68 mg/L) em que as concentrações de SAC ultrapassaram o estabelecido pela legislação.

A ingestão diária estimada (EDI) do ACE – K, da SAC e do ASP para o consumidor português adulto revelou estar bem abaixo da ingestão diária aceitável (ADI). Das seis distintas categorias de amostras analisadas, os refrigerantes tradicionais são responsáveis pela maior EDI do ACE – K e do ASP, 0,14 e 0,12 mg/kg p.c./dia, o que representa 0,911 % e 0,29 % da ADI, respetivamente. Os refrigerantes à base de extratos de chá refletem uma EDI de 0,24 mg/kg p.c./dia para a SAC correspondendo a 9,76 % da ADI, sendo a maior fonte deste edulcorante nas diferentes categorias de bebidas analisadas.

Palavras-chave: acessulfame-k (ACE – K), aspártamo (ASP), bebidas desportivas, bebidas energéticas, edulcorantes, ingestão diária estimada (EDI), população portuguesa, refrigerantes à base de águas minerais, refrigerantes à base de extratos de chá, refrigerantes tradicionais, sacarina (SAC), néctares.

ABSTRACT

Separation and quantification of the sweeteners were performed by HPLC using a C18 column (5 μm , 250 x 4.6 mm) at a flow rate of 0.700 mL/min using a buffered mobile phase consisting of KH_2PO_4 0.05 M / ACN (85:15), with addition of phosphoric acid (20 %) in order to maintain the pH at 4.2-4.4. Detection was made at a wavelength of 254 nm. The external standard method was used for the quantification.

The main objective of the present study was to evaluate the concentrations of the sweeteners acesulfame – K, saccharin and aspartame in 56 samples of different liquid matrices purchased in the central zone of Portugal, in order to verify if the maximum levels of use (DMU) are in accordance with the Decree-Law no. 394/98 (350 mg/L for ACE – K, 80 mg/L and for beverages containing carbonic acid, the dose is 100 mg/L for SAC and 600 mg/L for ASP).

To validate the analytical methodology, in addition to the determination of linear regression coefficients (R^2), were also evaluated the accuracy, intra-day and inter-day precision. The limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) were 9.55 and 28.94 mg/L for ACE-K, 6.86 and 20.77 mg/L for SAC and 59, 86 and 181.30 mg/L for ASP.

Considering the sweeteners analysis in the samples, ACE – K was present in 49 of the analysed beverages, being 100 % of sports drinks, energy drinks and nectars, 90 % of tea-based soft drinks, 89 % of traditional soft drinks and in one sample of soft drinks based on mineral water, with a mean concentration of 21.89, 202.59, 164.14, 62.55 and 85.29 mg/L, respectively. The ASP was detected in 62.5 % of the analyzed matrices, with an average concentration of 69.215 mg/L in soft drinks based on tea extracts, 87.82 mg/L in traditional soft drinks, 116.19 mg/L in nectars, 129.33 mg/L in soft drinks based on mineral waters and 478.84 mg/L in energetic drinks. In sport drinks, ASP was not detected. SAC was not detected in sport drinks and energy drinks, and was also less frequently used, being present only in 20 of the samples under study, with a mean concentration of 57.27 mg/L in traditional sport drinks, 53.55 mg/L in nectars and 44.31 mg/L in soft drinks based on tea extracts.

According to Portuguese and European Union legislation, the maximum allowable dose for ACE – K was exceeded in a nectar sample (641.48 mg/L) and in the case of ASP there was also a sample of energy drink that exceeded DMU (679.8 mg/L). Although less frequently

used, three situations were observed in soft drinks based on tea extracts (80.5, 101.76 and 82.69 mg/L) and one in nectars (93.68 mg/L) in which the concentrations of SAC exceeded the recommended level.

The estimated daily intake (EDI) of ACE – K, SAC and ASP for the Portuguese adult population was found to be well below the acceptable daily intake (ADI). Of the six different categories of analyzed samples, traditional soft drinks account for the highest EDI of ACE-K and ASP, with 0.14 and 0.12 mg / kg bw / day, which represents 0.911 % and 0.29 % of ADI , respectively. Soft drinks based on tea extracts showed an EDI of 0.24 mg / kg bw / day for SAC corresponding to 9.76 % of ADI, being the largest source of this sweetener in the different categories of the analyzed beverages.

Key words: acesulfame - K (ACE – K), aspartame (ASP), sports drinks, energy drinks, sweeteners, estimated daily intake (EDI), Portuguese population, soft drinks based on mineral waters, soft drinks based on tea extracts, traditional soft drinks, saccharin (SAC), nectars.

AGRADECIMENTOS

Desde já estou eternamente grato ao importante apoio e incentivo sem os quais isto não se teria tornado realidade.

Agradeço à Professora Doutora Celeste de Matos Lino pela sua orientação, clareza e rigor, e pelo seu apoio, disponibilidade e colaboração ao longo deste último ano.

Agradeço à Professora Doutora Angelina Pena por ter aceitado ser co-orientadora desta investigação.

Agradeço à Doutora Liliana Silva pelo acompanhamento, esclarecimento e orientação concedido em ambiente laboratorial.

Aos docentes, colegas e funcionários pelo ambiente criado em laboratório no decorrer desta investigação, quer pelo esclarecimento de dúvidas de qualquer problema que surgisse, como pela simpatia com a qual lidaram comigo.

Aos amigos, que me acompanham há já muito antes de ter iniciado o percurso académico, Cristiana, Cristiano, Constantin, Marcelo, Pedro e Susana, que embora distante de casa sempre demonstraram o cuidado de fortalecer esta amizade e apoiar cada um no seu dia-dia.

Quero também mencionar, os amigos criados no decorrer da licenciatura em Bioquímica, em especial a Rita, Íris, Ângela, Inês e Joana, que ao surgirem numa fase difícil para mim, me ajudaram a manter focado nos meus objetivos, me acompanharam em incontáveis horas em sessões de estudo e me auxiliaram a deixar de ser uma pessoa introvertida que em tempos fui.

Aos colegas do mestrado em Segurança Alimentar, por mostrarem ao algarvio esta grande cidade académica, pelos convívios e jantares, e pela preservação de uma atmosfera de cooperação para que todos nós consigamos alcançar o nosso melhor.

A indicar também a gratidão perante os colegas de residência, pelo conhecimento transmitido por cada um deles, que me ajudou a desenvolver pessoalmente e me ajudou a lidar com diferentes culturas e pensamentos e acima de tudo pela ligação criada.

Um último agradecimento fundamental, à minha família que desde pequeno procuraram transmitir-me os melhores valores e cada um com o seu jeito me auxiliaram até ao dia de

hoje, e quero que saibam que as minhas qualidades refletem as características de cada um de vocês. Não podendo ter a mesma oportunidade no passado, quero que saibam que este trabalho é também vosso. Um enorme obrigado por sempre aceitarem as minhas ideias e quero continuar a vos maravilhar.

ÍNDICE

Resumo	i
Abstract	iii
Agradecimentos	v
Índice	vii
Índice de figuras	x
Índice de tabelas	xii
Lista de abreviaturas, siglas e termos	xiv
Capítulo I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	I
I. Introdução	2
I.1. Conceito de edulcorante	2
I.1.1. O conceito de edulcorante “perfeito”	3
I.1.2. Identificação do sabor doce	4
I.2. Classificação dos edulcorantes	6
I.2.1. Edulcorantes nutritivos vs intensivos	6
I.2.2. O poder edulcorante	9
I.3. Acessulfame de potássio	11
I.3.1. História	11
I.3.2. Estrutura	11
I.3.3. Características	12
I.3.3.1. Físico – químicas	12
I.3.3.2. Sensoriais	13
I.3.4. Metabolismo	15
I.3.5. Toxicidade	16
I.3.6. Legislação	18
I.3.6.1. Níveis máximos permitidos	20
I.3.6.2. Ingestão diária aceitável	20
I.3.7. Ocorrência	22
I.3.8. Metodologias analíticas	25
I.4. Sacarina	29
I.4.1. História	29
I.4.2. Estrutura	30

I.4.3. Características	30
I.4.3.1. Físico – químicas	30
I.4.3.2. Sensoriais	32
I.4.4. Metabolismo	33
I.4.5. Toxicidade	34
I.4.6. Legislação	36
I.4.6.1. Níveis máximos permitidos	36
I.4.6.2. Ingestão diária aceitável	38
I.4.7. Ocorrência	38
I.4.8. Metodologias analíticas	41
I.5. Aspártamo	45
I.5.1. História	45
I.5.2. Estrutura	45
I.5.3. Características	46
I.5.3.1. Físico – químicas	46
I.5.3.2. Sensoriais	47
I.5.4. Metabolismo	48
I.5.5. Toxicidade	50
I.5.6. Legislação	53
I.5.6.1. Níveis máximos permitidos	53
I.5.6.2. Ingestão diária aceitável	54
I.5.7. Ocorrência	56
I.5.8. Metodologias analíticas	59
Capítulo II – PARTE EXPERIMENTAL	62
II.1. Material e métodos	63
II.1.1. Amostragem	63
II.1.2. Reagentes e material	63
II.1.3. Soluções	64
II.1.4. Equipamento	66
II.1.5. Cálculo da dose diária estimada	67
II.2. Procedimento experimental	68
II.2.1. Preparação da amostra e purificação	68
II.2.2. Detecção e quantificação	69

II.2.3. Ensaio de fortificação	69
II.2.4. Limite de deteção e limite de quantificação	70
II.3. Resultados e Discussão	71
II.3.1. Otimização dos procedimentos analíticos	71
I.3.1.1. Composição da fase móvel	71
I.3.1.2. Fluxo da fase móvel	71
I.3.1.3. Volume de injeção	72
I.3.1.4. Tempo de corrida cromatográfica	72
I.3.1.5. Comprimento de onda de deteção	73
II.3.2. Desempenho analítico	74
I.3.2.1. Linearidade	74
I.3.2.2. Exatidão e precisão	78
I.3.2.3. Limites de deteção e de quantificação	80
II.3.3. Ocorrência de edulcorantes em bebidas	81
II.3.4. Ingestão diária estimada dos edulcorantes e avaliação de risco	92
Conclusões	98
Referências bibliográficas	100
Anexos	108
Anexo I – Caraterização das amostras de bebidas analisadas	109
Anexo II – Condições cromatográficas utilizadas na deteção e quantificação dos edulcorantes em estudo	118
Anexo III – Cromatograma de uma solução padrão de acessulfame – K (100 mg/L), sacarina (80 mg/L) e aspártamo (200 mg/L)	119
Anexo IV – Concentrações (mg/L) do acessulfame – K, da sacarina e do aspártamo nas amostras analisadas	120

Índice de figuras

Figura 1. Ilustração dos recetores do gosto doce, TIR2 e TIR3, em humanos	4
Figura 2. (a). Os três tipos de papilas gustativas presentes na língua. (b). Representação do “mapa da língua” comum aos cinco gostos básicos. (c). As TCRs projetam microvilias na superfície apical das papilas gustativas formando o poro de gosto	5
Figura 3. Representação esquemática da classificação dos edulcorantes	7
Figura 4. Visão geral das propriedades nutricionais significativas dos edulcorantes nutritivos e dos não nutritivos	9
Figura 5. Estrutura química da molécula de sacarose	10
Figura 6. Dióxidos de dihidro – oxatiazinona com diferentes substituintes e a intensidade edulcorante dos seus sais de sódio em relação a uma solução de sacarose a 4 %	11
Figura 7. Intensidade edulcorante do acessulfame – K em solução aquosa	14
Figura 8. Pós-sabor doce de diferentes edulcorantes de alta intensidade e misturas de edulcorantes versus sacarose	15
Figura 9. Metabolismo do acessulfame – K	16
Figura 10. Cronologia das leis aplicadas aos aditivos alimentares na União Europeia.....	19
Figura 11. Reação de hidrólise da sacarina e gráficos representativos da reação a diferentes temperaturas, a 20°C (Gráfico A), a 40°C (Gráfico B) e a 80°C (Gráfico C)	32
Figura 12. Intensidade edulcorante da sacarina comparativamente à concentração de sacarose	32
Figura 13. Metabolismo da sacarina	34
Figura 14. Estrutura química do aspártamo	45
Figura 15. Principais produtos de hidrólise do aspártamo, conforme o pH do meio	46
Figura 16. Principais produtos de decomposição do aspártamo	48
Figura 17. Esquema generalizado e simplista das vias metabólicas dos metabolitos do aspártamo	50
Figura 18. Comparação entre o consumo do aspártamo e a ADI estabelecida	55
Figura 19. Esquema representativo do método adotado para a preparação e purificação das amostras.....	68
Figura 20. Esquema representativo do procedimento adotado em cada um dos três dias dos ensaios de fortificação	70
Figura 21. Curva de calibração do acessulfame – K, em fase móvel.....	76
Figura 22. Curva de calibração da sacarina, em fase móvel	76
Figura 23. Curva de calibração do aspártamo, em fase móvel	76

Figura 24. Curva de calibração do acessulfame – K, em matriz **77**

Figura 25. Curva de calibração da sacarina, em matriz **77**

Figura 26. Curva de calibração do aspártamo, em matriz **77**

Figura 27. Distribuição das concentrações do acessulfame – K, da sacarina e do aspártamo perante as diferentes amostras analisadas **83**

Índice de tabelas

Tabela 1. Valor calórico, índice glicémico e poder edulcorante de açúcares e de edulcorantes.....	8
Tabela 2. Solubilidade (g / L) do acessulfame – K em diferentes solventes e a diferentes temperaturas (°C)	12
Tabela 3. Estabilidade do acessulfame – K em solução aquosa tamponada, em diferentes semanas	13
Tabela 4. Doses máximas de utilização estabelecidas pelo Decreto-Lei n.o 394/98 para a utilização de acessulfame – K nos produtos alimentares mencionados	21
Tabela 5. Frequência (%) e níveis (mg/L) de acessulfame – K em bebidas	24
Tabela 6. Métodos de preparação da amostra, purificação, deteção e quantificação do acessulfame – K em bebidas	27
Tabela 7. Estrutura química, fórmula e peso molecular das três formas de sacarina comercialmente disponíveis: sacarina ácida, de sódio e de cálcio	30
Tabela 8. Propriedades físicas da sacarina ácida, de sódio e de cálcio	31
Tabela 9. Doses máximas estabelecidas pelo Decreto-Lei n.o 394/98 para a utilização de sacarina nos produtos alimentares mencionados	37
Tabela 10. Frequência (%) e níveis (mg/L) da sacarina em bebidas	40
Tabela 11. Métodos de preparação da amostra, purificação, deteção e quantificação da sacarina em bebidas	43
Tabela 12. Doses máximas estabelecidas pelo Decreto-Lei n.o 394/98 para a utilização de aspártamo nos produtos alimentares mencionados	54
Tabela 13. Frequência (%) e níveis (mg/L) de aspártamo em bebidas	58
Tabela 14. Métodos de preparação da amostra, purificação, deteção e quantificação do aspártamo em bebidas.....	60
Tabela 15. Especificação da marca, fórmula e peso molecular, em g/mol, dos reagentes utilizados	64
Tabela 16. Simplificação do procedimento de preparação de cada umas das soluções utilizadas	66
Tabela 17. Determinação do efeito da matriz (%) para cada um dos três edulcorantes, a partir dos declives da reta obtidos na curva da calibração em matriz e em fase móvel ...	78
Tabela 18. Exatidão, repetibilidade intra-dia e inter-dia obtidas para cada um dos níveis de fortificação do acessulfame – K, da sacarina e do aspártamo	79
Tabela 19. Limite de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) obtidos para cada um dos edulcorantes em análise	80

- Tabela 20.** Contabilização da utilização das misturas de edulcorantes nos refrigerantes (tradicionais, à base de extratos de chá e à base de águas minerais), nas bebidas desportivas e energéticas e nos néctares **84**
- Tabela 21.** Ocorrência (%) variação e média das concentrações (mg/L) do acessulfame – K, da sacarina e do aspártamo em refrigerantes tradicionais, à base de águas minerais e à base de extratos de chá, em bebidas desportivas e energéticas e em néctares. Quantificação do número de amostras com concentração entre o LOD e o LOQ **87**
- Tabela 22.** Concentração do acessulfame – K, da sacarina e do aspártamo em refrigerantes tradicionais, com e sem gás, refrigerantes à base de águas minerais, refrigerantes à base de extratos de chás e em néctares, consoante o sabor da amostra. Quando $n > 1$, é considerado a média das concentrações **91**
- Tabela 23.** Ingestão diária estimada (EDI) (mg/ kg p.c. / dia) do acessulfame – K, da sacarina e do aspártamo pela população portuguesa a partir de refrigerantes (tradicionais, à base de águas minerais e à base de extratos de chá), bebidas desportivas e energéticas, e néctares. Comparação com as respetivas ingestão diária aceitável (ADI) (mg/ kg p.c. / dia) **94**
- Tabela 24.** Quantidade de cada um dos edulcorantes, em litros para atingir a ADI, tendo em conta cada uma das categorias de bebidas em estudo **97**

Lista de abreviaturas, siglas e termos

ACE – K	Acessulfame de potássio
ACN	Acetonitrilo
ADI	<i>Acceptable daily intake</i> / Ingestão diária aceitável
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANS	<i>Panel about food additives and nutrient sources added to food</i> / Painel sobre aditivos alimentares e fontes de nutrientes adicionados a alimentos
ASP	Aspártamo
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> / Trifosfato de adenosina
Ca	Cálcio
Ca IX	<i>Carbonic anhydrase IX</i> / Anidrase carbónica humana IX
CE	Comissão Europeia
CE - C4D	<i>Capillary Electrophoresis with a Capacitively-Coupled Contactless Conductivity Detector</i> / Eletroforese capilar com deteção de condutividade sem contacto capacitivamente acoplada
CYC	Ciclamato
CYC - Na	Ciclamato de sódio
DMU	Dose máxima de utilização
DPK	Ácido 5 - benzil - 3,6 -dioxo - 2 - piperazina acética
DRC	Domínio rico em cisteínas
DTM	Domínio 7 -transmembranar
EDI	<i>Estimated daily intake</i> / Ingestão diária estimada
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> / Autoridade europeia para a segurança dos alimentos
EM	Efeito da matriz
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> / Organização das nações unidas para a alimentação e agricultura
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> / Administração de alimentos e medicamentos
FID	<i>Flow injection online dialysis</i> / Diálise on-line por injeção em fluxo
FSMP	<i>Dietary food for special medical purpose</i> / Alimentos para fins médicos especiais
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> / Receptores acoplados à proteína G
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i> / Geralmente reconhecido como seguro
H₃PO₄	Ácido fosfórico
HILIC	<i>Hydrophilic interaction chromatography</i> / Cromatografia líquida com interação hidrofílica
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> / Cromatografia líquida de alta eficiência
HSH	<i>Hydrogenated starch hydrolysates</i> / Hidrolisados de amido hidrogenado
HTST	<i>High-temperature-short-time method</i> / Sistema de alta temperatura a curto prazo
IARC	<i>International agency for research on cancer</i> / Agência internacional de pesquisa sobre cancro
IC	<i>Ion chromatography</i> / Cromatografia iónica
INSA	Instituto Nacional de Saúde
ISA	<i>International Sweeteners Association</i> / Associação internacional de edulcorantes
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> / União internacional de química pura e aplicada

JEFCA	<i>Joint Expert Scientific Committee FAO/WHO on Food Additives and Contaminants /</i> Comité científico FAO/WHO especializado em aditivos alimentares e contaminantes
K	Potássio
KH₂PO₄	Fosfato monopotássico
LC	<i>Liquid chromatography /</i> Cromatografia líquida
LOD	Limite de deteção
LOQ	Limite de quantificação
Máx	Máximo
MeOH	Metanol
Min	Mínimo
MS - ESI	<i>Electrospray ionization mass spectrometry /</i> Espectrometria de massa de ionização por eletrização
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry /</i> Espectrometria de massa em tandem
MS/MS - ESI	<i>Electrospray ionization-tandem mass spectrometry /</i> Espectrometria de massa em tandem de ionização por eletrização
MSG	<i>Monosodium glutamate /</i> Glutamato mossódico
Na	Sódio
NHDC	Neohesperidina dihidrocalcona
NMDA	N – metilo – D – aspartato
NNS	<i>Non nutritive sweeteners /</i> Edulcorantes não nutritivos
NOEL	<i>No observed effect level /</i> Nenhum nível de efeito observável
NTP	<i>National Toxicology Program /</i> Programa nacional de toxicologia
PDA	Photodiode array / Matriz de fotodíodos
PKU	<i>Phenylketonuria /</i> Fenilcetonúria
PTS	<i>Phosphotransferase system /</i> Sistema de fosfotransferases
R²	Coeficientes de regressão linear
RDC	Resolução da diretoria colegiada
SAC	Sacarina
SAC - Ca	Sacarina de cálcio
SAC - Na	Sacarina de sódio
SCF	<i>Scientific Committee on Food /</i> Comitê científico da alimentação
SEER	<i>Surveillance Epidemiology and End Results /</i> Epidemiologia de vigilância e resultados finais
SERS	<i>Surface enhanced Raman spectroscopy /</i> Espectroscopia raman de superfície melhorada
SUC	Sucralose
TIR2	<i>Toll-like receptors of subgroup 2 /</i> Receptores Toll-like do subgrupo 2
TIR3	<i>Toll-like receptors of subgroup 3 /</i> Receptores Toll-like do subgrupo 3
TCRs	<i>Taste receptor cells /</i> Células dos recetores do sabor
UE	União Europeia
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography /</i> Cromatografia líquida de desempenho ultra
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization /</i> Organização mundial da saúde
ZBS	<i>Zinc binding site /</i> Local de ligação do zinco

Capítulo I
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I. Introdução

I.1. Conceito de edulcorante

Os aditivos alimentares desempenham um papel vital na indústria alimentar moderna e são utilizados principalmente para manter a qualidade e as características alimentares, bem como garantir a Segurança Alimentar (Lino *et al.*, 2008). São substâncias, que em si mesmas, não são consumidas geralmente como género alimentício e nem são usualmente utilizadas como ingrediente específico dos géneros alimentícios, com ou sem valor calórico e cuja adição intencional aos géneros alimentícios os tornam direta ou indiretamente um componente desses géneros alimentícios. Algumas das classes funcionais de aditivos presentes em produtos alimentares, incluem conservantes, agentes antibacterianos, agentes branqueadores, edulcorantes, corantes e agentes aromatizantes. A incorporação de um aditivo alimentar numa das classes funcionais não implica que este não possa ser utilizado com o intuito de realizar uma das outras funções (Regulamento (CE) N.º 1333/2008). A presença de um aditivo alimentar num género alimentício por ação indireta pode ocorrer devido à transferência ou migração da embalagem ou do equipamento de processamento para o género alimentício (Shibamoto & Bjeldanes, 2009). Substâncias cuja utilização tenha como objetivo conferir determinado aroma e/ou sabor ou que possuam fins nutricionais, como são exemplo o sucedâneo do sal, as vitaminas e os minerais, não deverão ser consideradas aditivos alimentares (Regulamento (CE) N.º 1333/2008).

Os aditivos alimentares devem estar incluídos na lista de ingredientes de um género alimentício, sendo mencionados através do seu nome ou pela letra E seguida de um número. A referência “E” refere-se à Europa e garante que este passou a testes rigorosos de segurança, e está autorizado e avaliado como seguro. Conforme os dados científicos disponíveis, a aprovação dos aditivos alimentares é monitorizada, revista e alterada (Obe *et al.*, 2016).

O primeiro registo de utilização de um edulcorante interliga-se com o uso do mel nas culturas arcaicas da Grécia e da China (Yilmaz & Asli, 2013). O xarope de bordo adquirido pela fervura da seiva das árvores *Acer saccharum Marsh* era o edulcorante influente no século XVII nas Américas, enquanto perto do Mediterrâneo se usava a alfarroba obtida a partir da *Ceratonia siliqua L.* Os progressos tecnológicos do século XVIII tornaram a

sacarose mais disponível e acessível, e de imediato se tornou no principal edulcorante utilizado. A produção mundial deste açúcar de mesa aumentou extensamente e a meio do século XX já era utilizado em uma vasta gama de alimentos por todo o planeta (Edwards *et al.*, 2016). Atualmente são produzidos aproximadamente 165 milhões de toneladas por ano em cerca de 120 países. Oitenta por cento da sua produção é efetuada a partir de cana – de – açúcar e o maior produtor desta planta, em 2013, foi o Brasil, seguido pela Índia e China (Grembecka, 2015).

Na categoria dos aditivos alimentares, os edulcorantes são reconhecidos por conferirem um sabor doce e possuírem baixas calorias. A amplificação da sua utilização deve-se ao aumento da incidência de casos de obesidade nos países desenvolvidos, assim como ao aumento da perceção das implicações de saúde relacionadas com uma dieta rica em calorias e ao objetivo de reduzir as cáries dentárias, existindo uma intenção progressiva de substituir a utilização de sacarose por outros edulcorantes (Lino *et al.*, 2008; Salminen & Hallikainen, 2001). O conceito de que os produtos alimentares dietéticos eram “usados apenas por aqueles que devem limitar a ingestão de açúcar” foi substituída pelo conceito de que estes estão disponíveis para “uso daqueles que desejam limitar a ingestão de açúcar” (Diogo *et al.*, 2013).

1.1.1. O conceito de edulcorante “perfeito”

Um edulcorante deve possuir características que o aproximem do considerado pela indústria como ideal, nomeadamente deve ser pelo menos tão doce como a sacarose, possuir um sabor limpo e agradável, ser incolor e inodoro. A gama da estabilidade e, naturalmente, a vida útil do produto final são também importantes, assim como a compatibilidade com uma ampla série de ingredientes alimentares. É ideal que seja solúvel em água e estável a diferentes valores de pH, nomeadamente em condições ácidas e básicas, e em um vasto intervalo de temperaturas. Para uma maior aceitação pelo consumidor, a segurança é essencial e estudos a nível deste ponto devem ser de domínio público. Assim, o edulcorante não deve ser tóxico nem cancerígeno e deve ser metabolizado normalmente ou excretado inalterado. A nível económico, os seus preços devem ser competitivos com os da sacarose e outros edulcorantes equiparáveis e necessitam de ser facilmente

produzidos, armazenados e transportados. Apesar da busca contínua pelo edulcorante perfeito, o mesmo não existe (Nabors, 2001).

1.1.2. Identificação do sabor doce

A identificação do sabor doce ocorre através de um sistema de protões doador/ aceitador entre o alimento e os recetores localizados nas papilas gustativas, estabelecendo – se um sistema AH / B / X. Neste sistema tridimensional, A e B representam átomos eletronegativos, como oxigénio ou azoto, H é o hidrogénio que está conjugado por uma ligação covalente a um átomo (A) e o X representa grupos hidrofóbicos que são atraídos pelas papilas gustativas. A distância molecular entre A e B deve ser cerca de 0,25-0,4 nm para que um determinado composto apresente sabor doce. Os recetores das papilas gustativas (TIR2 e TIR3) estão associados às proteínas G (GPCR) e fazem parte da classe C de proteínas (Figura 1). A α – gustducina é a proteína G associada ao recetor do gosto doce e está presente no lado citoplasmático da membrana celular, e inclui subunidades α , β e γ . As ligações hidrogénio hidrófobas são responsáveis por modificar a configuração do recetor “sensível ao gosto”, auxiliando a entrada de Na^+ pela alteração da permeabilidade do meio iónico. Ocorre também libertação de adenosina trifosfato (ATP) através da ativação dos recetores por compostos doces. Os sinais dos recetores do gosto doce criam impulsos nervosos que no cérebro são retransmitidos e processados, dando informação acerca do estado do alimento, nomeadamente se este é saudável ou se é amargo e provavelmente tóxico. Portanto a estimulação dos recetores TIR2 e TIR3 ativa os nervos gustativos periféricos e por consequente as vias gustativas cerebrais (Carocho *et al.*, 2017; Renwick & Molinary, 2010).

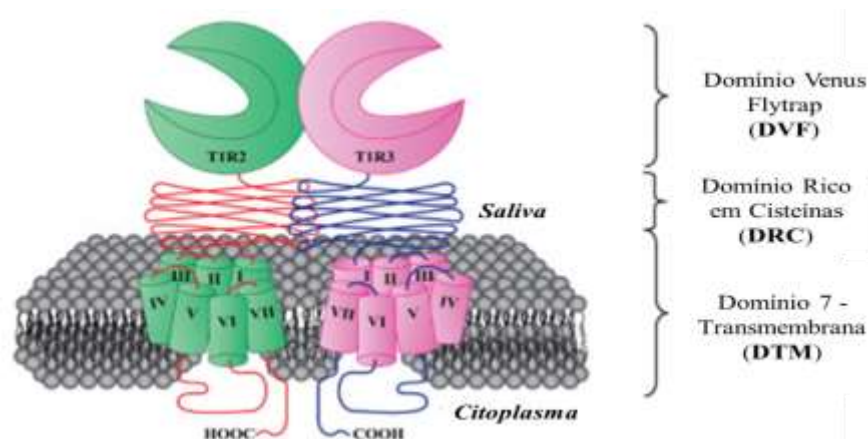


Figura 1. Ilustração dos recetores do gosto doce, TIR2 e TIR3, em humanos (Adaptado de DuBois, 2016).

As papilas gustativas são pequenos *clusters* formados pela aglomeração das células dos recetores do sabor (TCRs) e dependendo da espécie são constituídas por 50 a 150 TRCs. Localizam-se sobretudo na língua, mas podem ser encontrados em toda a cavidade oral. Como se pode observar na Figura 2 são classificadas em papilas circunvális, foliares e fungiformes. Na parte posterior da língua encontram-se as papilas circunvális e nos humanos estão presentes milhares. O bordo lateral posterior da língua apresenta papilas foliares e contem entre uma dúzia a centenas delas. As papilas fungiformes encontram-se em pequena abundância nos dois terços anteriores da língua (Obe *et al.*, 2016).

O conceito de que diferentes partes da língua são sensíveis a diferentes gostos foi contradito por dados moleculares e funcionais. Assim, a capacidade de resposta aos cinco gostos básicos (doce, salgado, amargo, azedo e umami) está dependente de todas as superfícies da língua e não de uma dada região em específico, como se pode observar na Figura 2.b, uma vez que as TRCs individuais aparentam expressar distintas famílias de recetores de gosto, e posteriormente, este reconhecimento de um dado sabor originaria a descodificação da atividade agrupada de diversas classes de TRCs profundamente sintonizadas (Figura 2.c.) (Chandrashekar *et al.*, 2006; Obe *et al.*, 2016).

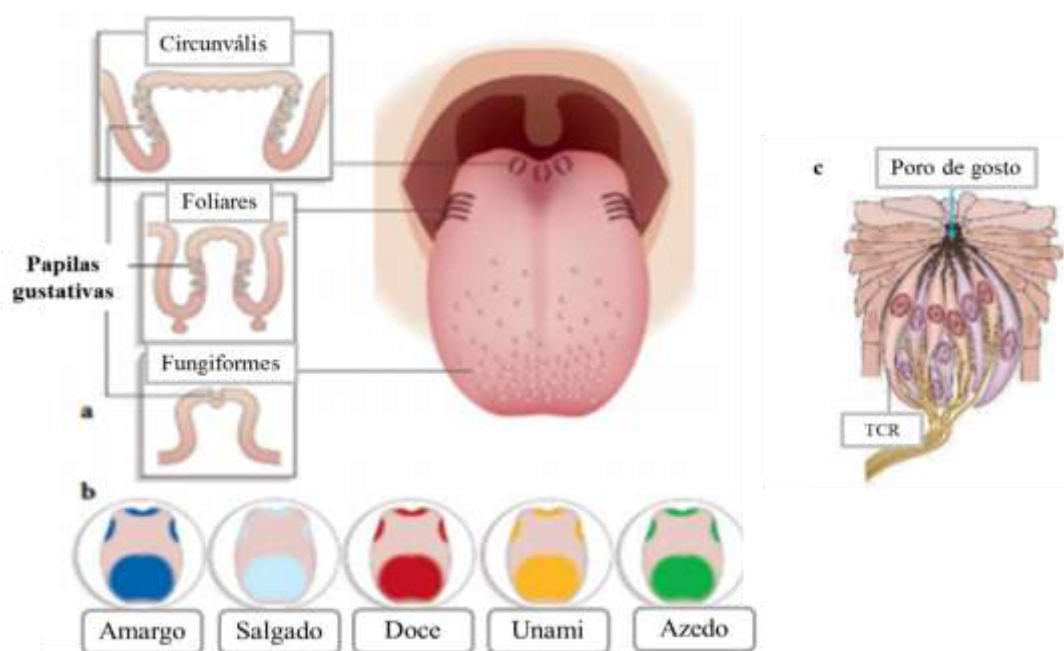


Figura 2. (a). Os três tipos de papilas gustativas presentes na língua. (b). Representação do “mapa da língua” comum aos cinco gostos básicos. (c). As TRCs projetam microvilias na superfície apical das papilas gustativas formando o poro de gosto (Adaptado de Obe *et al.*, 2016).

1.2. Classificação dos edulcorantes

Os edulcorantes são classificados pelas suas características intrínsecas, como o valor nutritivo (nutritivos e não nutritivos) e o poder edulcorante (intensivos ou polióis), ou pela sua origem (sintética ou natural) (Carocho *et al.*, 2017) (Figura 3).

1.2.1. Edulcorantes nutritivos vs intensivos

Apenas a classificação através do valor nutritivo é utilizada por órgãos governamentais como a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar da União Europeia (EFSA). De acordo com os termos do Regulamento (CE) n.º 1333/2008, os açúcares simples, o xarope de milho de alta frutose, a isomaltulose e a trealose, considerados por muitos autores como edulcorantes nutritivos, não são considerados aditivos alimentares mas sim ingredientes. Os açúcares são hidratos de carbono encontrados naturalmente em diversos alimentos e fornecem geralmente 4 calorias por grama (Garcia-Almeida *et al.*, 2013). Os principais monossacarídeos que surgem em alimentos e bebidas são a glucose, frutose e galactose, ao serem combinados quimicamente originam dissacarídeos, tais como sacarose (frutose + glucose), lactose (glucose + galactose) e maltose (glucose + glucose). A génese de energia na dieta ocorre através da hidrólise dos dissacarídeos em monossacarídeos no intestino delgado, com posterior absorção e metabolização.

Os polióis, também conhecidos como álcoois de açúcar, são edulcorantes nutritivos derivados de sacarídeos e podem ser sintetizados quimicamente por hidrogenação de mono – ou dissacarídeos redutores. Em relação aos açúcares, os polióis fornecem menos calorias, geralmente menos de 4 cal/g e possuem uma resposta glicémica menor porque são mal absorvidos, isto é o organismo não é capaz de os metabolizar integralmente. Por conseguinte esta característica favorece a sua presença em produtos dietéticos e para diabéticos (Edwards *et al.*, 2016).

O índice glicémico corresponde á velocidade com que o organismo digere, absorve e metaboliza os alimentos que possuem hidratos de carbono e é expresso tipicamente entre 1 e 100, como se pode observar na Tabela 1 (Grembecka, 2015).

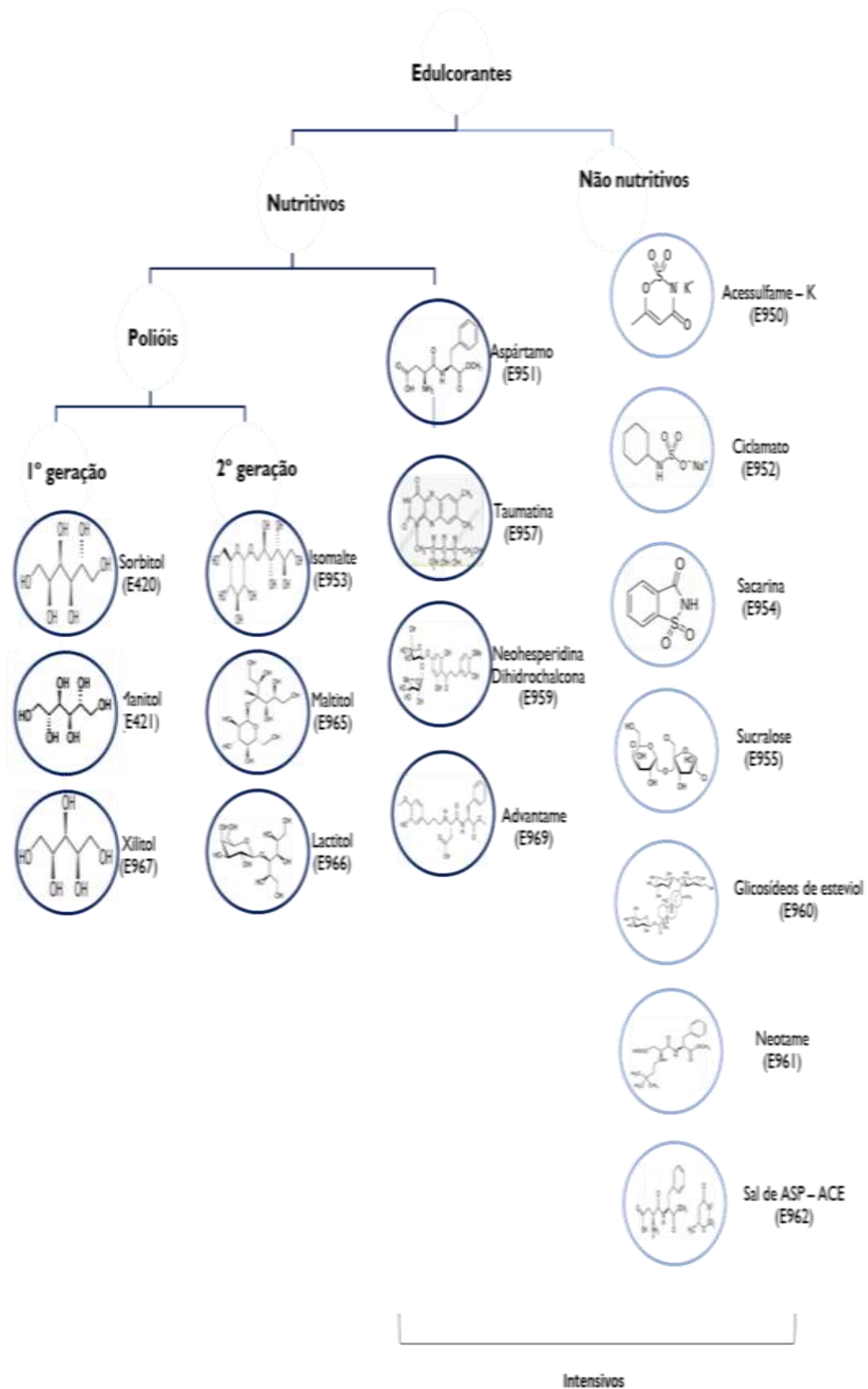


Figura 3. Representação esquemática da classificação dos edulcorantes (Adaptado de Carocho et al., 2017; García-Almeida et al., 2013).

Tabela 1. Valor calórico, índice glicémico e poder edulcorante de açúcares e de edulcorantes (Adaptado de Edwards et al., 2016; Grembecka, M., 2015; Monteiro, 2015; Moscucci, 2014; MyFitnessPal, 2017; Nabors, 2001; Passos & Ivo, 2016; Ribeiro, 2013; Silva, 2014; Yazio, 2017).

	Substância	Valor calórico (Kcal/g)	Índice Glicémico	Poder Edulcorante
AÇÚCARES	Monossacarídeos			
	Glucose	3,6	100	0,5
	Frutose	4	23	1,5 – 1,8
	Galactose	4	25	0,26
	Dissacarídeos			
	Maltose	3,4	105	0,4
EDULCORANTES	Sacarose	4	65	1
	Lactose	4	45	0,2 – 0,4
	Polióis			
	Eritritol	0,2	0	0,7
	Isomalte	2,1	9	0,45 – 0,65
	Lactitol	2	6	0,4
	Maltitol	2,4	35	0,9
	Manitol	1,5	0	0,7
	Sorbitol	2,5	9	0,6
	Xilitol	2,5	7	1,0
	Intensivos Não Nutritivos			
	Acessulfame – K	0	0	200
	Ciclamato	0	0	30
Sacarina	0	0	300	
Sucralose	0	0	600	
Glicosídeos de esteviol	0	0	200	
Sal de aspártamo – acessulfame	0	0	350	
Nutritivos				
Aspártamo	4	0	180	
Neohesperidina dihidrocalcona	2	0	1800	
Taumatina	4	0	2000	

Os polióis são adicionados frequentemente com edulcorantes não nutritivos (NNS), mas podem ser utilizados em maiores quantidades devido ao seu poder edulcorante significativamente menor. No entanto o seu consumo deve ser limitado porque quando ingeridos em doses excessivas (doses > 20 – 60 g, dependendo da tolerância), originam laxação devido à tolerância gastrointestinal delicada (Edwards et al., 2016). Ao contrário dos açúcares não estão relacionados com cáries dentárias porque não são fermentados pelas bactérias presentes na cavidade bucal e, assim, os dentes não são expostos ao ácido que danifica o esmalte. Além disso, aumentam a biodisponibilidade mineral em humanos, visto que o maltitol e o lactitol são considerados agentes probióticos (Grembecka, 2015). Os mais utilizados são o sorbitol (E420), manitol (E421), isomalte (E953), maltitol (E965), lactitol (E966), xilitol (E967) e eritritol (E968), enquanto com relevância mas menos

utilizados, e não permitidos na UE, são os hidrolisados de amido hidrogenado (HSH) e o arabitol (Carocho *et al.*, 2017).

Os edulcorantes intensivos são utilizados em reduzidas quantidades nos alimentos porque possuem um alto poder edulcorante, superior ao da sacarose, e uma contribuição calórica muito baixa ou mesmo nula, no entanto não causam perigo em termos de carcinogenicidade (Figura 4). Como não desencadeiam uma resposta glicémica são bastante utilizados em dietas hipocalóricas por indivíduos com diabetes e outros casos particulares em que a ingestão calórica tem que ser vigiada, como os obesos. De todos os edulcorantes intensivos utilizados, os mais relevantes são o acessulfame – K (E950), o aspártamo (E951), o ciclamato (E952), a sacarina (E954), a sucralose (E955), os glicosídeos do esteviol (E960), o neotame (E961) e o sal de aspártamo – acessulfame (E962) (Carocho *et al.*, 2017).

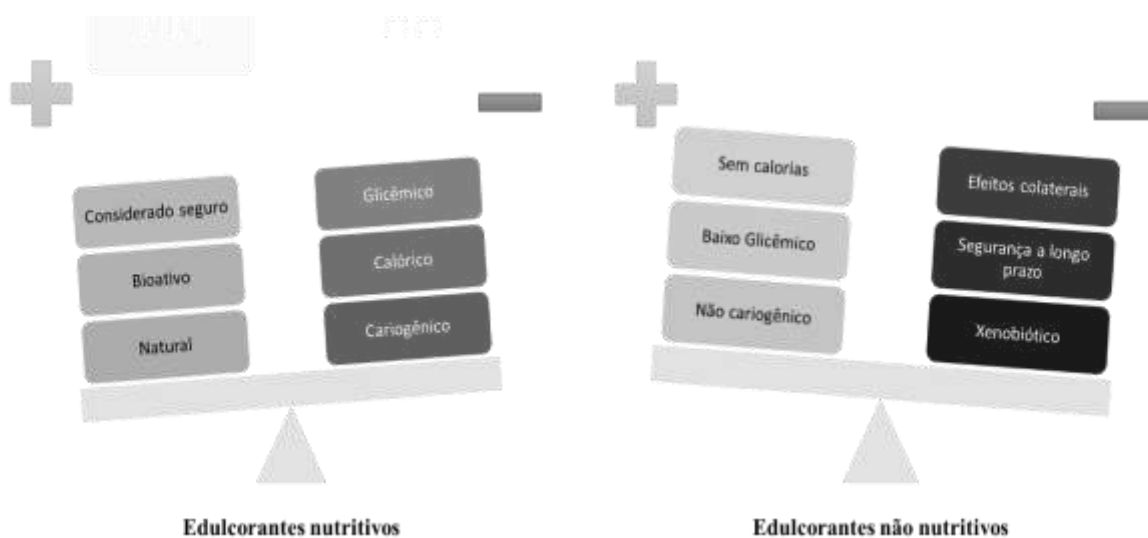


Figura 4. Visão geral das propriedades nutricionais significativas dos edulcorantes nutritivos e dos não nutritivos. Os efeitos que são considerados benéficos encontram-se a cinzento claro e os potenciais efeitos prejudiciais a preto (Adaptado de Edwards *et al.*, 2016).

1.2.2. O Poder Edulcorante

A intensidade edulcorante é de facto a característica mais importante de um edulcorante e é definida como a “quantidade de sacarose, em gramas, a ser dissolvida em água de modo a obter o mesmo sabor que a solução de 1 grama de um edulcorante no mesmo volume”. Não é expresso em unidades absolutas, é portanto relativo a um padrão definido. O açúcar de referência, a sacarose, tem uma intensidade de 1 e é considerada como referência ou

padrão. A sacarose é constituída por uma molécula de glucose que forma uma ligação ab (1,2) entre um dos seus carbonos no grupo aldeído e uma cetona na molécula da frutose (Figura 5), evitando assim quaisquer atributos redutores. Confere o gosto doce tradicional porque apresenta uma estrutura apropriada para se ligar aos recetores das papilas gustativas (Carocho *et al.*, 2017; Pérez, 2011).

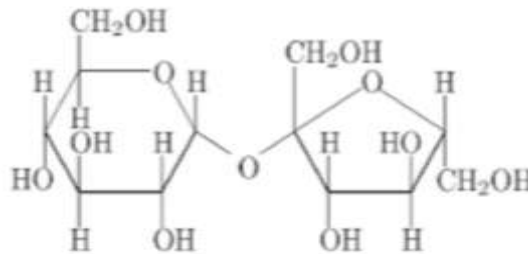


Figura 5. Estrutura química da molécula de sacarose.

A utilização deste dissacarídeo por substratos de bactérias, como o *Streptococcus mutans* e o *S. sanguis*, e a posterior conversão em ácido pirúvico, acético e láctico está relacionada com a deterioração dental, verificando-se a dissolução do esmalte nos dentes (Carocho *et al.*, 2017; Pérez, 2011).

A estrutura do açúcar, a temperatura de perceção, o pH e a presença de moléculas que influenciem os recetores, são exemplos de parâmetros que influenciam a intensidade do sabor doce. Considerando a Tabela I observa-se a existência de edulcorantes muitíssimo complexos que possuem um poder edulcorante milhares de vezes superior ao do açúcar de referência, a sacarose (Carocho *et al.*, 2017). Por exemplo, 100 gramas de sacarina equivalem a 35 000 gramas de sacarose, enquanto 100 gramas de glucose apenas equivalem a 74 gramas de sacarose e a mesma quantidade de frutose equivale a 173 gramas de sacarose (Cardoso, 2014).

1.3. Acessulfame de potássio

1.3.1. História

O composto 2,2 – dióxido – 5, 6 – dimetil – 1,2,3 – oxatiazina – 4 (3H) – ona foi descoberto acidentalmente em 1967 por Clauss e Jensen que, através da reação entre o 2 – buteno e o isocianato de fluorossulfonilo, indentificaram um novo composto doce com um sistema de anel que anteriormente ainda não tinha sido sintetizado (Pedersen, 1991). A Organização Mundial da Saúde, em 1978, registou este composto com o nome genérico de sal de potássio de acessulfame, sendo vulgarmente abreviado para acessulfame – K (Lipinski & Hanger, 2001). Em 1983 começou a ser utilizado na Europa e atualmente é incluído em géneros alimentícios em mais de 90 países por todo o mundo (Oscarvan, 2017).

1.3.2. Estrutura

O Acessulfame – K (ACE – K) pertence à classe dos dióxidos de dihidro – oxatiazinona e apresenta alguma homogenidade estrutural com a sacarina (Walters, 2013). O seu sistema de anel é quase plano e as distâncias entre os átomos individuais são menores do que as calculadas teoricamente (Lipinski & Hanger, 2001). Há uma ampla gama de compostos de sabor doce neste grupo e mesmo os compostos com o sistema de anel sem substituintes apresentam algum sabor doce (Klug & Lipinski, 2012). A intensidade e pureza do sabor doce são fortemente influenciadas pelas variações dos substituintes nas posições 5 e 6 do sistema do anel e a presença de grupos alquilo de cadeia curta confere maior intensidade deste sabor. De entre todos estes compostos, o sal de potássio é aquele que exhibe melhor qualidade no que respeita ao sabor (Lipinski & Hanger, 2001). A sua fórmula química é $C_4H_4NO_4KS$ e o seu peso molecular é 201,24 g/mol (Salminen & Hallikainen, 2001).

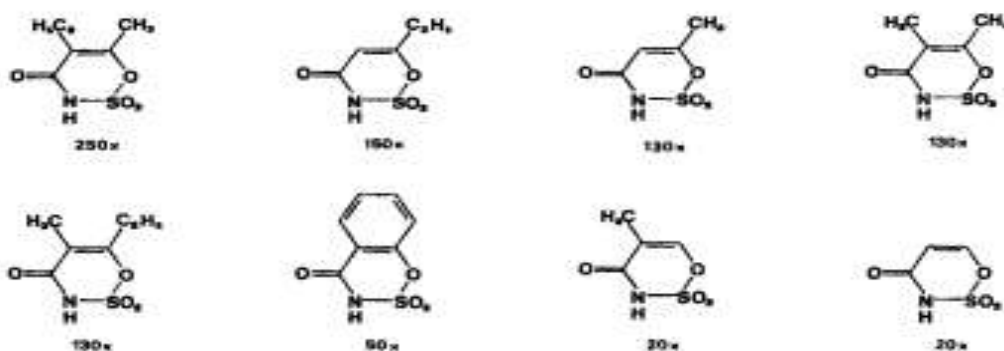


Figura 6. Dióxidos de dihidro – oxatiazinona com diferentes substituintes e a intensidade edulcorante dos seus sais de sódio em relação a uma solução de sacarose a 4 % (Lipinski & Hanger, 2001).

I.3.3. Características

I.3.3.1. Físicas – químicas

O Acessulfame – K é um pó branco e cristalino, cujos cristais são monocíclicos de ordem P 21/c. Apresenta uma gravidade específica de 1,83 g/cm³. Não aparenta demonstrar sinais de decomposição quando exposto à luz ou quando na ausência desta por um longo período à temperatura ambiente, pelo que ostenta na sua forma pura uma vida útil quase ilimitada à temperatura ambiente. O ACE – K não apresenta um ponto de fusão absoluto, sendo este ponto geralmente observado a temperaturas acima de 200 °C. As temperaturas normalmente utilizadas para aditivos alimentares não provocam fusão deste composto. O seu ácido apresenta um ponto de fusão nítido e absoluto a 123 °C (Lipinski & Hanger, 2001).

A solubilidade em água à temperatura ambiente é de aproximadamente 270 g/L (DuBois & Prakash, 2012). Com o aumento da temperatura para 100 °C, a solubilidade aumenta para 1000 g/L. A sua solubilidade diminui quando em mistura com álcoois, pois, como se observa na Tabela 2 a 20 °C em etanol somente se dissolve perto de 1 g/L. O teor de água em mistura de álcool/água também influencia a solubilidade, nomeadamente quanto maior este teor maior a solubilidade, por exemplo em etanol 50 % (v/v) podem ser dissolvidos cerca de 100 g/L. As soluções aquosas deste composto são praticamente neutras (Lipinski & Hanger, 2001).

Tabela 2. Solubilidade (g / L) do acessulfame – K em diferentes solventes e a diferentes temperaturas (°C) (Adaptado de Lipinski & Hanger, 2001).

Solvente	Temperatura (°C)	Solubilidade (g / L)
Água	0	150
Água	20	270
Água	100	ca. 1300
Etanol	20	1
Ácido acético glacial	20	130
Sulfóxido de dimetilo	20	300

Da escolha à utilização de edulcorantes intensos em produtos alimentares e em bebidas, a estabilidade a longo prazo e ao calor são fatores importantes a ter em ponderação. O ACE – K é uma mais valia neste sentido porque depois de diversos meses de armazenamento à temperatura ambiente, praticamente não apresenta nenhuma variação na sua concentração

na faixa de pH normalmente característica das bebidas. Mesmo em circunstâncias que dificilmente acontecem na prática, nomeadamente a exposição contínua prolongada a 30 °C (Tabela 3), não causam perdas superiores ao limiar para reconhecimento de diferenças no sabor doce, em concreto superiores a 10 % (Lipinski & Hanger, 2001).

Tabela 3. Estabilidade do acessulfame – K em solução aquosa tamponada, em diferentes semanas (Adptado de Lipinski & Hanger, 2001).

	Tempo de Armazenamento (semanas)	Recuperação (%)	
		pH 3.0	pH 3.5
20 °C	16	98	98
	30	98	99
	50	98	99
	100	95	98
30 °C	16	97	100
	30	95	97
	50	91	96

O ACE – K presente em bebidas também pode ser submetido a pasteurização sem perda da intensidade do sabor doce, nomeadamente a pasteurização por períodos longos a temperaturas reduzidas, bem como por alguns segundos a temperaturas elevadas. O mesmo acontece com a esterilização, não ocorrendo perdas a temperaturas perto de 100 °C para produtos com valores de pH mais baixos e a 121 °C para produtos com pH superiores a 4. Só mesmo a temperaturas bem acima de 200 °C é que se observa a decomposição do ACE – K. Sob tal circunstância extrema é que compostos hidrolíticos, como acetona, dióxido de carbono, sais de amónio, sulfato e amidossulfonato se obtêm pela decomposição do ACE – K. Os produtos finais desta hidrólise são produzidos rapidamente pela abertura do sistema de anel (Lipinski & Hanger, 2001).

1.3.3.2. Sensoriais

Como referido anteriormente, a intensidade do sabor doce está relacionada com a concentração da solução da sacarose. O ACE – K exhibe aproximadamente um poder edulcorante de 200 vezes maior relativamente a uma solução de sacarose a 3 %. A intensidade diminui com o aumento da concentração de sacarose, observando – se um valor mínimo de 130 a 100 vezes o valor da sacarose a 6 % (Figura 7). Comparativamente

a outros edulcorantes, possui metade do poder edulcorante da sacarina de sódio, é idêntico ao aspártamo e é quatro a cinco vezes mais doce do que o ciclamato de sódio.

O pH também influencia este atributo, pelo que em soluções neutras possui uma doçura ligeiramente menor. O sabor doce do acessulfame de potássio é detetado rapidamente e não é persistente, sendo esta deteção mais rápida quando comparada com outros edulcorantes intensivos, dos quais são exemplo o aspártamo e o alitamo. Por um lado, altas concentrações deste composto em soluções aquosas podem por vezes causar a sensação de sabor amargo. Com o aumento da temperatura, a intensidade do sabor doce não diminui até à dimensão de outros edulcorantes intensivos (Lipinski & Hanger, 2001).

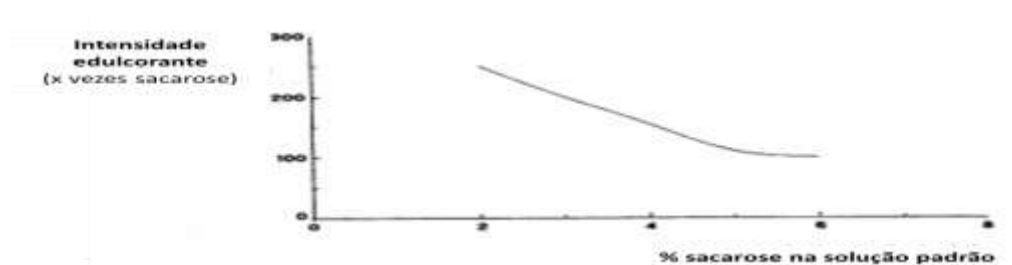


Figura 7. Intensidade edulcorante do acessulfame – K em solução aquosa (Adaptado de Lipinski & Hanger, 2001).

Apesar do ACE – K ser um edulcorante intenso por si só e de, quando utilizado em concentrações adequadas, não exibir problemas de gosto específico, as misturas com outros edulcorantes intensivos demonstram qualidades sensoriais particularmente desejáveis. De notar um efeito sinérgico quando combinado com o aspártamo ou o ciclamato de sódio, peculiarmente pela mistura 1:1 de acessulfame – K e aspártamo e de 1:5 de acessulfame – K e ciclamato de sódio, e quando em mistura com sacarina este efeito é ligeiro (Figura 8). As misturas com ACE – K encontram-se bastante mais próximas do sabor da sacarose, comparativamente aos edulcorantes simples, verificando-se por exemplo na mistura acessulfame – K : frutose em bebidas açucaradas. A presença deste composto numa mistura também permite reduzir substancialmente a sensação do sabor doce persistente causada pelo aspártamo e pela sucralose. O perfil de sabor de um alimento ou bebida pode portanto ser maximizado pela mistura de ACE – K com outros edulcorantes intensivos devido à aproximação com o sabor associado à sacarose. As misturas com polióis provocam uma sensação doce completa e bem equilibrada, e as proporções de mistura adaptadas são geralmente 1:100 em uma mistura com xilitol, 1:150 em uma mistura com maltitol, 1:150-200 em uma mistura com sorbitol e 1:250 em uma mistura com isomalte.

As combinações com polióis são principalmente utilizadas em produtos de confeitaria sem açúcar, em preparações de frutas e em outros produtos alimentares que necessitam de um agente de volume (Lipinski & Hanger, 2001).

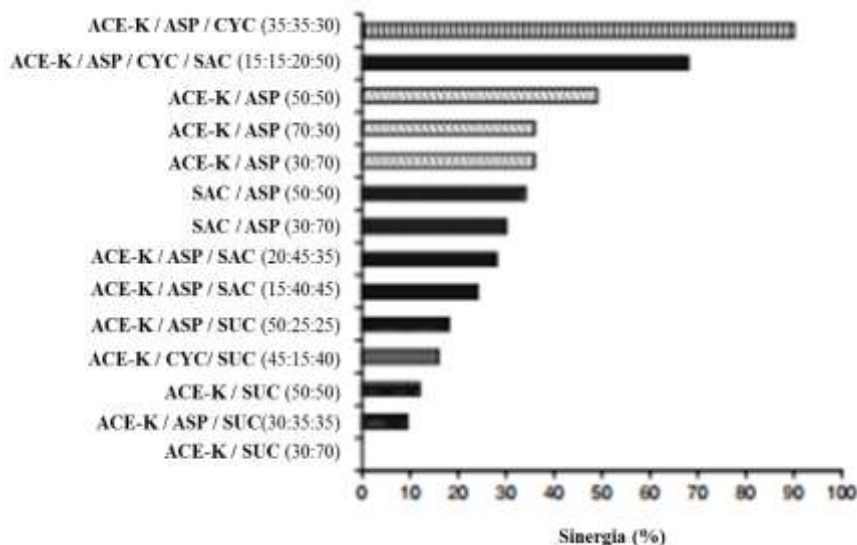


Figura 8. Pós-sabor doce de diferentes edulcorantes de alta intensidade e misturas de edulcorantes versus sacarose (Adaptado de Lipinski & Hanger, 2001).

1.3.4. Metabolismo

Após a ingestão do ACE – K ocorre a absorção rápida e quase total na circulação sistemática. Há um pico dos níveis sanguíneos 1 a 1,5 horas após a ingestão de uma dose oral de 30 mg (cerca de 0,4 mg por quilo de peso corporal) (Magnuson *et al.*, 2016). O ACE – K apresenta uma semi – vida de 2,5 horas e é excretado integralmente principalmente pela urina. Não é metabolizado pelo organismo humano, bem como por diferentes espécies animais, das quais são exemplo ratos, cães e porcos. Não há acumulação nos tecidos (Figura 9). Como não é metabolizado, este composto não apresenta qualquer valor calórico e os seus metabolitos não apresentam nenhuma atividade. Também não é metabolizado por bactérias, nas quais se inclui *Streptococcus mutans* responsável pela formação de cáries (Lipinski & Hanger, 2001).

O perfil de absorção e excreção não foi analisado particularmente em crianças, mas a exposição do feto ao ACE – K materno não representa um risco. Apesar de este edulcorante ser capaz de se deslocar pela placenta e ocorrer a baixas concentrações em tecidos fetais, comparativamente com o tecido placentário, a placenta executa a função de

barreira protetora. Algo que também foi comprovado pela inalteração das concentrações de ACE – K no líquido amniótico (Magnuson *et al.*, 2016).

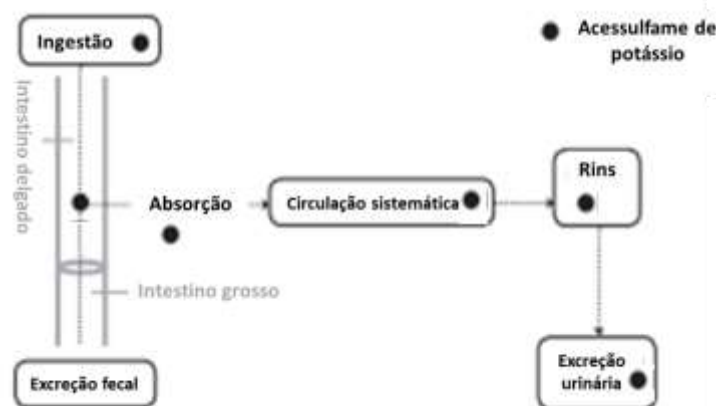


Figura 9. Metabolismo do acessulfame – K (Adpatado de Magnuson *et al.*, 2016).

1.3.5. Toxicidade

Hoechst, na década de 70, patrocinou três testes de toxicidade crônica a longo prazo e um teste subcrônico, todos em ratos, de modo a atender aos requisitos das autoridades reguladoras nas distintas nações e colocar o novo produto a circular comercialmente. A maioria dos animais testados apresentava uma grande incidência de doença respiratória que, por sua vez, era responsável pelo aumento da ocorrência de tumores linforreticulares. Os animais que não possuíam a anterior patologia respiratória crônica também desenvolveram tumores linforreticulares, pelo que os resultados dos testes foram descartados também porque a equipa da Food and Drug Administration (FDA) na década seguinte confirmou a existência de limitações nos protocolos, implementação e resultados dos testes aplicados ao ACE – K. A discordância com as especificações do programa nacional de toxicologia (NTP) a nível dos grupos de animais a testar, a realização de procedimentos inconvenientes na recolha de tecidos para histopatologia e o tempo de exposição inadequados foram alguns dos erros realizados que impediram o desenvolvimento de testes de toxicidade crônica de qualidade rigorosa (Karstadt, 2013).

Apesar da alta exposição da população ao ACE – K, foram realizados poucos testes de toxicidade. No entanto este edulcorante não nutritivo é considerado não tóxico porque a sua toxicidade oral aguda é bastante baixa (DL50 de 6,9 – 8,0 g / kg de peso corporal) e apenas se manifesta sintomaticamente através de dores de cabeça (Lipinski & Hanger,

2001; Whitehouse *et al.*, 2008). Também não é considerado mutagénico, tendo revelado resultados negativos em células de mamíferos *in vitro* e em ensaios bacterianos com *S. typhimurium* e *E. coli*, bem como em estudos de transformação de células malignas, síntese de ADN não programado e na ligação de ADN *in vivo* (SCF, 2000). Em concentrações bem acima dos níveis habituais em combinação com sacarina e fluoreto de sódio revela uma ação capaz de inibir bactérias, nomeadamente o *Streptococcus mutans* NCTC 10449 (Lipinski & Hanger, 2001).

A anidrase carbónica IX humana (CA IX) é um possível alvo de medicamentos para a quimioterapia anticancerígena, pelo facto desta ser regulada positivamente nos tecidos neoplásicos, assim a sua inibição aparenta reduzir o crescimento tumoral. A homologia estrutural entre isoformas da CA é uma das principais dificuldades para o desenvolvimento de inibidores específicos. Precedentemente já tinha sido comprovado que a sacarina inibe seletivamente o CA IX em relação às outras isoformas. A seletividade de ACE – K para a CA IX também foi confirmada e aumenta através do deslocamento do local de ligação do zinco (ZBS) e pela ocupação completa do local de ligação ao substrato (Murray *et al.*, 2017).

O consumo de ACE – K é responsável pelo aumento do peso corporal em ratos - macho. A composição bacteriana intestinal e o perfil do metabolismo também são influenciados pelo género quando sujeitos ao consumo de ACE – K. O género *Bacteroides* é mais abundante em ratos macho e apresenta características benéficas para o hospedeiro. Verificou - se o mesmo efeito pelo consumo de um outro edulcorante sintético, a sacarina. O tratamento com ACE – K também elevou a abundância do género *Anaerostipes* em ratos macho. Uma maior quantidade dos anteriores géneros no microbioma intestinal está relacionada com uma elevada capacidade de recolha de energia, devido à amplificação dos genes envolvidos na absorção, degradação e fermentação de hidratos de carbono, bem como pelo aumento significativo de um dos principais metabolitos associados ao metabolismo energético, o piruvato, o que explica por sua vez o aumento de peso em ratos macho. O microbiota intestinal em ratos fêmea revela uma resposta notavelmente distinta pelo consumo de ACE – K, uma vez que existe uma diminuição de diversos géneros de bactérias intestinais, nas quais se incluem *Lactobacillus*, *Costridium* e géneros não atribuídos em *Ruminococcaceae* e *Oxalobacteraceae*. Todas estas bactérias mencionadas executam funções essenciais na digestão de alimentos e na fermentação de polissacarídeos, visto que

por exemplo o género *Ruminococaceae* hidrolisa fibras alimentares complexas para fermentação intestinal e a espécie *Clostridium thermocellum* hidrolisa glicosídeos e está envolvida na digestão de polissacarídeos. As vias de absorção, degradação e fermentação de hidratos de carbono também diminuíram significativamente nos animais do sexo feminino após o consumo de ACE – K e, em oposição aos ratos macho, não se verificou ganho de peso corporal. A perturbação da normal composição e perfil das bactérias intestinais induzida pelo consumo de ACE – K pode portanto desenvolver o risco de ocorrência de inflamações crónicas sistemáticas, comprovado em ratos macho pelo aumento da toxina bacteriana Gram positiva, a citolisina ativada por tiol, reconhecida como um importante fator de virulência que estimula a expressão de mediadores inflamatórios e com conseqüente indução de respostas inflamatórias. A alteração dos ácidos biliares nas amostras fecais de ratos machos também revelam um risco potencial para o desenvolvimento destas inflamações, uma vez que o metabolito normal do ácido biliar também é responsável pela regulação da resposta inflamatória (Bian *et al.*, 2017).

1.3.6. Legislação

A análise científica da segurança dos Aditivos Alimentares em utilização na União Europeia, de 1974 a março de 2003, competia ao Comité Científico da Alimentação (SCF). A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) passou a ter esta responsabilidade desde abril de 2003. O painel independente de Aditivos Alimentares e Fontes de Nutrientes adicionados aos Alimentos (ANS), constituído por membros designados com suporte na sua excelência científica lida com questões relacionadas com a segurança dos edulcorantes. Com base no parecer científico da EFSA, a Comissão Europeia é responsável pela aprovação da regulamentação a aplicar aos edulcorantes na União Europeia.

A Diretiva 94 / 35 / CE do Parlamento Europeu e do Conselho foi a primeira a entrar em vigor a nível europeu tendo em conta os edulcorantes nos géneros alimentícios.

O Regulamento 1333 / 2008 solidificou no presente documento algumas das autorizações atuais aplicáveis aos edulcorantes e aditivos alimentares.

O Regulamento 1129 / 2011 define no Anexo II uma lista comunitária de edulcorantes autorizados para utilização em alimentos, bebidas e edulcorantes de mesa e seus contextos de uso (Figura 10).

Os edulcorantes necessitam de considerar as especificações dos critérios de pureza da União Europeia e os níveis máximos de uso tem que ser especificados, quando apropriados. Todos os Aditivos Alimentares que foram autorizados no mercado da União Europeia anteriormente a 20 de janeiro de 2009 encontram - se presentemente a serem reavaliados pela EFSA, preocupação solicitada pela Comissão Europeia.

A nível mundial a avaliação científica dos Aditivos Alimentares é realizada pelo Comité Científico FAO/WHO especializado em Aditivos Alimentares e Contaminantes (JEFCA), composto pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (WHO) (OBE *et al.*, 2016).



Figura 10. Cronologia das leis aplicadas aos aditivos alimentares na União Europeia (Adptado de OBE *et al.*, 2016).

Mais de 100 países autorizaram a utilização de ACE – K para uso alimentar e na União Europeia esta aprovação inclui mais de 30 categorias de alimentos (Klug & Lipinski, 2012). O Reino Unido foi o primeiro país a realizar esta aprovação. A autorização comercial ocorreu devido às avaliações favoráveis publicadas pela OMS, pela FAO e pelo SFC. Para além de todos os estados membros da União Europeia, também o Canadá, o Japão, a Austrália e a Nova Zelândia permitiram a sua utilização (Lipinski & Hanger, 2001).

A utilização do ACE – K em diversas categorias de géneros alimentícios está aprovada desde 1988 (EFSA, 2016). Nos Estados Unidos da América pode ser utilizado sem limites formais em produtos padronizados ou não padronizados, respeitando as boas práticas de fabricação, desde que esteja listado ou seja feita referência geral a edulcorantes intensivos

na lista de ingredientes. A autorização nos EUA somente exclui carnes e aves de capoeira (Klug & Lipinski, 2012).

1.3.6.1. Níveis máximos permitidos

As doses máximas de utilização do ACE – K foram estabelecidas para 43 diferentes categorias de géneros alimentícios pelo Decreto-Lei n.º 394/98, que é uma transposição da Diretiva Comunitária n.º 96/83/CE. Os níveis máximos instituídos variam desde quantidades significativamente reduzidas, tais como 25 mg/L a concentrações bastante superiores, como 2500 mg/kg, aplicados a cervejas de baixo valor calórico e a produtos de microconfeitaria para refrescar o hálito, sem adição de açúcares, respetivamente. No caso dos refrigerantes (tradicionais, à base de extratos de chás e de águas minerais), bebidas desportivas, bebidas energéticas e néctares, que mais á frente no presente documento irão ser analisados, possuem um nível máximo permitido de 350 mg/L (Tabela 4).

1.3.6.2. Ingestão Diária Aceitável

A Ingestão Diária Aceitável (ADI) é a quantidade de um aditivo alimentar que pode ser consumido diariamente, durante toda a vida de um indivíduo, sem causar risco para a sua saúde. Expressa - se em miligramas por quilograma de peso corporal por dia. Pode ser utilizada como referência para investigar o consumo real de um composto. A partir de exames toxicológicos em animais é estabelecido o nível máximo de consumo no qual o aditivo não demonstra efeitos tóxicos, nenhum nível de efeito observável (NOEL). Pela aplicação de um fator de segurança, geralmente de 100 vezes, é estabelecida a ADI que se baseia numa exposição crónica ao longo da vida e apresenta um intervalo de segurança (Lipinski & Hanger, 2001).

A JEFCA delimitou, em 1983, uma ADI de 0 – 9 mg / kg de peso corporal / dia para o acessulfame – K, valor este estabelecido pela EFSA. Após a revisão de novos dados, em 1991, a JEFCA aumentou a ADI anteriormente estabelecida para 0 – 15 mg / kg de peso corporal / dia (EFSA, 2016). A FDA também estabeleceu uma ingestão diária aceitável de 15 mg / kg de peso corporal (Lipinski & Hanger, 2001). Considerando a ADI estabelecida, a ingestão máxima para um indivíduo de 60 kg seria 900 mg de ACE – K por dia e como

este edulcorante é constituído por 20 % de potássio, o consumo da anterior quantidade mencionada iria no máximo acrescentar 180 mg de potássio ao consumo quotidiano dum indivíduo (Magnuson *et al.*, 2016).

Tabela 4. Doses máximas de utilização estabelecidas pelo Decreto-Lei n.º 394/98 para a utilização de acessulfame – K nos produtos alimentares mencionados.

Acessulfame - K (E950)	
Produtos alimentares	Doses máximas de utilização
Bebidas aromatizadas à base de água com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	350 mg/L
Bebidas à base de leite e produtos derivados ou sumos de fruta, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	350 mg/L
Sobremesas aromatizadas à base de água com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	350 mg/kg
Preparados à base de leite e produtos derivados, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	350 mg/kg
Sobremesas à base de fruta e produtos hortícolas, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	350 mg/kg
Sobremesas à base de ovos com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	350 mg/kg
Sobremesas à base de cereais com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	350 mg/kg
Sobremesas à base de matérias gordas com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	350 mg/kg
Snacks: aperitivos salgados e secos à base de amido ou de nozes e avelãs, pré-embalados e que contenham certos aromas	350 mg/kg
Confeitaria sem adição de açúcares	500 mg/kg
Confeitaria à base de cacau ou frutos secos, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	500 mg/kg
Confeitaria à base de amido, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	1000 mg/kg
Preparados para barrar pão à base de cacau, leite, frutos secos ou gorduras, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	1000 mg/kg
Pastilhas elásticas sem adição de açúcares	2000 mg/kg
Sidra e perada	350 mg/L
Cervejas sem álcool ou com um teor alcoólico não superior a 1,2 % vol.	350 mg/L
Bière de table/ Tafelbier/table beer (com um teor original de mosto não superior a 6 %), com exclusão da Obergär'riges Einfachbier	350 mg/L
Cervejas com acidez mínima de 30 mil equivalentes expressa em Na OH	350 mg/L
Cervejas pretas do tipo oud bruin	350 mg/L
Gelados alimentares, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	800 mg/kg
Fruta em lata ou frasco, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares.	350 mg/kg
Compotas, geleias e marmeladas com baixo valor energético	1000 mg/kg
Preparados de fruta e produtos hortícolas, com baixo valor energético	350 mg/kg
Conservas agridoces de fruta e produtos hortícolas	200 mg/kg
Conservas e semiconservas agridoces de peixe e marinadas de peixe, crustáceos e moluscos	200 mg/kg
Molhos	350 mg/kg
Mostarda	350 mg/kg
Produtos de padaria fina para alimentação especial	1000 mg/kg
Preparados completos de regime para controlo do peso destinados a substituir uma refeição ou o regime alimentar diário	450 mg/kg
Preparados completos e suplementos nutritivos para utilização sob vigilância médica	450 mg/kg
Suplementos alimentares/constituintes líquidos dietéticos	350 mg/L
Suplementos alimentares/constituintes sólidos de um regime dietético	500 mg/kg
Complementos alimentares/integrantes de regimes dietéticos à base de vitaminas e ou elementos minerais em xarope ou para mastigar	200 mg/kg
Cereais de pequeno-almoço com teor de fibras superior a 15 %, contendo pelo menos 20 % de farelo, de baixo valor energético ou sem adição de açúcares	1200 mg/kg
Caldos de baixo valor energético	110 mg/L
Produtos de microconfeitaria para refrescar o hálito, sem adição de açúcares	2500 mg/kg
Cerveja de baixo valor energético	25 mg/L
Bebidas constituídas por uma mistura de cerveja, cidra, perada, bebidas espirituosas ou vinho e bebidas não alcoólicas	350 mg/L
Bebidas espirituosas com um teor de álcool inferior a 15 % vol.	350 mg/kg
Cornetos e bolachas sem açúcar para gelados	2000 mg/kg
Confeitaria na forma de comprimido de baixo valor energético	500 mg/kg
Feinkostsalat	350 mg/kg
Eboblatten	2000 mg/kg

O Painel da EFSA sobre aditivos alimentares e fontes de nutrientes adicionados a alimentos (ANS) considera que a exposição ao ACE – K, através do consumo de alimentos para fins médicos especiais (FSMP), deve ser reavaliada tendo em conta outras prováveis fontes de ACE – K perante crianças de 1 a 3 anos, porque a exposição ao ACE – K apenas pelo consumo de FSMP, em concentrações superiores a 300 mg / kg, excede a ADI (EFSA, 2016).

O Regulamento Europeu 1333/2008 sobre aditivos alimentares impõe que os estados membros da União Europeia controlem a ingestão do consumidor de modo a garantir que a sua ingestão não exceda o estipulado para um dado aditivo alimentar. Esta vertente de avaliação de risco foi abordada por diversos investigadores europeus nas últimas duas décadas. Como exemplo em Portugal, Lino *et al.* (2008) constataram que a ADI do ACE – K não era excedida, em um grupo de jovens portugueses com idades compreendidas entre os 13 e os 15 anos, tendo observado que o consumo de refrigerantes, refrigerantes à base de águas minerais e de néctares representava respetivamente 8 %, 2,2 % e 5,8 % da ADI estabelecida. Huvaere *et al.* (2011) avaliaram a ADI na população belga adulta (a partir dos 15 anos) e verificaram que esta não foi excedida através do consumo de diferentes matrizes alimentares, nas quais se incluem as bebidas não alcoólicas, uma vez que o consumo de acesulfame – K apenas representou 5 % da ADI. Vin *et al.* (2013) avaliaram este parâmetro em diferentes países da União Europeia (França, Itália, Reino Unido e Irlanda) e em diferentes faixas etárias e concluíram que em nenhuma das situações a ADI foi excedida e o principal género alimentício responsável por esta exposição são as bebidas não alcoólicas (37-68 % da ingestão em adultos e 12-20 % em crianças). Diogo *et al.*, (2013), também em Portugal, relataram que a população adulta está exposta a 0,7 %, 0,2 % e 0,07 % da ADI do ACE – K, pelo consumo de refrigerantes tradicionais, refrigerantes à base de águas minerais e néctares, respetivamente. Donne *et al.* (2017) relataram que a exposição da população italiana era bastante baixa, visto o consumo de ACE – K apenas corresponder a 1,1 % da ADI, sendo que 65 % deste valor se deve ao consumo de bebidas não alcoólicas.

1.3.7. Ocorrência

O controlo europeu relativo à presença do ACE – K nos diversos géneros alimentícios é realizado através de uma rigorosa legislação, designadamente pela Diretiva 94/35/CE (Parlamento Europeu e Conselho de 1994) que estabeleceu que o nível máximo permitido é de 350 mg/L em bebidas aromatizadas à base de água com baixo valor energético ou sem

adição de açúcares (vulgar refrigerantes). Em diversos países da Europa, como Bélgica, Dinamarca, Polónia e Itália, as amostras analisadas demonstraram que a concentração de ACE – K não excedeu os 216 mg/L (Tabela 5), valor que não leva a pôr em causa o limite estipulado pela legislação europeia. Dos diferentes países europeus, Portugal foi o único em que se verificou que uma amostra de néctar ultrapassou a dose máxima de utilização com 356 mg/L (Lino *et al.* 2008). No mesmo país, Diogo *et al.* (2013) analisaram néctares, bebidas energéticas e refrigerantes tradicionais e à base de águas minerais e as concentrações máximas encontradas foram de 283,7 mg/L, 198,8 mg/L, 178,5 mg/L e 95,5 mg/L, respetivamente. Ambos os estudos revelam que a utilização do ACE – K é mais preocupante nos néctares.

Nos EUA, Shah *et al.* (2014) identificaram a presença de ACE - K em cinco amostras de refrigerantes carbonatados (56 %) com teores entre os 49 – 76 mg/L e em três amostras de refrigerantes não carbonatados (50 %) com teores compreendidos entre 20 – 48 mg/L. No Brasil, Bergamo *et al.* (2011) apenas identificaram a sua presença numa amostra de refrigerante com um teor de 143 mg/L. Portanto na América do Sul as concentrações de ACE – K aparentam estar bem abaixo do limite estabelecido de 350 mg/l. Nos EUA, o ACE-K é considerado um edulcorante de uso geral e potenciador de sabor em alimentos. (FDA, 2017; RDC N°.18, de 24 de Março de 2008).

Atualmente no Japão, os níveis máximos admitidos de ACE-K nestas bebidas está fixado em 500 mg/L, valor superior ao estabelecido em Portugal. Sakai *et al.*, (2015) verificaram a ausência de ACE – K nas bebidas de fruta, mas em refrigerantes carbonatados identificaram a sua presença em um terço das amostras, com teores compreendidos entre os 59,8 – 171,6 mg/L e em bebidas desportivas surge em 40 % das amostras com teores entre 57,2 e 70,9 mg/L. Os níveis máximos permitidos na China (300 mg/L) (Chinese Standards for Food Additives GB2760, 2015) são inferiores aos estabelecidos na Europa, no entanto Zhu *et al.* (2005) identificaram em duas amostras de refrigerantes concentrações de 1105,37 e 1475,37 mg/L, valor bem acima do limite implementado. Kritsunankul & Jakmune (2011) identificaram a presença de ACE – K em todas as quatro amostras de refrigerantes analisadas, com teores compreendidos entre os 127 – 227 mg/L e numa amostra de refrigerante à base de extrato de chá com um teor de 46 mg/L, valores abaixo dos limites máximos estabelecidos na Tailândia.

Tabela 5. Frequência (%) e níveis (mg/L) de acessulfame-K em bebidas.

País	Tipo de Bebida	Nº de Amostras	Frequência (%)	Níveis (mg/L)		Bibliografia
				Min - Máx	Média	
Japão	Bebidas carbonadas	12	33,3	59,8 – 171,6	127,3	Sakai et al., 2015
	Bebidas de fruta	5	0	-	-	
	Bebidas desportivas	5	40	57,2 – 70,9	64,05	
China	Refrigerantes carbonatados	2	100	1105,37 – 1475,37	1290,37	Zhu et al., 2005
	Sumo de Fruta	1	0	-	-	
Tailândia	Refrigerantes	4	100	127 – 227	177	Kritsunankul & Jakmune, 2011
	Refrigerantes à base de extratos de chás	2	50	0 – 46	23	
Portugal	Refrigerantes	25	72	7,88 – 166	72	Lino et al., 2008
	Refrigerantes à base de águas minerais	13	77	3,7 – 182	48	
	Néctares	10	100	35 – 356	128	
	Refrigerantes		32,2	18,2 – 178,5	38	Diogo et al., 2013
	Refrigerantes à base de águas minerais	59	15,2	3,2 – 95,5	34,1	
	Bebidas energéticas	3	33,3	0 – 198,8	66,3	
	Néctares	16	100	47,1 – 283,7	88,2	
Dinamarca	Refrigerantes carbonatados (sem açúcar)	21	38,1	32 – 179	129	Leth et al., 2007
	Refrigerantes carbonatados	15	0	-	-	
	Refrigerantes	60	65	20 – 161	62	
	Refrigerantes (sem açúcar)	20	0,05	-	43	
Polónia	Refrigerantes	4	75	23,1 – 65,5	38	Zygler et al., 2011
	Refrigerantes carbonatados	7	86	17,8 – 215,2	91,8	
	Sumos	3	66,7	22,9 – 33,7	28,3	
Bélgica	Águas aromatizadas	5	-	-	35	Huvaere et al., 2011
	Bebidas carbonatadas	19	-	-	88	
	Bebidas à base de sumos de fruta	14	-	-	107	
	Bebidas desportivas	2	-	-	55	
	Bebidas energéticas	2	-	-	20	
Itália	Bebidas aromatizadas	57	82	-	126 ± 72	Janvier et al., 2015
	Néctares	18	44	-	50 ± 50	
USA	Refrigerantes carbonatados	9	56	49 – 76	59,4	Shah et al., 2014
	Refrigerantes não carbonatados	6	50	20 – 48	38,7	
Brasil	Refrigerantes	3	33,3	-	143	Bergamo et al., 2011

1.3.8. Metodologias analíticas

A preparação da amostra em bebidas carbonatadas e néctares é efetuada recorrendo à sua degaseificação em banho de ultrassons (Diogo *et al.*, 2013; Huvaere *et al.*, 2011; Kritsunankul & Jakmunee, 2011; Kubica *et al.*, 2015; Kubica *et al.*, 2016; Lorenzo *et al.*, 2015; Ordoñez *et al.*, 2015; Sakai *et al.*, 2015; Yang & Chen, 2009; Zygler *et al.*, 2011). Em seguida alguns investigadores recorrem à diluição da amostra com água ultra pura (Kritsunankul & Jakmunee, 2011; Ordoñez *et al.*, 2015), enquanto outros usam mistura de água com metanol, em proporções diferentes (Huvaere *et al.*, 2011; Lorenzo *et al.*, 2015), ácido fórmico – *N,N* – diisopropiletamina (FA – DIPEA) (Zygler *et al.*, 2011), ácido fórmico em solução aquosa (Sakai *et al.*, 2015), água, metanol, acetona e ácido acético (Kubica *et al.*, 2015) (Tabela 6).

No que respeita à purificação de refrigerantes e néctares a grande maioria dos investigadores opta simplesmente pela filtração através de filtros de membrana de 0,45 µm (Kritsunankul & Jakmunee, 2011) ou de 0,22 µm (Lorenzo *et al.*, 2015). Outros autores após a filtração recorrem à centrifugação usando forças centrífugas que podem variar de 3600 rpm (10') (Yang & Chen, 2009) a 13 000 rpm (10') (Huvaere *et al.*, 2011). Ainda que ocasionalmente alguns investigadores utilizem as anteriores técnicas de purificação, Zygler *et al.* (2011) usaram colunas de extração em fase sólida (SPE) para sumos e bebidas carbonatadas e não carbonatadas usando como eluente metanol.

Ao longo dos tempos diferentes técnicas analíticas foram utilizadas para a deteção e quantificação do ACE – K, tais como a cromatografia gasosa. No entanto, a cromatografia gasosa é inadequada porque o edulcorante apresenta baixa volatilidade e a derivatização por metilação origina diferentes proporções de derivados de metilados (Lipinski & Hanger, 2001).

A cromatografia líquida acoplada a diferentes detetores tem sido a instrumentação analítica mais utilizada para a deteção e quantificação do ACE – K, sendo atualmente o detetor MS em tandem o mais comumente usado (Tabela 6).

A cromatografia líquida de interação hidrófila (HILIC) quando aplicado á separação do ACE – K revela uma baixa eficiência porque como este composto apresenta um grupo amino protonado a pH acima de 6, o pico é mais largo. Relativamente à cromatografia líquida de fase reversa (RPLC), os seus analitos possuem uma difusão menor e mais uniforme, analogamente à técnica HILIC (Kubica *et al.*, 2016).

Como se pode observar na Tabela 6, os limites de deteção (LODs) variam entre $2,0 \times 10^{-3}$ mg/L (Sakai *et al.*, 2015; Zygler *et al.*, 2011) e 1,1 mg/L (Kritsunankul & Jakmune, 2011), quando recorreram à LC – MS/MS, à HPLC – MS e à HPLC – UV, respetivamente. Os limites de quantificação (LOQs) oscilaram entre $5,0 \times 10^{-5}$ mg/L (Lorenzo *et al.*, 2015) e 3,6 mg/L (Kritsunankul & Jakmune, 2011) ao usarem LC – MS/MS-ESI e HPLC – UV, respetivamente.

Outros investigadores utilizaram a eletroforese capilar com deteção de condutividade sem contacto capacitivamente acoplada (CE – C4 D) que é uma excelente opção para a deteção de edulcorantes que não apresentam uma fração absorvente de UV forte (Bergamo *et al.*, 2011).

Tabela 6. Métodos de preparação da amostra, purificação, detecção e quantificação do acessulfame – K em bebidas.

Preparação da amostra	Purificação	Deteção e Quantificação	Coluna cromatográfica	Fase móvel	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Bibliografia
Banho ultrassónico (10 min)	Filtração (filtro de membrana de 0,45 µm); Centrifugação (3600 rpm, 10 min)	HPLC – MS/ESI	Coluna C18 (5 µm, 250 mm x 4,5 mm)	Mistura de metanol, solução tampão (0,8 mL de ácido fórmico e 1,5 mL de trietilamina em 1 L de água) e acetona. Fase A: 69:24:7 (v/v/v); Fase B: 11:82:7 (v/v/v).	0,02	0,05	Yang & Chen, 2009
Ultrassom (15 min)	Filtração (filtro de membrana 0,45 µm); Centrifugação (3400g, 15 min)	HPLC - UV	Coluna C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm)	Mistura 85:15 (v / v) de fosfato monopotássico 50 mM e acetonitrilo. Adição de ácido fosfórico para controlar o pH (4,2 - 4,3).	-	1,5	Diogo et al., 2013
Banho Ultrassónico (15 min). Diluição com água ultra pura.	Filtração a vácuo (membrana de 0,45 µm)	HPLC - UV (230 nm) com diálise online por injeção em fluxo (FID)	Coluna C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm)	Mistura de acetonitrilo, metanol e tampão de dihidrogénio fosfato de potássio 0,025 mol.L ⁻¹ , ajustada a pH 3,75 com ácido fosfórico 1 M (5:30:65, v/v/v).	0,1	0,3	Kritsunankul & Jakmunee, 2011
Banho Ultrassónico (15min). Diluição com água ultra pura.	Filtração a vácuo (membrana de 0,45µm).	HPLC - UV (230 nm)	Coluna C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm)	Mistura de acetonitrilo, metanol e tampão de dihidrogénio fosfato de potássio 0,025 mol.L ⁻¹ , ajustada a pH 3,75 com ácido fosfórico 1 M (5:30:65, v/v/v).	1,1	3,6	Kritsunankul & Jakmunee, 2011
Diluição da amostra com H ₂ O:MeOH 1:1 (v/v). Ultrassom (10 min).	Precipitação a frio (2h); Centrifugação (10 min, 13000 rpm); Filtração (filtro 0,45 µm); Diluição com H ₂ O.	LC – MS/ESI	Coluna C18 (5 µm, 150 mm x 2,1 mm)	Mistura de água (solvente A) e metanol (solvente B), com acetato de amónio 20 mM.	0,0025	0,01	Huvaere et al., 2011
Desgaseificação (10 min). Diluição a 50 ml com ácido fórmico – N,N – diisopropiletilamina (FA – DIPEA) (pH 4,5)	SPE – Strata – X RP. Eluição: 2 x 2 ml de MeOH.	HPLC - MS	Coluna C18 (5 µm, 250 x 3mm)	Mistura de metanol com solução tampão de formato (1,5 mL de ácido fórmico 20 mmol/L em 2 L de água) e acetona. Fase A: 69:24:7 (v/v/v). Fase B: 11:82:7 (v / v / v).	0,002	0,02	Zyglis et al., 2011

Tabela 6. Métodos de preparação da amostra, purificação, detecção e quantificação do acessulfame – K em bebidas (cont.).

Preparação da amostra	Purificação	Deteção e Quantificação	Coluna cromatográfica	Fase móvel	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Bibliografia
Diluição em ácido fórmico a 0,1 % em solução aquosa. Agitação (150 rpm, 5 min). Ultrassom (15 min).	-	LC – MS/MS	Coluna C18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm)	Ácido fórmico a 0,1% em solução aquosa (fase móvel A) e ácido fórmico a 0,1% em acetonitrilo (fase móvel B).	0,002	0,007	Sakai et al., 2015
Banho ultrassónico (40 min). Diluição com água ultra pura.	Filtração	Cromatografia líquida de alta temperatura acoplada a espectrometria de massa em tandem	Coluna Shodex ETRPI (4 µm, 3,0 x 150 mm). Gradiente de temperatura: 0–9 min: 110 °C até 150 °C (8 °C/min); 150 °C (6 min); 150 a 110 °C em 3 min (tempo total = 23 min).	Mistura de água e acetato de amónio 5 mM (fase A) e etanol (fase B).	0,05	0,17	Ordoñez et al., 2015
Diluição com MeOH:H2O (8:92, v/v). Banho ultrassónico (5 min).	Filtração (filtro de 0,22 µm)	UPLC - PDA (230 nm)	Coluna C18 (1,7 µm, 2,1 x 50 mm)	Sistema de solvente binário constituído por acetonitrilo e tampão fosfato (dissolução de 0,136 g em 1 l de água ultrapura. Ajustar o pH para 6, com solução de hidróxido de potássio). Eluição com gradiente.	-	0,01	Lorenzo et al., 2015
Diluição com MeOH:H2O (8:92, v/v). Banho ultrassónico (5 min).	Filtração (filtro de 0,22 µm)	LC – MS/MS - ESI	Coluna C8 (4,6 µm, 150 mm x 4,5 mm)	Fase A: água e acetato de amónio 20 mmol.L ⁻¹ . Fase B: metanol e acetato de amónio 20 mmol.L ⁻¹ . Eluição com gradiente.	-	5,0x10 ⁻⁵	Lorenzo et al., 2015
Sonificação (15 min). Diluição em mistura de água, metanol e acetona com ácido acético 0,1% (v/v) (75:20:5, v/v/v). Diluição 1:100	Centrifugação (7000 rpm, 5 min)	HPLC – MS/MS/ESI	Coluna C18 (2,7 µm, 100 mm x 4,6 mm)	Fase A: água, metanol e acetona com ácido acético 0,1% (v/v) (75:20:5, v/v/v). Fase B: acetonitrilo e acetona com ácido acético 0,1% (v/v) (95:5, v/v).	0,00452	0,0136	Kubica et al., 2015
Sonificação (15 min).	Centrifugação (7000 rpm, 5min)	RPLC – MS/MS	Coluna C18 (2,7 µm, 100 mm x 4,6 mm)	Fase A: metanol, água e acetona (20:75:5, v/v/v) com ácido acético 0,1% (v/v). Fase B: acetonitrilo e acetona (95:5, v/v) com ácido acético 0,1% (v/v). Eluição com gradiente.	0,00452	0,0136	Kubica et al., 2016
Sonificação (15 min).	Centrifugação (7000 rpm, 5min)	Cromatografia líquida de interação hidrófila acoplada à espectrometria de massa em tandem (HILIC – MS/MS)	Coluna Acclaim™ Trinity™ P2 (3 µm, 100 mm x 2,1 mm)	Fase A: 40 mM de acetato de amónio pH 6,8 Fase B: acetonitrilo com ácido acético 0,1% (v/v). Eluição com gradiente.	0,00214	0,00642	Kubica et al., 2016

I.4. Sacarina

I.4.1. História

A sacarina (SAC) foi descoberta em maio de 1878 pelos químicos Ira Remsen e Constantine Fahlberg, na Universidade Johns Hopkins, em Baltimore. Como parte do projeto de investigação de Remsen e através de uma análise elementar determinaram que o produto da oxidação da o – tolueno – sulfonamida em vez de ser o esperado ácido o – sulfamoilbenzóico era na verdade o heterociclo condensado de o – sulfobenzimida. Fahlberg descobriu, após derramar nas mãos uma solução e consumir pão ao jantar, que este novo composto possuía uma intensa doçura e afirmou no seu relatório: “Sie schmeckt angenehm süß, sogar süßer als der Rohrzucker” (Sabe agradavelmente a doce, ainda mais doce do que o açúcar-de-cana), apelidando - o de “sacarina de Fahlberg”. Originalmente, a sacarina foi utilizada como anti – séptico e conservante (Salminen & Hallikainen, 2001). Em 1885, numa exposição em Londres, Fahlberg demonstrou o poder edulcorante da sacarina (Pearson, 2001). No final do século XX foi o primeiro edulcorante de alta potência a ser comercializado nos EUA, bem como o primeiro produto da Monsanto Chemical Company liderada pelo John F. Queeny (DuBois & Prakash, 2012).

A qualidade que diferenciava a sacarina do açúcar, o facto de não apresentar nenhum valor alimentar ou calórico, foi motivo de críticas. No entanto nos EUA, o presidente Theodore Roosevelt apoiava a utilização deste edulcorante e afirmava que "qualquer um que diz que a sacarina é prejudicial para a saúde é um idiota!". O seu apoio chegou ao Sr. Queeny através de uma carta em 7 de julho de 1911, onde foi dito: “Eu usei por muitos anos como um substituto do açúcar no chá e no café sem sentir os menores efeitos negativos. Continuo a usá-lo agora: fielmente seu, T. Roosevelt” (Pearson, 2001).

Durante a Primeira Guerra Mundial, como consequência do racionamento do açúcar, aumentou a utilização de sacarina especialmente na Europa. Em 1917, na América e na Europa já era um edulcorante de mesa comum e seis anos mais tarde foi inserida no Extremo Oriente. A necessidade deste edulcorante alternativo voltou a ser evidente pela carência de açúcar no decorrer da Segunda Guerra Mundial, verificando-se novamente o aumento considerável da utilização da sacarina (Pearson, 2001).

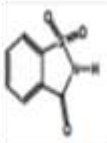
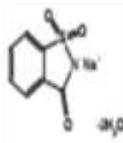
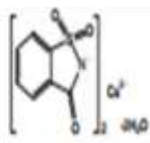
Indivíduos diabéticos são dos principais consumidores deste edulcorante sintético, visto que procuram tornar a sua dieta mais doce e apresentam restrições a nível do consumo de açúcares simples (Brito *et al.*, 2011).

Atualmente está disponível comercialmente sob três formas: sacarina ácida, de sódio e de cálcio. A sacarina alcançou uma posição de topo nos alimentos e bebidas, pelo facto de ser o único substituto do açúcar que se encontra em utilização há mais de um século (Pearson, 2001). No entanto, a inserção do aspártamo no mercado provocou uma significativa descida no consumo de sacarina (Salminen & Hallikainen, 2001).

1.4.2. Estrutura

A sacarina, cujo nome da IUPAC é 1,1 – dioxo – 1,2 – benzotiazol – 3 – ona, é uma imida o – sulfobenzóica que apresenta a fórmula química $C_7H_5NO_3S$ e o peso molecular de 183,18 g/mol (Salminen & Hallikainen, 2001). Através de cristalografia de Raios – X verificou-se que a forma ácida da sacarina é composta por dímeros com ligações de hidrogénio entre o hidrogénio imida e o oxigénio do grupo cetónico (Pearson, 2001). O sal de sódio apresenta a fórmula química $C_7H_4NO_3SNa \cdot 2H_2O$ e o de cálcio $C_{14}H_8N_2O_6S_2Ca \cdot 2H_2O$ (Tabela 7).

Tabela 7. Estrutura química, fórmula e peso molecular das três formas de sacarina comercialmente disponíveis: sacarina ácida, de sódio e de cálcio (Adaptado de DuBois, 2012).

Propriedades	Formas da sacarina		
	Ácida	Sal de sódio	Sal de cálcio
Estrutura química			
Fórmula molecular	$C_7H_5NO_3S$	$C_7H_4NO_3SNa \cdot 2H_2O$	$C_{14}H_8N_2O_6S_2Ca \cdot 2H_2O$
Peso molecular	183,18 (anidro)	241,20 (dihidratado)	440,48 (dihidratado)

1.4.3. Características

1.4.3.1. Físico – químicas

A sacarina é um ácido moderadamente forte, que existe sob a forma de um pó cristalino inodoro branco. O sacarinato de sódio é a forma mais utilizada pois apresenta alta

solubilidade, estabilidade e é mais rentável economicamente (Pearson, 2001). Tanto este sal, SAC – Na, como o sal de cálcio, SAC – Ca, são sólidos cristalinos brancos (DuBois & Prakash, 2012). Outros sais de sacarina foram identificados, nos quais se incluem prata, amónia, cobre, lítio, magnésio, zinco e potássio. Apesar de todos serem intensamente doces, nenhum se encontra disponível comercialmente. A intensidade do sabor doce pode ser eliminada pela substituição no azoto da sacarina (Pearson, 2001). A conformação ácida de SAC é pouco solúvel em água, 0,2 % a 20 °C, enquanto os seus sais são facilmente solúveis, nomeadamente 100 %, a 20 °C, para a SAC – Na e 37 %, a 20 °C, para a SAC – Ca (Tabela 8) (DuBois & Prakash, 2012).

Tabela 8. Propriedades físicas da sacarina ácida, de sódio e de cálcio (Adaptado de Pearson, 2001).

	Sacarina ácida	Sacarina de sódio	Sacarina de cálcio
Ponto de fusão (°C)	228 - 229	> 300	> 300
Aparência	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco
pKa	1,3	-	-
Solubilidade (g/100g água)			
20 °C	0,2	100	37
35 °C	0,4	143	82
50 °C	0,7	187	127
75 °C	1,3	254	202
90 °C	-	297	247

A sacarina e seus sais apresentam uma distinta estabilidade em soluções aquosas num imenso intervalo de pH e não apresentam decomposição detetável a longo prazo. A hidrólise da sacarina apenas ocorre em condições extremas, como temperaturas altas, pH alto e baixo, durante um tempo prolongado (Figura 11). Soluções de sacarina tamponada a pHs entre 3,3 – 8,0 sujeitas a aquecimento durante 1 hora a 150 °C mantem-se basicamente inalteradas (Pearson, 2001). A via de degradação é dependente do pH, pelo que o único produto da hidrólise em condições ácidas é o ácido 2 – sulfobenzóico e em condições básicas é o ácido 2 – sulfonamidobenzóico. A presença de vestígios dos anteriores compostos de degradação em amostras comerciais de sacarina indica uma possível degradação (DuBois, 2012).

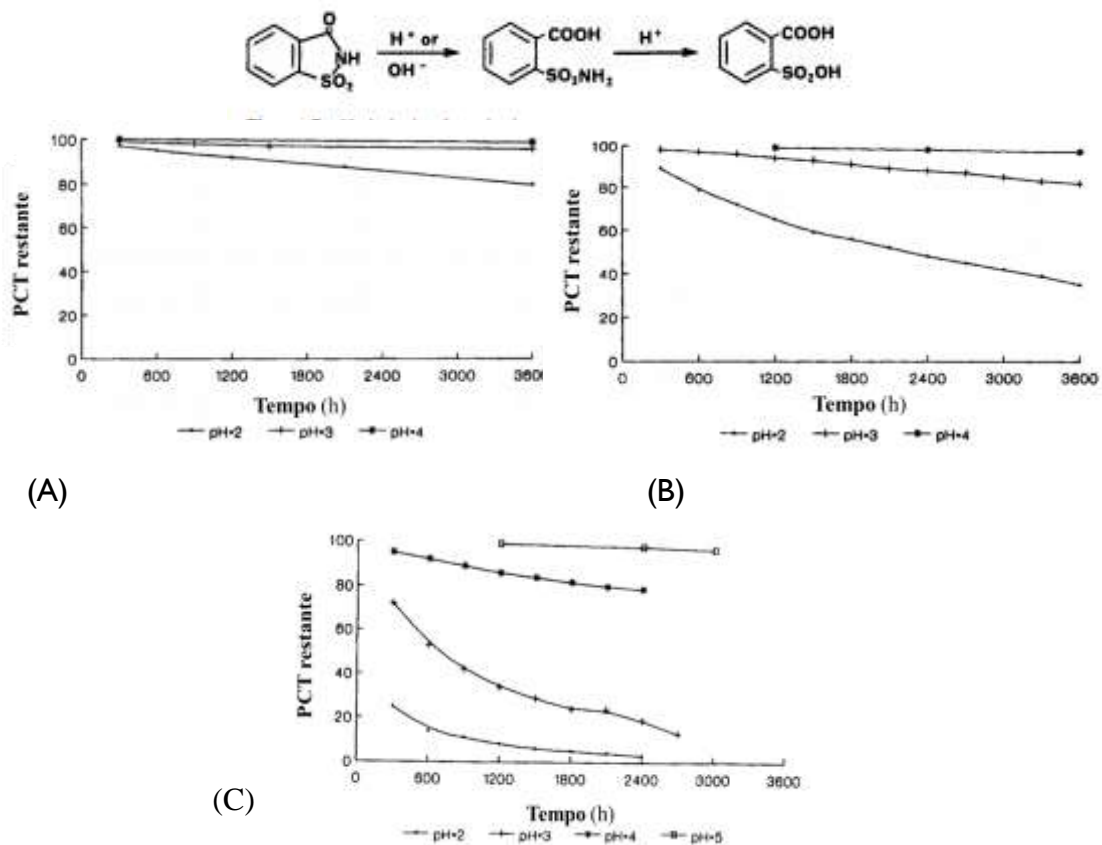


Figura 11. Reação de hidrólise da sacarina e gráficos representativos da reação a diferentes temperaturas, a 20°C (Gráfico A), a 40°C (Gráfico B) e a 80°C (Gráfico C) (Adaptado de Pearson, 2001).

1.4.3.2. Sensoriais

A sacarina é cerca de 300 vezes mais doce em relação ao açúcar de referência dissolvido em água a uma concentração de 7 % em peso. O seu poder edulcorante aumenta com a diminuição da concentração da sacarose (Figura 12) (Pearson, 2001).

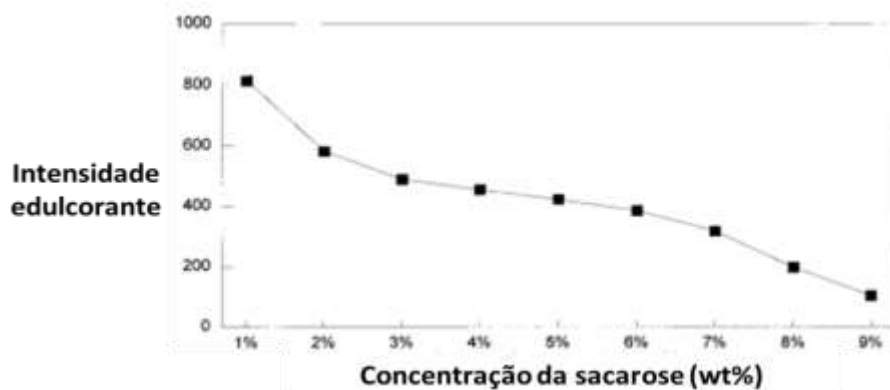


Figura 12. Intensidade edulcorante da sacarina comparativamente à concentração de sacarose (Adptado de Pearson, 2001).

De modo a impedir o gosto amargo, apenas reconhecido por certos indivíduos em concentrações mais altas, a sacarina é formulada com outros edulcorantes. O limite da quantidade de sacarina que pode ser adicionada numa mistura é cerca de 70 % porque a partir desse ponto aumenta o gosto amargo. A concentração do limiar do sabor doce é menor do que a concentração do limiar do sabor amargo. Ambas as anteriores concentrações dependem dos componentes da formulação. Este gosto amargo não se deve à presença de uma impureza, mas aparenta ser uma característica intrínseca à sua molécula e apenas 25 % da população é capaz de a detetar (Pearson, 2001).

As misturas compostas por sacarina e dulcina foram umas das primeiras e a combinação de 190 mg/L e 120 mg/L, respetivamente, permite obter um perfil de sabor doce semelhante ao de uma solução de 9 % de sacarose. De realçar que seriam necessários 450 mg/L de sacarina ou de 1250 mg/L de dulcina isoladamente para obter tal perfil edulcorante. Antes da sua proibição em 1969 nos EUA, o ciclamato de sódio era bastante utilizado com sacarina no mercado em crescimento exponencial dos refrigerantes dietéticos. O ciclamato isolado possui particularidades de sabor criticáveis e a sua combinação com a sacarina cria uma mistura sinérgica e reciprocamente benéfica. De notar que a mistura de proporção 10:1 de ciclamato e sacarina, respetivamente, possuem um perfil de sabor idêntico ao da sacarose. As misturas de SAC – Na ou de SAC – Ca com aspártamo foram substituindo o ciclamato, devido à sua proibição, nos refrigerantes de baixo teor calórico. A utilização do ião de cálcio em vez do ião de sódio provoca a mesma doçura com menor sensação de sabor amargo. Até a combinação com sacarose ou frutose originam produtos com baixo valor calórico e boas características de sabor, a baixo custo. Recentemente demonstrou – se, que a combinação entre a SAC – Ca e outros edulcorantes oferece uma melhor harmonia de sabor, porque este sal apresenta um gosto mais curto e limpo com menor sabor amargo. Uma outra solução para combater esta sensação amarga é a utilização de “agentes de máscara”, nos quais se incluem o creme tártaro e a dextrose (Pearson., 2001).

1.4.4. Metabolismo

A sacarina não é metabolizada pelo organismo humano e a nível da biotransformação a sacarina é expelida inalterada, principalmente por via urinária, cerca de 85 a 95 %, tanto em humanos como em animais de laboratório (Pearson, 2001). O processo fundamental de

eliminação renal da sacarina é o transporte tubular ativo. Após a ingestão, há uma ligação reversível entre a sacarina e as proteínas plasmáticas, que é posteriormente distribuída até aos órgãos pela corrente sanguínea (Figura 13). Verifica-se um equilíbrio entre as concentrações da sacarina nos tecidos e no plasma sanguíneo, portanto a concentração está dependente dos níveis da circulação geral e a concentração plasmática máxima ocorre após 30 min a 1 h. A eliminação da circulação geral é rápida, uma vez que a sacarina apresenta uma semi-vida plasmática de aproximadamente 70 minutos em humanos (Britos *et al.*, 2011; Magnuson *et al.*, 2016).

A sacarina pode surgir no tecido fetal através de transferência pela placenta. Os níveis de sacarina no tecido fetal são idênticos ou ligeiramente superiores aos dos maternos e as concentrações diminuem mais demoradamente no tecido fetal. Durante a administração repetida, o feto não acumula sacarina e exibe um equilíbrio lento (Magnuson *et al.*, 2016).

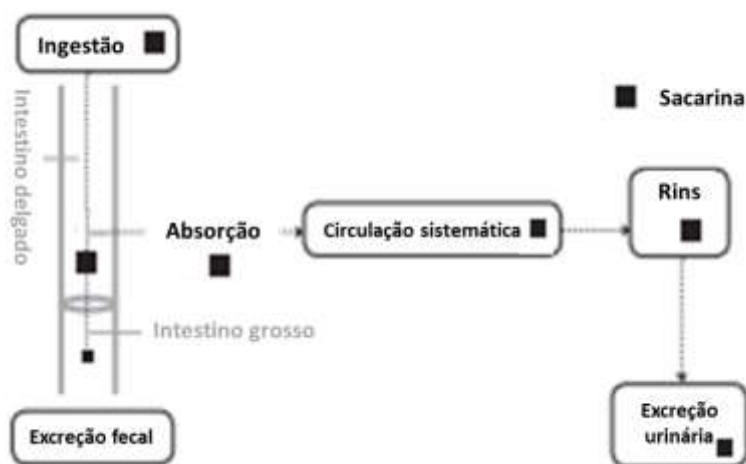


Figura 13. Metabolismo da sacarina (Adaptado de Magnuson *et al.*, 2013).

1.4.5. Toxicidade

Nauséas, vômitos e diarreia são exemplos de manifestações de toxicidade aguda relacionadas com a ação da sacarina em humanos (Whitehouse *et al.*, 2008).

A nível da toxicidade crónica, o consumo de altas doses de sacarina de sódio provoca tumores na bexiga de ratos macho, pela formação de um precipitado de fosfato de cálcio citotóxico para o urotélio, posteriormente ocorre hiperplasia regenerativa que perdura a

vida inteira do animal e, se a ingestão de sacarina de sódio prosseguir, resulta na formação de tumor (Pearson, 2001). Comparativamente à SAC – Ca e SAC ácida, a SAC – Na é a promotora de tumor mais relevante, pelo que este efeito cancerígeno é aparentemente dependente do catião envolvido (Ditschun & Winter, 2000). Em humanos, tendo como exemplo a análise longitudinal da ocorrência de cancro da bexiga durante a Segunda Guerra Mundial no Reino Unido, ficou demonstrado que o maior consumo de sacarina neste período não estava relacionado com o aumento da incidência desta patologia (Weihrauch & Diehl, 2004). Em 1997, um painel especial da International Agency for Research on Cancer (IARC) relatou que estes tumores provocados pelo consumo de doses elevadas de SAC – Na não afetam o homem e, um ano depois, a IARC retirou a sacarina do Grupo 2B, possivelmente cancerígena para o ser humano, passando a incluí-la no Grupo 3 (Pearson, 2001).

Em 1888, um artigo publicado na *Revue Internationale des Falsifications* mencionou que a sacarina afectaria negativamente a digestão em três níveis distintos: a digestão instestinal, a do estômago, particularmente a conversão da albumina em peptonas, e a ação dos fermentos salivares. No entanto, os anteriores efeitos sobre a digestão apenas são atingíveis em doses consideradas impossíveis, ou seja excessivamente elevadas de sacarina, e também pelo facto de a sacarina ser rapidamente absorvida e excretada pela urina (Guillem-Llobat, 2012). O consumo de sacarina num período contínuo de 7 dias por indivíduos magros que não consomem regularmente edulcorantes não calóricos induz deficiência na tolerância à glucose (Kuk & Brown, 2016).

Em 1994, um caso de hepatotoxicidade em que se verificou concentrações séricas altíssimas de enzimas hepáticas foi descrito num indivíduo, após a administração oral de três fármacos distintos, a única característica análoga a todos era a utilização de sacarina como componente integrante. A ação da SAC na patogénese nociva no fígado foi confirmada pela re-exposição à sacarina na sua forma pura (Whitehouse *et al.*, 2008).

O microbioma é um ecossistema microbiano denso e diversificado presente no organismo humano desde o nascimento e é responsável pela susceptibilidade a bastantes condições fisiopatológicas. O consumo de sacarina foi relacionado com a variação da composição da taxa bacteriana, precedentemente associada a diabetes tipo II em humanos, nomeadamente

o género *Bacteroides* e a ordem *Clostridiales*. Verificou – se um melhoramento das vias envolvidas no metabolismo dos compostos heterocíclicos pelo consumo deste edulcorante não nutritivo e uma redução dos genes dos sistemas de fosfotranferase (PTS), envolvidos no transporte de açúcares para a célula bacteriana. As diferenças na composição e função dos microbiomas dos distintos animais em diferentes instalações possivelmente contribuem para a variabilidade dos resultados e interpretações dos estudos até ao momento publicados (Burkea & Small, 2015; Suez *et al.*, 2015).

1.4.6. Legislação

A persistente falta de açúcar existente no decorrer da Primeira Guerra Mundial permitiu a reintegração da sacarina, anteriormente proibida durante um curto período de tempo. O status GRAS foi atribuído à sacarina em 1958, mas devido à relação observada entre o consumo de sacarina e o cancro de bexiga em ratos aquele foi removido em 1972. A FDA recomendou a proibição deste edulcorante em 1977, no entanto este edulcorante intensivo manteve – se comercialmente disponível devido à pressão dos consumidores e da indústria (Ditschun & Winter, 2000). Até ao final do século XX era comercializada com uma advertência que mencionava os anteriores sinais cancerígenos. No início do presente século, a sacarina foi retirada da lista de compostos carcinogénicos humanos da National Toxicology Program (NTP) e a advertência foi removida (Brito *et al.*, 2011).

1.4.6.1. Níveis máximos permitidos

As doses máximas de utilização da SAC e dos seus sais de Na, K e Ca são expressas em imida livre e estão estabelecidas para 42 géneros alimentícios (Tabela 9) (Decreto-Lei n.º 394/98). Para os refrigerantes (tradicional, à base de extratos de chá e de águas minerais), bebidas desportivas, bebidas energéticas e néctares está estabelecida uma dose máxima de utilização de 80 mg/l, sendo que para bebidas com adição de ácido carbónico a dose é de 100 mg/l. Os produtos de microconfeitaria para refrescar o hálito, sem adição de açúcares apresentam uma dose máxima de 3000 mg/kg, o que corresponde à maior dose estabelecida para este edulcorante, no outro extremo a menor, 80 mg/L, é bastante comum, tendo sido estabelecido para 10 géneros alimentícios, nos quais se incluem bebidas constituídas por

uma mistura de cerveja, sidra, perada, bebidas espirituosas ou vinho e bebidas não alcoólicas ou mesmo cervejas sem álcool ou com um teor alcoólico não superior a 1,2 % vol.

Tabela 9. Doses máximas estabelecidas pelo Decreto-Lei n.º 394/98 para a utilização de sacarina nos produtos alimentares mencionados.

Sacarina e seus sais de Na, K e Ca (E954)	
Produtos alimentares	Doses máximas de utilização
Bebidas aromatizadas à base de água com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	80 mg/L
Bebidas à base de leite e produtos derivados ou sumos de fruta, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	80 mg/L
«Gaseosa»: bebida não alcoólica à base de água, com adição de ácido carbónico, edulcorantes e aromas	100 mg/L
Sobremesas aromatizadas à base de água com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	100 mg/kg
Preparados à base de leite e produtos derivados, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	100 mg/kg
Sobremesas à base de fruta e produtos hortícolas, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	100 mg/kg
Sobremesas à base de ovos com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	100 mg/kg
Sobremesas à base de cereais com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	100 mg/kg
Sobremesas à base de gorduras com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	100 mg/kg
Snacks: aperitivos salgados e secos à base de amido ou de nozes e avelãs, pré-embalados e que contenham certos aromas	100 mg/kg
Confeitaria sem adição de açúcares	500 mg/kg
Confeitaria à base de cacau ou frutos secos, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	500 mg/kg
Confeitaria à base de amido, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	300 mg/kg
Hóstias	800 mg/kg
Preparados para barrar pão à base de cacau, leite, frutos secos ou gorduras, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	200 mg/kg
Pastilhas elásticas sem adição de açúcares	1200 mg/kg
Sidra e perada	80 mg/L
Cervejas sem álcool ou com um teor alcoólico não superior a 1,2 % vol.	80 mg/L
Bière de table/ Tafelbier/table beer (com um teor original de mosto não superior a 6 %), com exclusão da Obergär'riges Einfachbier	80 mg/L
Cervejas com acidez mínima de 30 mil equivalentes expressa em Na OH	80 mg/L
Cervejas pretas do tipo oud bruin	80 mg/L
Gelados alimentares, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	100 mg/kg
Fruta em lata ou frasco, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	200 mg/kg
Compotas, geleias e marmeladas com baixo valor energético	200 mg/kg
Preparados de fruta e produtos hortícolas, com baixo valor energético	200 mg/kg
Conservas agrídoces de fruta e produtos hortícolas	160 mg/kg
Conservas e semiconservas agrídoces de peixe e marinadas de peixe, crustáceos e moluscos	160 mg/kg
Molhos	160 mg/kg
Mostarda	320 mg/kg
Produtos de padaria fina para alimentação especial	170 mg/kg
Preparados completos de regime para controlo do peso destinados a substituir uma refeição ou o regime alimentar diário	240 mg/kg
Preparados completos e suplementos nutritivos para utilização sob vigilância médica	200 mg/kg
Suplementos alimentares/constituintes líquidos dietéticos	80 mg/L
Suplementos alimentares/constituintes sólidos de um regime dietético	500 mg/kg
Complementos alimentares/integrantes de regimes dietéticos à base de vitaminas e ou elementos minerais em xarope ou para mastigar	1200 mg/kg
Cereais de pequeno-almoço com teor de fibras superior a 15 %, contendo pelo menos 20 % de farelo, de baixo valor energético ou sem adição de açúcares	100 mg/kg
Caldos de baixo valor energético	110 mg/L
Produtos de microconfeitaria para refrescar o hálito, sem adição de açúcares	3000 mg/kg
Bebidas constituídas por uma mistura de cerveja, cidra, perada, bebidas espirituosas ou vinho e bebidas não alcoólicas	80 mg/L
Bebidas espirituosas com um teor de álcool inferior a 15 % vol.	80 mg/kg
Cornetos e bolachas sem açúcar para gelados	800 mg/kg
Feinkostsalat	160 mg/kg

I.4.6.2. Ingestão Diária Aceitável

A JEFCA estabeleceu uma ADI de 2,5 mg / kg de peso corporal / dia para a sacarina (Ditschun & Winter, 2000). A FDA delimitou uma maior ingestão dietética adequada, 5 mg/kg de peso corporal por dia para adultos e crianças. Aparenta ser altamente improvável que qualquer população exceda a ADI para este edulcorante tão intenso, porque mesmo o consumo diário de 8,5 pacotes deste edulcorante de mesa ao longo da vida de um indivíduo não põe em causa a ADI estabelecida. Além disso, o consumidor médio não excede a ingestão de 0,0283495 kg de sacarina por ano (Shankar *et al*, 2013).

Lino & Pena (2010) verificaram que o consumo de sacarina através da ingestão de refrigerantes tradicionais pela população portuguesa, com idades entre os 13 e os 15 anos, apenas representa 1,28 % da ADI, dos valores mais baixos na Europa, sendo que os refrigerantes à base de águas minerais não representavam qualquer fonte deste edulcorante. Tendo em conta a população adulta portuguesa, Diogo *et al.* (2013) revelou que o consumo de néctares é reponsável por 0,9 % da ADI da SAC e tanto os refrigerantes tradicionais como os à base de águas minerais representam 0,5 % da ADI, e tal como referido em 2010 as bebidas energéticas neste caso também não são fonte de SAC. Na Bélgica, a população adulta com pelo menos 15 anos apenas estava exposta a 2 % da ADI da sacarina através do consumo de diferentes matrizes alimentares, das quais são exemplo as bebidas não alcoólicas (Huvaere *et al.*, 2011). Donne *et al.* (2017) verificou que a população italiana estava exposta apenas a 0,5 % da ADI estabelecida para a SAC, valor relativamente inferior aos descritos em Portugal (Lino & Pena, 2010) e na Bélgica (Huvaere *et al.*, 2011), sendo que apenas 8 % desta exposição se deve a bebidas não alcoólicas, visto a principal fonte de sacarina nesta população estar associada a edulcorantes de mesa (80 %).

I.4.7. Ocorrência

Vários grupos de investigadores em diversos países têm - se debruçado sobre a avaliação dos teores de SAC em refrigerantes e néctares (Tabela 10).

De acordo com a legislação da UE, as amostras analisadas na Dinamarca, Bélgica e Itália não revelam preocupação, visto que as concentrações de SAC utilizadas não excedem o limite máximo estipulado. Janvier *et al.* (2015) em Itália verificaram a ausência de SAC nas

amostras de néctares analisadas e mesmo em bebidas aromatizadas a concentração destas apresentou uma média de 40 mg/L. Tanto na Bélgica como na Dinamarca, a incorporação de SAC nos diferentes refrigerantes é relativamente baixa, verificando-se a ausência de utilização de sacarina em refrigerantes e em refrigerantes carbonatados, quando ambos apresentam açúcar (Leth *et al.*, 2007) e em águas aromatizadas, bebidas desportivas e energéticas (Huvaere *et al.*, 2011). Na Polónia, Zygler *et al.* (2011) também não detetaram SAC em refrigerantes, mas por outro lado identificaram uma amostra de refrigerante carbonatado com uma concentração de 173,7 mg/L, valor que excede a dose máxima de utilização permitida na UE. Em Portugal, Lino & Pena (2010) não identificaram SAC em refrigerantes à base de água minerais e de néctares, no entanto em refrigerantes detetaram uma amostra que excedia o limite máximo estabelecido de 80 mg/L, visto apresentar uma concentração de 89 mg/L. Ainda em Portugal, Diogo *et al.* (2013) detetaram resultados muito semelhantes a nível da concentração de SAC numa amostra de refrigerantes, visto esta exceder o limite ligeiramente em 0,5 mg/L. Também encontraram uma baixa frequência de SAC tanto em refrigerantes à base de águas minerais como em néctares, 0,02 e 0,06 %, respetivamente e uma total ausência de bebidas energéticas. Apesar destes casos em Portugal e na Polónia, a SAC aparenta ser encontrada em pequenas quantidades, isto porque é utilizada em combinação com outros edulcorantes.

Kritsunankul & Jakmune (2011) não detetaram SAC em amostras de refrigerantes e em refrigerantes à base de extratos de chá recolhidas na Tailândia. Na China, Zhu *et al.* (2005) também observaram uma situação idêntica, mas em sumos de fruta. Porém, neste país os níveis máximos permitidos são superiores aos estabelecidos na Europa, 150 mg/L, tendo mesmo assim as concentrações encontradas em duas amostras de refrigerantes, 187,45 e 546,17 mg/L, excedido os valores permitidos naquele país (Chinese Standards for Food Additives GB2760, 2015).

No Brasil, apesar das concentrações superiores identificadas por Bergamo *et al.* (2011) relativamente aos limites estabelecidos na UE, a presença de SAC com teores entre 126-147 mg/L nas duas amostras de refrigerantes encontra-se próxima mas não excede os níveis máximos de 150 mg/L adoptados por este país da América do Sul (RDC N.º.18, de 24 de Março de 2008). Nos EUA, Shah *et al.* (2014) determinou a presença de SAC em 22,2 % das amostras de refrigerantes carbonatados com teores entre os 87 – 156 mg/L, no

entanto este edulcorante encontra-se totalmente ausente das seis amostras de refrigerantes não carbonatados analisados.

Tabela 10. Frequência (%) e níveis (mg/L) da sacarina em bebidas.

País	Tipo de Bebida	Nº de Amostras	Frequência (%)	Níveis (mg/L)		Bibliografia
				Min - Máx	Média	
Portugal	Refrigerantes	25	24	55 – 89	75 ± 14	Lino & Pena, 2010
	Refrigerantes à base de águas minerais	13	0	-	-	
	Néctares	10	0	-	-	
	Refrigerantes	59	20,3	26,5 – 80,5	18,4	Diogo et al., 2013
	Refrigerantes à base de águas minerais		0,02	0 – 3,2	0,2	
	Bebidas energéticas		0	-	-	
Néctares	0,06		0 – 13,6	0,8		
Dinamarca	Refrigerantes carbonatados (sem açúcar)	21	52,4	7 – 58	29	Leth et al., 2007
	Refrigerantes carbonatados	15	0	-	-	
	Refrigerantes (sem açúcar)	60	70	15 – 65	37	
	Refrigerantes	20	0	-	-	
Polónia	Refrigerantes	4	0	-	-	Zygler et al., 2011
	Refrigerantes carbonatados	7	29	11,6 – 173,7	92,65	
	Sumos	3	66,7	20,7 – 44,1	32,4	
Bélgica	Águas aromatizadas	5	-	-	-	Huvaere et al., 2011
	Bebidas carbonatadas	19	-	-	27	
	Bebidas à base de sumos de fruta	14	-	-	33	
	Bebidas desportivas	2	-	-	-	
	Bebidas energéticas	2	-	-	-	
Itália	Bebidas aromatizadas	57	0,07	-	40 ± 13	Janvier et al., 2015
	Néctares	18	-	-	-	
China	Refrigerantes carbonatados	2	100	187,45 – 576,17	381,81	Zhu et al., 2005
	Sumo de fruta	1	0	-	-	
Tailândia	Refrigerantes	4	0	-	-	Kritsunankul & Jakmune, 2011
	Refrigerantes à base de extratos de chá	2	0	-	-	
USA	Refrigerantes carbonatados	9	22,2	87 – 156	121,5	Shah et al., 2014
	Refrigerantes não carbonatados	6	0	-	-	
Brasil	Refrigerantes	3	66,7	126 – 147	136,5	Bergamo et al., 2011

I.4.8. Metodologias analíticas

Tal como mencionado para o anterior edulcorante, a preparação de amostras de bebidas carbonatadas e de néctares pode ser realizada através da diluição destas com água ultra pura (Kritsunankul & Jakmune, 2011; Ordoñez *et al.*, 2015), outros investigadores utilizam misturas de água, metanol, acetona e ácido acético (Kubica *et al.*, 2015), ácido fórmico em solução aquosa (Sakai *et al.*, 2015), água com metanol, em proporções diferentes (Huvaere *et al.*, 2011; Lorenzo *et al.*, 2015) e até ácido fórmico – *N,N* – diisopropiletilamina (FA – DIPEA) como solvente (Zygler *et al.*, 2011). A desgaseificação em banho de ultrassons (5' a 15') também é bastante utilizada quer como processo individual para preparar a amostra quer como procedimento complementar a realizar anteriormente ou posteriormente às diversas diluições relatadas na literatura (Diogo *et al.*, 2013; Huvaere *et al.*, 2011; Kritsunankul & Jakmune, 2011; Kubica *et al.*, 2015; Kubica *et al.*, 2016; Lorenzo *et al.*, 2015; Ordoñez *et al.*, 2015; Sakai *et al.*, 2015; Yang & Chen, 2009; Zygler *et al.*, 2011) (Tabela 11) [ver I.3.8].

A filtração através de filtros de membrana de 0,45 µm (Kritsunankul & Jakmune, 2011) ou de 0,22 µm (Lorenzo *et al.*, 2015) é utilizada como procedimento único de purificação das amostras de refrigerantes e néctares pela maioria dos investigadores. A centrifugação é utilizada principalmente após a filtração para amostras de néctares, aplicando forças centrífugas que variam entre 3600 rpm (10') (Yang & Chen, 2009) a 13 000 rpm (10') (Huvaere *et al.*, 2011) Verifica-se o mesmo para a purificação de amostras que contenham acesulfame - K [ver I.3.8].

A HPLC de fase reversa com deteção por UV a 254 nm é um dos métodos usados para detetar o conteúdo de sacarina em alimentos e bebidas. Outros métodos abrangem a HPLC por exclusão de iões e a cromatografia iónica, ambos com deteção por UV (DuBois, 2012).

A Espectroscopia Raman de superfície melhorada (SERS) surgiu como uma técnica alternativa e a sua sensibilidade depende bastante do aperfeiçoamento eletromagnético e químico na presença de nanoestruturas metálicas (Cu, Ag, Au, entre outras), portanto o aspeto mais crítico deste método é a selecção e/ou produção dos substratos metálicos

nobres. Han *et al.* (2017) aplicaram com sucesso a anterior técnica e determinaram um LOD de 0,3 mg/L e um LOQ de 0,8 mg/L.

Analisando os limites de detecção presentes na Tabela II, verifica-se que este parâmetro varia entre 0,00081 mg/L (Kubica *et al.*, 2016) e 10 mg/L (Ordoñez *et al.*, 2015), quando utilizaram a HILIC – MS/MS e cromatografia líquida de alta temperatura acoplada a espectrometria de massa em tandem respetivamente. No que diz respeito aos limites de quantificação (LOQs), o menor, 0,0001 mg/L, foi relatado por Lorenzo *et al.* (2015) utilizando a técnica LC – MS/MS – ESI, enquanto no outro extremo, tal como se verificou para o LOD, Ordoñez *et al.* (2015) através da cromatografia líquida de alta temperatura acoplada a espectrometria de massa em tandem reportou o valor de 33,3 mg/L.

Tabela 11. Métodos de preparação da amostra, purificação, detecção e quantificação da sacarina em bebidas.

Preparação da amostra	Purificação	Deteção e Quantificação	Coluna cromatográfica	Fase móvel	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Bibliografia
Banho ultrassónico (10 min)	Filtração (filtro de membrana de 0,45 µm); Centrifugação (3600 rpm, 10 min)	HPLC – MS/ESI	Coluna C18 (5 µm, 250 mm x 4,5 mm)	Mistura de metanol, solução tampão (0,8 mL de ácido fórmico e 1,5 mL de trietilamina em 1 L de água) e acetona. Fase A: 69:24:7 (v/v/v); Fase B: 11:82:7 (v/v/v).	0,01	0,03	Yang & Chen, 2009
Ultrassom (15 min)	Filtração (filtro de membrana 0,45 µm); Centrifugação (3400g, 15 min)	HPLC - UV	Coluna C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm)	Mistura 85:15 (v / v) de fosfato monopotássico 50 mM e acetoneitrilo. Adição de ácido fosfórico para controlar o pH (4,2 - 4,3).	-	3,0	Diogo et al., 2013
Banho Ultrassónico (15 min). Diluição com água ultra pura.	Filtração a vácuo (membrana de 0,45 µm)	HPLC - UV (230 nm) com diálise online por injeção em fluxo (FID)	Coluna C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm)	Mistura de acetoneitrilo, metanol e tampão de dihidrogénio fosfato de potássio 0,025 mol.L ⁻¹ , ajustada a pH 3,75 com ácido fosfórico 1 M (5:30:65, v/v/v).	0,1	0,3	Kritsunankul & Jakmunee, 2011
Banho Ultrassónico (15min). Diluição com água ultra pura.	Filtração a vácuo (membrana de 0,45µm).	HPLC - UV (230 nm)	Coluna C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm)	Mistura de acetoneitrilo, metanol e tampão de dihidrogénio fosfato de potássio 0,025 mol.L ⁻¹ , ajustada a pH 3,75 com ácido fosfórico 1 M (5:30:65, v/v/v).	1,2	4,0	Kritsunankul & Jakmunee, 2011
Diluição da amostra com H ₂ O:MeOH 1:1 (v/v). Ultrassom (10 min).	Precipitação a frio (2h); Centrifugação (10 min, 13000 rpm); Filtração (filtro 0,45 µm); Diluição com H ₂ O.	LC – MS/ESI	Coluna C18 (5 µm, 150 mm x 2,1 mm)	Mistura de água (solvente A) e metanol (solvente B), com acetato de amónio 20 mM.	0,005	0,02	Huvaere et al., 2011
Desgasificação (10 min). Diluição a 50 ml com ácido fórmico – N/N – diisopropiletilamina (FA – DIPEA) (pH 4,5)	SPE – Strata – X RP. Eluição: 2 x 2 ml de MeOH.	HPLC - MS	Coluna C18 (5 µm, 250 x 3mm)	Mistura de metanol com solução tampão de formato (1,5 mL de ácido fórmico 20 mmol/L em 2 L de água) e acetona. Fase A: 69:24:7 (v/v/v). Fase B: 11:82:7 (v / v / v).	0,001	0,03	Zyglis et al., 2011

Tabela 11. Métodos de preparação da amostra, purificação, detecção e quantificação da sacarina em bebidas (cont.).

Preparação da amostra	Purificação	Deteção e Quantificação	Coluna cromatográfica	Fase móvel	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Bibliografia
Diluição em ácido fórmico a 0,1 % em solução aquosa. Agitação (150 rpm, 5 min). Ultrassom (15 min).	-	LC – MS/MS	Coluna C18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm)	Ácido fórmico a 0,1% em solução aquosa (fase móvel A) e ácido fórmico a 0,1% em acetonitrilo (fase móvel B).	0,02	0,06	Sakai et al., 2015
Banho ultrassónico (40 min). Diluição com água ultra pura.	Filtração	Cromatografia líquida de alta temperatura acoplada a espectrometria de massa em tandem	Coluna Shodex ETRPI (4 µm, 3,0 x 150 mm). Gradiente de temperatura: 0–9 min: 110 °C até 150 °C (8 °C/min); 150 °C (6 min); 150 a 110 °C em 3 min (tempo total = 23 min).	Mistura de água e acetato de amónio 5 mM (fase A) e etanol (fase B).	10	33,3	Ordoñez et al., 2015
Diluição com MeOH:H2O (8:92, v/v). Banho ultrassónico (5 min).	Filtração (filtro de 0,22 µm)	UPLC - PDA (230 nm)	Coluna C18 (1,7 µm, 2,1 x 50 mm)	Sistema de solvente binário constituído por acetonitrilo e tampão fosfato (dissolução de 0,136 g em 1 l de água ultrapura. Ajustar o pH para 6, com solução de hidróxido de potássio). Eluição com gradiente.	-	0,01	Lorenzo et al., 2015
Diluição com MeOH:H2O (8:92, v/v). Banho ultrassónico (5 min).	Filtração (filtro de 0,22 µm)	LC – MS/MS - ESI	Coluna C8 (4,6 µm, 150 mm x 4,5 mm)	Fase A: água e acetato de amónio 20 mmol.L ⁻¹ . Fase B: metanol e acetato de amónio 20 mmol.L ⁻¹ . Eluição com gradiente.	-	0,0001	Lorenzo et al., 2015
Sonificação (15 min). Diluição em mistura de água, metanol e acetona com ácido acético 0,1% (v/v) (75:20:5, v/v/v). Diluição 1:100	Centrifugação (7000 rpm, 5 min)	HPLC – MS/MS/ESI	Coluna C18 (2,7 µm, 100 mm x 4,6 mm)	Fase A: água, metanol e acetona com ácido acético 0,1% (v/v) (75:20:5, v/v/v). Fase B: acetonitrilo e acetona com ácido acético 0,1% (v/v) (95:5, v/v).	0,00132	0,00395	Kubica et al., 2015
Sonificação (15 min).	Centrifugação (7000 rpm, 5 min)	RPLC – MS/MS	Coluna C18 (2,7 µm, 100 mm x 4,6 mm)	Fase A: metanol, água e acetona (20:75:5, v/v/v) com ácido acético 0,1% (v/v). Fase B: acetonitrilo e acetona (95:5, v/v) com ácido acético 0,1% (v/v). Eluição com gradiente.	0,0132	0,00395	Kubica et al., 2016
Sonificação (15 min).	Centrifugação (7000 rpm, 5 min)	Cromatografia líquida de interação hidrófila acoplada à espectrometria de massa em tandem (HILIC – MS/MS)	Coluna Acclaim™ Trinity™ P2 (3 µm, 100 mm x 2,1 mm)	Fase A: 40 mM de acetato de amónio pH 6,8 Fase B: acetonitrilo com ácido acético 0,1% (v/v). Eluição com gradiente.	0,00081	0,00242	Kubica et al., 2016
Aquecimento (5 min)	Vórtex (1 min)	Espectroscopia raman de superfície melhorada (SERS)	-	-	0,3	0,8	Han et al., 2017

1.5. Aspártamo

1.5.1. História

O aspártamo (ASP) foi descoberto acidentalmente, em 1965, pelo químico James Schlatter quando testava fármacos usados no tratamento de úlceras e comercializado pela Searle Pharmaceutical Company, com a marca Nutrasweet (Almeida *et al.*, 2010; DuBois & Prakash, 2012; Progolliet & Bruelhart, 1993). Ao aquecer um frasco que possuía metanol e aquele composto, no momento ainda desconhecido, parte da mistura caiu – lhe nos dedos e, alguns minutos depois, ao levar o dedo á boca para folhear um livro descobriu a intensidade extraordinariamente doce do aspártamo (Souto, 2009).

No começo da década de 80, o ASP foi autorizado em diversos países como edulcorante, particularmente como alternativo à sacarina e ao ciclamato (Salminen & Hallikainen, 2001). Atualmente é o edulcorante de alta potência mais utilizado em cerca de 6000 produtos comercializados por todo o mundo (Butchko *et al.*, 2001). Nos EUA são produzidos anualmente cerca de 16000 toneladas destinadas ao consumo mundial (Kokotou *et al.*, 2015).

1.5.2. Estrutura

O aspártamo é um dipéptido constituído por dois aminoácidos, ácido L – aspártico e L – fenilalanina, como se pode observar na Figura 14 (Pearson, 2001). Quimicamente é o éster metílico da L – aspartil – L – fenilalanina (Salminen & Hallikainen, 2001). Apresenta duas configurações, α e β , mas apenas a primeira é doce (Kirkland & Gatehouse, 2015).

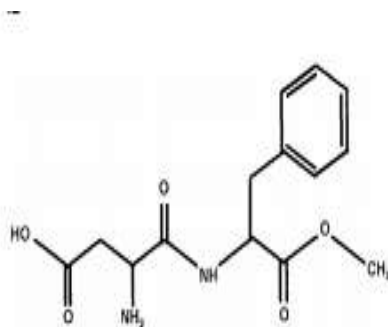


Figura 14. Estrutura química do aspártamo (Nabors, 2001).

1.5.3. Características

1.5.3.1. Físico – químicas

O ASP é um sólido cristalino. Em solução, a estabilidade deste éster dipeptídico segue uma curva em forma de sino, sendo influenciada pelo pH, com estabilidade máxima observada a valores de pH de aproximadamente 4,3, à qual a maioria dos alimentos se encontra. Para valores de pHs básicos hidrolisa-se formando o dipéptido aspartilfenilalanina e metanol. Posteriormente sofre uma transformação lenta no seu isómero β -aspartilfenilalanina (DuBois & Prakash, 2012). Os aminoácidos ácido aspártico e fenilalanina podem ser formados pela hidrólise do dipéptido aspartilfenilalanina. Os produtos de conversão do ASP são insípidos (Butchko *et al.*, 2001).

Para valores de pH 3, o ASP é instável e hidrolisa-se a aspartilfenilalanina e, para pH > 6 transforma-se em ácido 5 – benzil – 3,6 – dioxo – 2 – piperazinaacético (Figura 15) (Kokotou *et al.*, 2015).

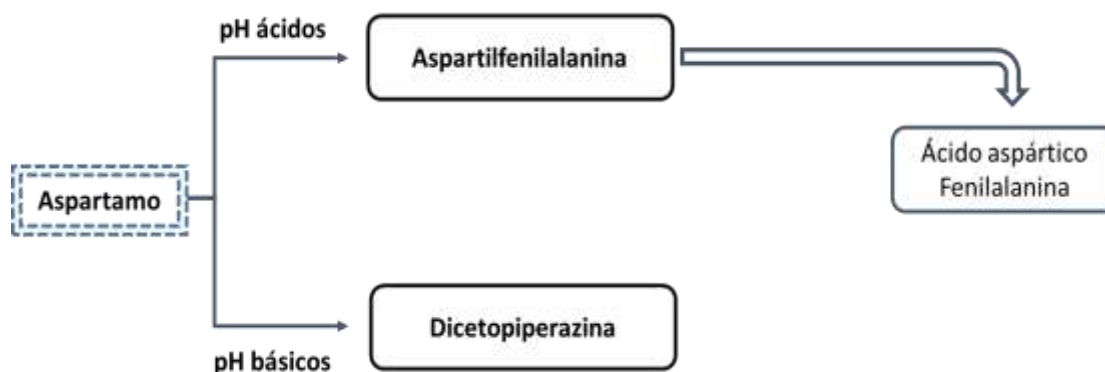


Figura 15. Principais produtos de hidrólise do aspártamo, conforme o pH do meio (Adaptado de Klug & Lipinski, 2012).

Para além do pH, fatores como o tempo, a humidade e a temperatura afetam a estabilidade do ASP e podem levar a uma carência progressiva do sabor doce. A hidrólise deste é indicadora de cinética de primeira ordem. A sua estabilidade é colocada em causa em circunstâncias húmidas, em concreto em sistemas com mais de 8 % de humidade, e temperaturas excessivamente elevadas perturbam estas situações de equilíbrio. Por outro lado, em produtos lácteos congelados que apresentam pH neutro, a taxa de reação é incrivelmente diminuída devido ao estado de congelamento e pela inferior humidade livre. Além disso a estabilidade de prateleira prevista do ASP não é alcançada. O potencial de

hidrólise acaba por limitar as aplicações do ASP (Butchko *et al.*, 2001). A sua estabilidade pode melhorar ao longo do tempo pela adição de isomaltose. Um dos métodos de eleição para minimizar as perdas deste edulcorante é o sistema de alta temperatura a curto prazo (HTST) (O' Donnell, 2012).

Quanto à solubilidade o ASP é levemente solúvel em água, aproximadamente 1 % (p/v) a 25 °C, é pouco solúvel em álcool e, em gorduras ou óleos, não é solúvel. A solubilidade é influenciada pela temperatura e pelo pH. A taxa de dissolução de misturas secas é uma propriedade relevante para diversos produtos que são produzidos pela mistura de produtos edulcorados e água ou leite a diferentes temperaturas (Butchko *et al.*, 2001).

1.5.3.2. Sensoriais

O perfil do sabor do ASP é característico por ser limpo e doce, assemelhando – se ao da sacarose, porém sem o gosto amargo metálico interligado a outros edulcorantes de alta intensidade.

A sua intensidade foi definida como 160 a 220 vezes a doçura da sacarose, estando dependente do sistema do género alimentício. A intensidade do ASP aparenta estar inversamente relacionada com a concentração da sacarose (Butchko *et al.*, 2001).

Especialmente em bebidas com sabores de frutas ácidas, como citrinos, o ASP atua como um melhorador do perfil do sabor.

A mistura com outros edulcorantes de alta potência ocorre principalmente com SAC – Na, ACE – K e CYC – Na (DuBois & Prakash, 2012). A capacidade de aperfeiçoamento do sabor pelo ASP disfarça a sensação de amargo e torna-o uma excelente opção nas misturas com edulcorantes que apresentam perfis de sabor complexos ou mesmo inconvenientes (Butchko *et al.*, 2001).

I.5.4. Metabolismo

Após a ingestão, o ASP é eficientemente hidrolisado no trato gastrointestinal, tanto no lúmen gastrointestinal como nas células internas da mucosa intestinal, por esterases e peptidases em ácido aspártico (40 %), fenilalanina (50 %) e metanol (10 %). Cada um dos metabolitos segue a sua via metabólica normal. De realçar que a molécula de ASP inalterada não se encontra nos tecidos internos do organismo ou no leite materno (Magnuson *et al.*, 2016). Os metabolitos são absorvidos pelo sangue e não se acumulam no organismo. Alguns dos produtos de degradação associados são o ácido 5 – benzil – 3,6 – dioxo – 2 – piperazina acética (DPK) e o β – aspártamo (Figura 16) (Marinovich *et al.*, 2013). Somente uma reduzida fração da ingestão dietética diária dos seus metabolitos é proveniente do Aspartamo em adultos ou crianças (Butchko *et al.*, 2001).

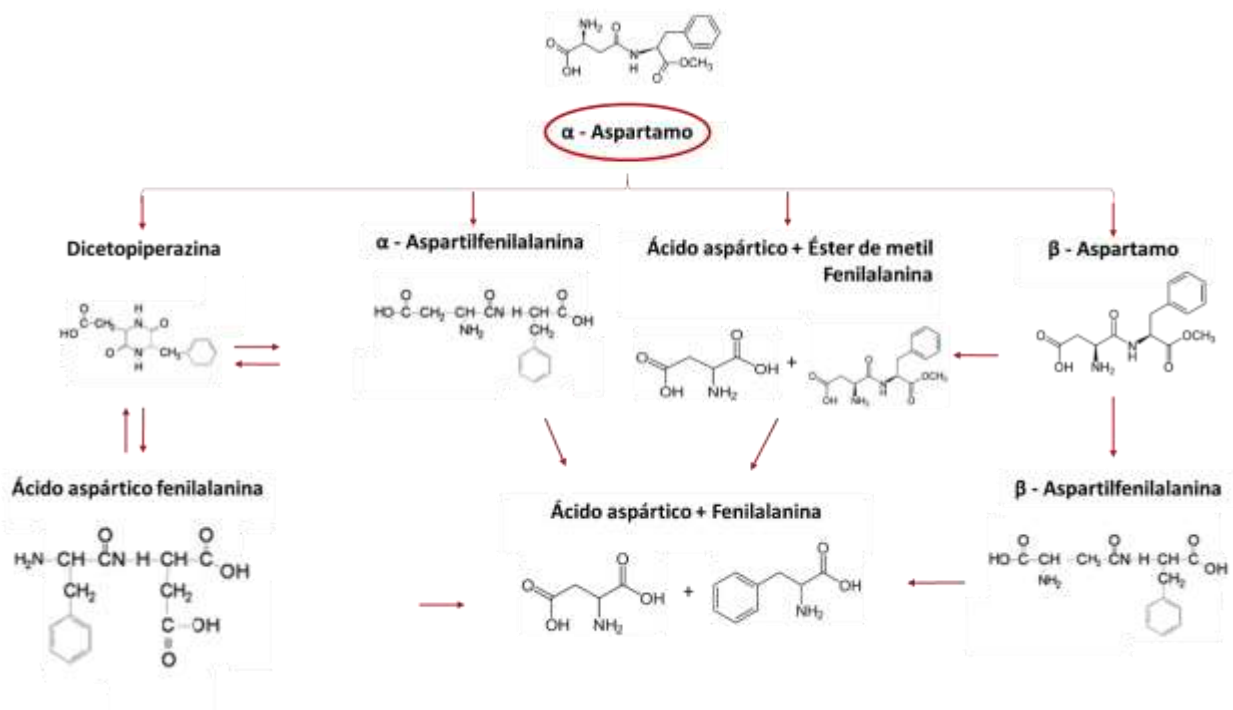


Figura 16. Principais produtos de decomposição do aspartamo (Adaptado de Butchko *et al.*, 2001; Prodolliet & Bruehlhart, 1993).

O metanol é rapidamente metabolizado em formaldeído através de catalaseperoxidase em roedores ou pela álcool desidrogenase, em primatas e seres humanos (Figura 17). De seguida, o formaldeído é convertido em ácido fórmico através do processo de oxidação pela formaldeído desidrogenase. O formaldeído apresenta uma meia – vida de aproximadamente 1 a 2 minutos. O ácido fórmico pode ser metabolizado em dióxido de

carbono, e libertado pela respiração, ou excretado do organismo pela urina. A toxicidade do metanol verifica-se pela sua acumulação no sangue e ocorre sempre que as vias do metabolismo do ácido fórmico estão oprimidas. Contudo, o consumo de géneros alimentícios com ASP, mesmo em doses excessivamente altas ou exposição crónica contínua, não contribui para o efeito tóxico mencionado porque não se observam alterações dos níveis do anião do ácido fórmico, o formiato, no sangue (Magnuson *et al.*, 2016). A quantidade de metanol derivado do aspartamo é muito inferior às exposições dietéticas normais oriundas de frutas, vegetais e sumos, correspondendo apenas a 10 % do peso total da exposição dietética do metanol (Butchko *et al.*, 2001).

O anião carboxilato do ácido aspártico, o aspartato, é metabolizado em oxaloacetato através da transaminação nos enterócitos (Figura 17). De seguida, alcança a circulação e passa a pertencer ao grupo dos aminoácidos livres. Devido a esta interconversão entre aspartato e oxaloacetato pode ingressar no ciclo da ureia e da gluconeogénese. Pode também ser utilizado para sintetizar outros aminoácidos essenciais, tais como a metionina, treonina, isoleucina e lisina, e é responsável pela estimulação dos recetores de N – metilo – D – aspartato (NMDA), atuando portanto como um neurotransmissor. Todo o excesso de aspartato é expelido na urina. Alto teor de aspartato na corrente sanguínea está relacionado com necrose neuronal, contudo o consumo de produtos contendo ASP não é suficiente para aumentar a concentração de aspartato no sangue porque há uma metabolização rápida e a incorporação deste em proteínas (Magnuson *et al.*, 2016).

A fenilalanina é absorvida no trato gastrointestinal através de células mucosas e é incompletamente convertida no aminoácido tirosina através de hidrolases de fenilalanina (Figura 17), após passar para a circulação sistémica e alcançar o fígado. Pode ser distribuída por todo o organismo, nomeadamente pelo cérebro, onde é essencial para o crescimento e o desenvolvimento normal. Eventualmente, pode ser convertido nos neurotransmissores de catecolaminas, dopamina, norepinefrina e epinefrina (Magnuson *et al.*, 2016). Os indivíduos com fenilcetonúria (PKU), patologia genética rara onde o organismo não consegue metabolizar corretamente a fenilalanina, devido ao défice de fenilalanina hidroxilase, são os únicos que se devem preocupar com o conteúdo de fenilalanina proveniente do ASP, restringindo a ingestão destas fontes alimentares, de modo a evitar sérios problemas neurológicos (Butchko *et al.*, 2001).

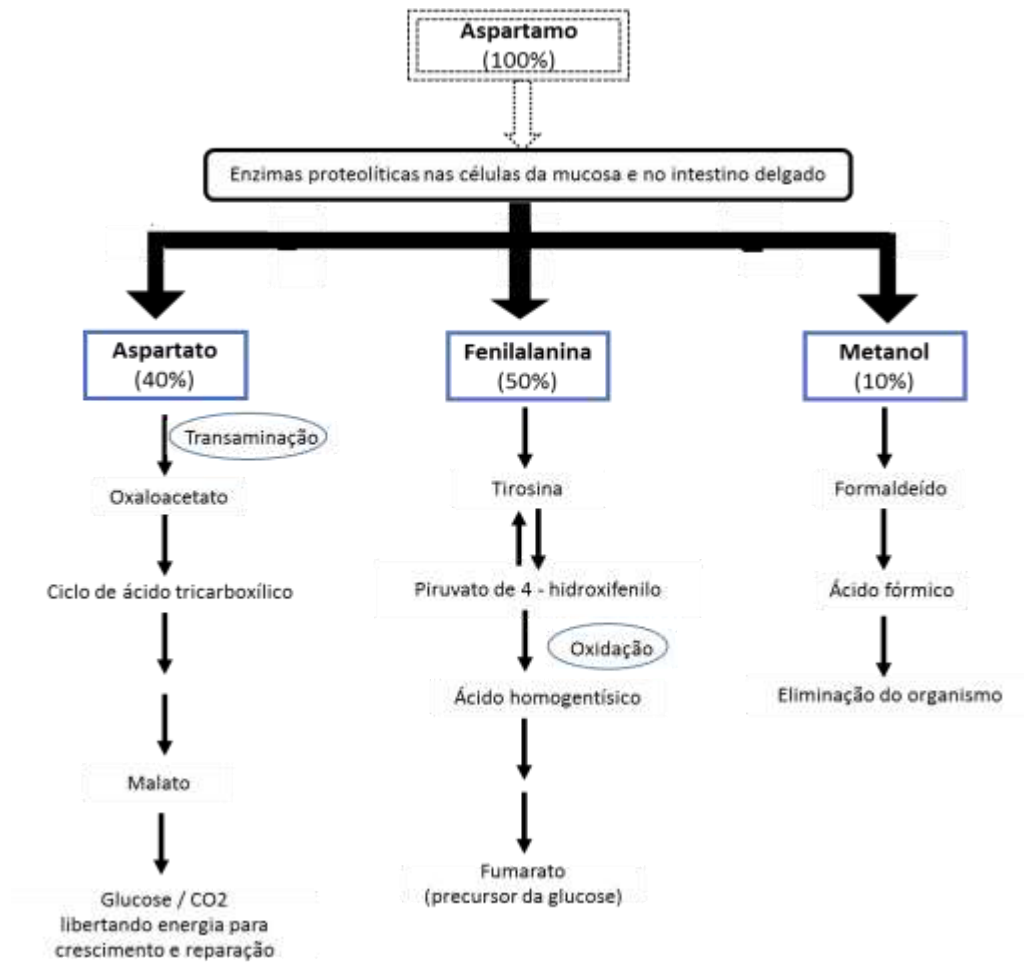


Figura 17. Esquema generalizado e simplista das vias metabólicas dos metabolitos do aspártamo (Adaptado de O' Donnell, 2012).

1.5.5. Toxicidade

A toxicidade aguda manifesta-se em humanos através de sintomas como dores de cabeça, boca seca, mudanças de humor, náuseas, vômitos, redução do limiar de apreensão e trombocitopenia (Whitehouse *et al.*, 2008).

Com base na pesquisa do banco de dados de tumores sobre Epidemiologia de Vigilância e Resultados Finais (SEER), John Olney declarou, em 1996, que o aumento na taxa de tumores cerebrais nos EUA estava associado ao consumo de ASP. No entanto, essa afirmação foi uma clara falácia ecológica porque o aumento desta taxa começou bem antes da aprovação da comercialização do ASP, e o padrão do aumento da taxa destes tumores foi observada particularmente em idosos, o que não coincide com a faixa etária típica dos consumidores de ASP. Além disso, o aumento da detecção destes tumores cerebrais resultou

principalmente da disponibilidade de tecnologia de diagnóstico sofisticado não invasiva, das quais são exemplo a ressonância magnética de imagens (Butchko *et al.*, 2001).

Como já foi mencionado, o ASP não revela potencial cancerígeno, a nível cerebral e hematopoiético, nem risco de originar leucemia (Marinovich *et al.*, 2013). Não revela provas de indução de mutações genéticas em células bacterianas, sendo que os danos cromossómicos observados *in vitro* devem-se possivelmente a um efeito secundário de citotoxicidade e não ao dano primário de ADN. O ASP não apresenta genotoxicidade em tecidos somáticos de animais, evidenciado pelo micronúcleo da medula óssea mais robusto *in vivo* e aberrações cromossómicas. Devido aos afastamentos dos protocolos padrão e aos dados limitados, as experiências em células germinativas tornam-se difíceis de analisar (Kirkland & Gatehouse, 2015).

O desempenho neurocomportamental pode ser influenciado pela ingestão de aproximadamente 25 a 30 mg ASP / kg de peso corporal / dia, pois provoca especificamente situações de irritabilidade, depressão e uma menor orientação espacial. O consumo de bebidas aditivadas com 25 mg de ASP está relacionado com um menor tempo de reação de memória espacial e de palavras, comparativamente a bebidas adicionadas com glucose ou sacarose. Doses excessivamente elevadas de ASP, 900 a 3000 mg / kg / de peso corporal / dia provocam ou agravam dores de cabeça em indivíduos vulneráveis a enxaquecas, porque aparentam influenciar as vias de catecolaminas e neurónios, responsáveis pelo processo de enxaqueca, ou, por outro lado, esta patologia poderá constituir uma resposta alérgica a um seu subproduto, o formaldeído (Lindseth *et al.*, 2014).

As concentrações plasmáticas de aspartato e glutamato podem aumentar para um valor que pode induzir danos cerebrais, através da ingestão de ASP, que posteriormente se metaboliza a glutamato mossódico (MSG) e ácido aspártico. De realçar que o anterior efeito só seria atingindo após a ingestão de 12 litros de uma bebida aditivada com ASP, considerando que o individuo pesa 60 kg, o que corresponde a 100 mg ASP / kg de peso corporal. Mesmo a administração aguda de 200 mg / kg de peso corporal deste edulcorante origina apenas um pico de concentração de $7,6 \pm 5,7 \mu\text{mol} / \text{L}$ de ácido aspártico no plasma, valor muito inferior aos níveis neurotóxicos em animais. A toxicidade do metanol está associada a acidose metabólica e a danos oculares através da acumulação de ácido fórmico.

No entanto, um indivíduo de 60 kg só adquiriria níveis tóxicos de ácido fórmico no organismo, 200 a 500 mg / kg, pela ingestão de 240 a 600 litros de uma bebida aditivada com ASP, o que equivale a ingerir 2400 – 6000 mg ASP / kg de peso corporal. Um sumo de tomate é responsável pelo consumo de 5 a 6 vezes mais metanol comparativamente com uma bebida edulcorada com este aditivo (Ditschun & Winter, 2000).

Doses muito elevadas de ASP estão também interligadas a um aumento da abundância de abortos em coelhas, verificando-se também o nascimento de fetos com menor peso e em menor número. A toxicidade reprodutiva originada pelo ASP é mediada pela fenilalanina. Os níveis excessivos deste aminoácido provocam consequências prejudiciais também em seres humanos, nomeadamente através da PKU. O desenvolvimento do feto e do cérebro pode ser influenciado pelo nível de fenilalanina na corrente sanguínea e originar atraso mental, distúrbios de humor e problemas comportamentais. Os níveis sanguíneos de fenilalanina na mãe devem ser mantidos em teores inferiores a 6 mg / dl de modo a reduzir os riscos que afetam o desenvolvimento da criança. Níveis sanguíneos de fenilalanina superiores a 18 – 20 mg / dl estão relacionados com efeitos adversos consideráveis, como danos cerebrais e podem até afetar a função cognitiva (EFSA, 2014).

A perda de peso a longo prazo pode ser auxiliada pela utilização de ASP num programa multidisciplinar de redução de peso (Peters & Beck, 2016). A substituição de edulcorantes calóricos pelo ASP, durante 12 semanas, originou uma perda de peso de 0,2 kg / semana, conseguido devido ao défice de energia líquida de 220 kcal / dia (Gardner *et al.*, 2012). No entanto existem conclusões incoerentes porque há relatos em que a inclusão de edulcorantes artificiais não aparenta originar melhores resultados do que a exclusão de edulcorantes artificiais. A perda de peso pelos adultos a curto prazo deve fundamentalmente recair sobre o que comem e bebem (Swithers, 2015).

Indivíduos com maior adiposidade apresentam um maior risco de diabetes, devido ao consumo de ASP que posteriormente está associado a deficiências significativamente maiores na tolerância à glucose, comparativamente a indivíduos magros (Kuk & Brown, 2016).

1.5.6. Legislação

O ASP é um dos edulcorantes mais extensivamente analisados e a sua segurança foi confirmada por órgãos científicos e agências reguladoras, nas quais se incluem o Comité de Peritos da FAO / WHO sobre Aditivos Alimentares (JEFCA) do Codex Alimentarius, o Comité Científico para a Alimentação da Comissão das Comunidades Europeias, a FDA e as agências reguladoras de mais de 100 países por todo o planeta (Butchko *et al.*, 2001). A FDA aprovou o uso de ASP em 1974 (Ditschun & Winter, 2000). A Associação International de Edulcorantes (ISA) organizou a “Primeira mesa redonda europeia sobre o aspártamo”, a 30 de maio de 2006, em Paris com o objetivo de analisar a segurança e eficácia do ASP e edulcorantes com baixas calorias. De notar que não há outro componente dietético que tenha sido mais bem avaliado do que o próprio aspártamo (Renwick & Nordmann, 2007). Apesar disso, foram tomadas medidas para impossibilitar a comercialização do aspártamo na Indonésia, nas Filipinas, no Hawaii e no estado de Novo México (Souto, 2009).

1.5.6.1. Níveis máximos permitidos

O Decreto-Lei n.º 394/98 institui níveis máximos de ASP em 41 géneros alimentícios (Tabela 12). Dos três edulcorantes a analisar, o ASP apresenta o maior nível máximo admitido em refrigerantes (tradicionais, à base de extratos de chás e de águas minerais), bebidas desportivas, bebidas energéticas e néctares (600 mg/L). Tal como o ACE – K, as cervejas de baixo valor energético apresentam o menor nível estabelecido, 25 mg/l, e os produtos de microconfeitaria para refrescar o hálito, sem adição de açúcares, o maior (6000 mg/kg).

A rotulagem de géneros alimentícios, autorizados no Regulamento (CE) n.º 1333 / 2008, que possuam ASP e/ou sal de ASP + ACE deve compreender uma das seguinte advertências: «Contém uma fonte geradora de fenilalanina» no caso em que o sal de ASP + ACE e/ou ASP seja mencionado na lista de ingredientes por referência apenas ao seu número E ou «Contém uma fonte de fenilalanina», em situações em que o ASP e/ou sal de ASP + ACE seja mencionado na lista de ingredientes pela sua denominação específica (Regulamento (CE) N.º 1169/2011).

Tabela 12. Doses máximas estabelecidas pelo Decreto-Lei n.º 394/98 para a utilização de aspártamo nos produtos alimentares mencionados.

Aspártamo (E951)	
Produtos alimentares	Doses máximas de utilização
Bebidas aromatizadas à base de água com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	600 mg/L
Bebidas à base de leite e produtos derivados ou sumos de fruta, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	600 mg/L
Sobremesas aromatizadas à base de água com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	1000 mg/kg
Preparados à base de leite e produtos derivados, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	1000 mg/kg
Sobremesas à base de fruta e produtos hortícolas, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	1000 mg/kg
Sobremesas à base de ovos com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	1000 mg/kg
Sobremesas à base de cereais com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	1000 mg/kg
Sobremesas à base de gorduras com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	1000 mg/kg
Snacks: aperitivos salgados e secos à base de amido ou de nozes e avelãs, pré-embalados e que contenham certos aromas	500 mg/kg
Confeitaria sem adição de açúcares	1000 mg/kg
Confeitaria à base de cacau ou frutos secos, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	2000 mg/kg
Confeitaria à base de amido, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	2000 mg/kg
Preparados para barrar pão à base de cacau, leite, frutos secos ou gorduras, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	1000 mg/kg
Pastilhas elásticas sem adição de açúcares	5500 mg/kg
Sídra e perada	600 mg/L
Cervejas sem álcool ou com um teor alcoólico não superior a 1,2 % vol.	600 mg/L
Bière de table/ Tafelbier/table beer (com um teor original de mosto não superior a 6 %), com exclusão da Obergärtriges Einfachbier	600 mg/L
Cervejas com acidez mínima de 30 mil equivalentes expressa em Na OH	600 mg/L
Cervejas pretas do tipo oud bruin	600 mg/L
Gelados alimentares, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares	800 mg/kg
Fruta em lata ou frasco, com baixo valor energético ou sem adição de açúcares.	1000 mg/kg
Compotas, geleias e marmeladas com baixo valor energético	1000 mg/kg
Preparados de fruta e produtos hortícolas, com baixo valor energético	1000 mg/kg
Conservas agrídoces de fruta e produtos hortícolas	300 mg/kg
Conservas e semiconservas agrídoces de peixe e marinadas de peixe, crustáceos e moluscos	300 mg/kg
Molhos	350 mg/kg
Mostarda	350 mg/kg
Produtos de padaria fina para alimentação especial	1700 mg/kg
Preparados completos de regime para controlo do peso destinados a substituir uma refeição ou o regime alimentar diário	800 mg/kg
Preparados completos e suplementos nutritivos para utilização sob vigilância médica	1000 mg/kg
Suplementos alimentares/constituintes líquidos dietéticos	600 mg/kg
Suplementos alimentares/constituintes sólidos de um regime dietético	2000 mg/kg
Complementos alimentares/integrantes de regimes dietéticos à base de vitaminas e ou elementos minerais em xarope ou para mastigar	5500 mg/kg
Cereais de pequeno-almoço com teor de fibras superior a 15 %, contendo pelo menos 20 % de farelo, de baixo valor energético ou sem adição de açúcares	1000 mg/kg
Caldos de baixo valor energético	110 mg/L
Produtos de microconfeitaria para refrescar o hálito, sem adição de açúcares	6000 mg/kg
Pastilhas refrescantes muito aromatizadas para a garganta, sem adição de açúcares	2000 mg/kg
Cerveja de baixo valor energético	25 mg/L
Bebidas constituídas por uma mistura de cerveja, cidra, perada, bebidas espirituosas ou vinho e bebidas não alcoólicas	600 mg/L
Bebidas espirituosas com um teor de álcool inferior a 15 % vol.	600 mg/kg
Feinkostsalat	350 mg/kg

1.5.6.2. Ingestão Diária Admissível

A JEFCA e a FDA estabeleceram valores de ingestão diária aceitável para o ASP de 40 mg / kg de peso corporal / dia e de 50 mg / kg de peso corporal / dia, respetivamente.

Um indivíduo pode eventualmente consumir um aditivo alimentar em quantidade que ultrapasse a ADI sem efeitos adversos pelo facto de este não ser um valor máximo que possa ser consumido num dado dia com segurança (Butchko *et al.*, 2001).

O consumo estimado de ASP nos EUA e na União Europeia é aproximadamente 10 % da ADI e inclusivamente os indivíduos que consomem quantidades excessivas deste edulcorante não são expostos a mais de 30 % da ADI (Figura 18). A maior quantidade de ASP é consumida pelo grupo etário dos 30 a 39 anos e particularmente por indivíduos do género masculino. Considerando o ASP presente em refrigerantes, um adulto com 60 kg teria que beber diariamente e ao longo da sua vida, aproximadamente 4 litros, ou seja 12 latas de refrigerantes com ASP no nível máximo de utilização para que o seu consumo atingisse a ADI estabelecida (Marinovich *et al.*, 2013).

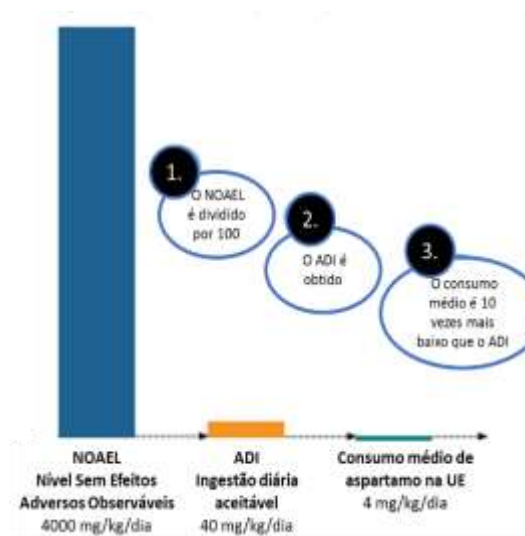


Figura 18. Comparação entre o consumo do aspártamo e a ADI estabelecida (Adaptado de OBE *et al.*, 2016).

O consumo de aspártamo tem sido analisado por diversos estados membros europeus nos últimos anos. Lino *et al.* (2008) demonstraram que a ADI do ASP não era excedida em Portugal, através do consumo de refrigerantes, refrigerantes à base de águas minerais e de néctares representando respetivamente 2,9 %, 0,7 % e 0,5 % da ADI estabelecida para este edulcorante. Diogo *et al.* (2013) também em Portugal mas na população adulta descreveu exposições inferiores, visto ter descrito que o consumo de refrigerantes tradicionais representava 0,08 % da ADI, o de refrigerantes á base de águas minerais 0,053 % da ADI e o de néctares 0,02 % da ADI. Na Bélgica, Huvaere *et al.* (2011) relataram que a população adulta com pelo menos 15 anos através do consumo de diferentes matrizes alimentares,

nas quais se incluem as bebidas não alcoólicas apenas estava exposta a 1 % da ADI estabelecida para o aspártamo. Vin *et al.* (2013) não detetaram exposição excessiva em nenhum dos países europeus analisados (França, Itália, Reino Unido e Irlanda), sendo a maior exposição encontrada no Reino Unido, principalmente devido ao consumo de bebidas não alcoólicas e de sobremesas, e a menor exposição em Itália. Os principais contribuidores da exposição ao aspártamo coincidem com os mesmos relatados para o acesulfame – K, tanto em adultos como em crianças [ver I.3.6] (Vin *et al.*, 2013). Em Itália, Donne *et al.*, (2017) concluíram que as bebidas não alcoólicas são responsáveis pela maior exposição ao aspártamo (48 %) e apenas 0,5 % da ADI instituída para o ASP é atingida por esta população, valor relativamente semelhante ao descrito por Huvaere *et al.* (2011) na Bélgica.

1.5.7. Ocorrência

Dos dados analisados na Europa (Tabela 13) até ao momento constata-se que na Bélgica, apesar de Huvaere *et al.* (2011) não indicarem a frequência nem os teores mínimos e máximos de ASP nas distintas matrizes analisadas, verificaram que a presença de ASP está distante do limite máximo estabelecido a nível europeu (600 mg/L), visto a concentração média máxima coincidir com 59 mg/L nas bebidas à base de sumos de fruta. O ASP não foi identificado em nenhuma das amostras de bebidas desportivas.

Janvier *et al.* (2015) identificaram a presença de ASP num sexto das amostras de néctares analisadas em Itália com um teor médio de 39 mg/L, com um desvio padrão de 49 mg/L, valor que não levanta preocupação relativamente à legislação aplicada (Tabela 13).

Na Polónia, Zyglar *et al.* (2011) identificaram ASP apenas num terço das amostras de néctares, com um teor de 70 mg/L, em metade das amostras de refrigerantes e em praticamente todas as amostras de refrigerantes carbonatados (86 %) com um teor máximo de 443,3 mg/L, sendo o teor médio das amostras de apenas 221,7 mg/L (Tabela 13).

Leth *et al.* (2007), na Dinamarca, somente detetaram ASP em duas amostras, uma de refrigerante e outra de refrigerantes carbonatados, ambas com açúcar, com teores de 124 e 450 mg/L, respetivamente. Ainda na Dinamarca a presença em refrigerantes é de 72 %,

com um teor máximo de 226 mg/L, e em refrigerantes carbonatados a frequência é de 95 %, com um teor médio de 159 mg/L, apresentando um nível máximo de 460 mg/L.

Em Portugal, tanto Lino *et al.* (2008) como Diogo *et al.* (2013) confirmaram a presença de ASP em refrigerantes, refrigerantes à base de águas minerais e em néctares, mas apenas uma amostra de um refrigerante à base de águas minerais apresentou um teor de 568,3 mg/L, muito próximo da dose máxima de utilização permitida, 600 mg/L (Tabela 13).

Na Ásia oriental, Sakai *et al.* (2015) relataram a inexistência de ASP nas bebidas de fruta e nas bebidas desportivas analisadas e a presença em um quarto das amostras de refrigerantes carbonatados analisadas. Os limites máximos insituídos na China são idênticos aos estabelecidos na Europa para o caso de refrigerantes carbonatados e néctares (600 mg/L), no entanto foi relatado anteriormente, por Zhu *et al.* (2005), a presença de 729,7 mg/L de ASP num sumo de fruta e de 2826,33 e 7234,66 mg/L em duas amostras de refrigerantes carbonatados (Chinese Standards for Food Additives GB2760, 2015).

Bergamo *et al.* (2011) apenas reportaram a presença de ASP num terço das amostras de refrigerantes analisadas com uma concentração de 94 mg/L, nada relevante atendendo ao limite máximo de 750 mg/L instituído no Brasil (Resolução de Diretoria Colegiada N°.18, de 24 de Março de 2008). Nos EUA, Shah *et al.* (2014) identificaram ASP em 77,8 % das amostras de refrigerantes carbonatados e em 33,3 % das amostras de refrigerantes não carbonatados com teores compreendidos entre os 30 – 356 mg/L e 56 – 414 mg/L, respetivamente (Tabela 13).

Tabela 13. Frequência (%) e níveis (mg/L) de aspártamo em bebidas.

País	Tipo de Bebida	Nº de Amostras	Frequência (%)	Níveis (mg/L)		Bibliografia
				Min - Máx	Média	
Japão	Bebidas carbonatadas	12	25	88,6 – 238,9	159,1	Sakai <i>et al.</i> , 2015
	Bebidas de fruta	5	0	-	-	
	Bebidas desportivas	5	0	-	-	
China	Refrigerantes carbonatados	2	100	2826,33 – 7234,66	5030,5	Zhu <i>et al.</i> , 2005
	Sumo de fruta	1	100	729,7	729,7	
Portugal	Refrigerantes	25	92	8,8 – 339	89	Lino <i>et al.</i> , 2008
	Refrigerantes à base de águas minerais	13	62	19 – 154	82	
	Néctares	10	80	39 – 129	73	
	Refrigerantes		14	26,4 – 236,7	16,3	Diogo <i>et al.</i> , 2013
	Refrigerantes à base de águas minerais	59	0,07	50 – 568,3	56,3	
	Bebidas energéticas	3	33,3	0 – 100	33,3	
	Néctares	16	50	6,10 – 493,5	97,8	
Dinamarca	Refrigerantes carbonatados (sem açúcar)	21	95	26 – 460	159	Leth <i>et al.</i> , 2007
	Refrigerantes carbonatados	15	0,07	-	450	
	Refrigerantes (sem açúcar)	60	72	4 – 226	56	
	Refrigerantes	20	0,05	-	124	
Polónia	Refrigerantes	4	50	47,5 – 105,4	76,5	Zyglar <i>et al.</i> , 2011
	Refrigerantes carbonatados	7	86	11,3 – 443,3	221,7	
	Sumos	3	33,3	-	70	
Bélgica	Águas aromatizadas	5	-	-	47	Huvaere <i>et al.</i> , 2011
	Bebidas carbonatadas	19	-	-	45	
	Bebidas à base de sumos de fruta	14	-	-	59	
	Bebidas desportivas	2	-	-	-	
	Bebidas energéticas	2	-	-	15	
Itália	Bebidas aromatizadas	57	35	-	162 ± 120	Janvier <i>et al.</i> , 2015
	Néctares	18	16,7	-	39 ± 49	
USA	Refrigerantes carbonatados	9	77,8	30 – 356	154,6	Shah <i>et al.</i> , 2014
	Refrigerantes não carbonatados	6	33,3	56 – 414	235	
Brasil	Refrigerantes	3	33,3	-	94	Bergamo <i>et al.</i> , 2011

1.5.8. Metodologias analíticas

A desgaseificação em ultrassons é um procedimento frequentemente utilizado na preparação de amostras de bebidas carbonatadas e néctares que contenham aspártamo, podendo a sua aplicação variar entre os 5 e os 15 min (Diogo *et al.*, 2013; Huvaere *et al.*, 2011; Kritsunankul & Jakmune, 2011; Kubica *et al.*, 2015; Kubica *et al.*, 2016; Lorenzo *et al.*, 2015; Ordoñez *et al.*, 2015; Sakai *et al.*, 2015; Yang & Chen, 2009; Zygler *et al.*, 2011). De igual forma ao que se observa para o acessulfame – K e para a sacarina, antes ou mesmo após a desgaseificação a preparação da amostra pode ser completa pela diluição em diferentes solventes, dos quais são exemplo a água ultra pura (Kritsunankul & Jakmune, 2011; Ordoñez *et al.*, 2015) e a mistura de água, metanol, acetona e ácido acético (Kubica *et al.*, 2015) (Tabela 14).

A purificação das amostras que apresentam aspártamo segue a mesma base dos anteriores edulcorantes presentes em refrigerantes e néctares, ou seja a maioria dos investigadores utiliza unicamente filtração, quer por filtros de membrana de 0,45 µm (Kritsunankul & Jakmune, 2011) bem como de 0,22 µm (Lorenzo *et al.*, 2015). A filtração pode ser seguida por centrifugação e como se verifica na Tabela 14, as forças centrífugas aplicadas por diferentes investigadores estão compreendidas entre os 3600 rpm (10') (Yang & Chen, 2009) a 13 000 rpm (10') (Huvaere *et al.*, 2011).

A deteção através de MS / MS, utilizando particularmente a técnica de separação HPLC, é de facto bastante utilizada na identificação de ASP em matrizes alimentares e como se observa na Tabela 14, o menor LOD, 0,00111 mg/L foi relatado por Kubica *et al.* (2016) utilizando a anterior técnica de deteção mas acoplada a técnica cromatografia líquida de interacção hidrófila (HILIC). Ainda através desta metodologia de deteção, Ordoñez *et al.* (2015) recorrendo à cromatografia líquida de alta temperatura como método de separação, relataram o maior LOD (0,25 mg/L). Considerando os LOQs, os seus valores oscilaram entre 0,0004 mg/L (Lorenzo *et al.*, 2015) e 6,0 mg/L (Diogo *et al.*, 2013), utilizando LC – ESI – MS / MS e HPLC – UV, respetivamente. A deteção alternativa por PDA, com separação por UPLC, revelou uma sensibilidade equiparável às técnicas de deteção com os menores LOQs (Lorenzo *et al.*, 2015).

Tabela 14. Métodos de preparação da amostra, purificação, detecção e quantificação do aspártamo em bebidas.

Preparação da amostra	Purificação	Deteção e Quantificação	Coluna cromatográfica	Fase móvel	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Bibliografia
Banho ultrassónico (10 min)	Filtração (filtro de membrana de 0,45 µm); Centrifugação (3600 rpm, 10 min)	HPLC – MS/ESI	Coluna C18 (5 µm, 250 mm x 4,5 mm)	Mistura de metanol, solução tampão (0,8 mL de ácido fórmico e 1,5 mL de trietilamina em 1 L de água) e acetona. Fase A: 69:24:7 (v/v/v); Fase B: 11:82:7 (v/v/v).	0,02	0,05	Yang & Chen, 2009
Ultrassom (15 min)	Filtração (filtro de membrana 0,45 µm); Centrifugação (3400g, 15 min)	HPLC - UV	Coluna C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm)	Mistura 85:15 (v/v) de fosfato monopotássico 50 mM e acetoneitrilo. Adição de ácido fosfórico para controlar o pH (4,2 - 4,3).	-	6,0	Diogo et al., 2013
Diluição da amostra com H ₂ O:MeOH 1:1 (v/v). Ultrassom (10 min).	Precipitação a frio (2h); Centrifugação (10 min, 13000 rpm); Filtração (filtro 0,45 µm); Diluição com H ₂ O.	LC – MS/ESI	Coluna C18 (5 µm, 150 mm x 2,1 mm)	Mistura de água (solvente A) e metanol (solvente B), com acetato de amónio 20 mM.	0,005	0,01	Huvaere et al., 2011
Desgaseificação (10 min). Diluição a 50 ml com ácido fórmico – N,N – disopropiletilamina (FA – DIPEA) (pH 4,5)	SPE – Strata – X RP. Eluição: 2 x 2 ml de MeOH.	HPLC - MS	Coluna C18 (5 µm, 250 x 3mm)	Mistura de metanol com solução tampão de formato (1,5 mL de ácido fórmico 20 mmol/L em 2 L de água) e acetona. Fase A: 69:24:7 (v/v/v). Fase B: 11:82:7 (v/v/v).	0,01	0,05	Zyglis et al., 2011
Diluição em ácido fórmico a 0,1 % em solução aquosa. Agitação (150 rpm, 5 min). Ultrassom (15 min).	-	LC – MS/MS	Coluna C18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm)	Ácido fórmico a 0,1% em solução aquosa (fase móvel A) e ácido fórmico a 0,1% em acetoneitrilo (fase móvel B).	0,004	0,01	Sakai et al., 2015

Tabela 14. Métodos de preparação da amostra, purificação, detecção e quantificação do aspártamo em bebidas (cont.).

Preparação da amostra	Purificação	Deteção e Quantificação	Coluna cromatográfica	Fase móvel	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Bibliografia
Banho ultrassónico (40 min). Diluição com água ultra pura.	Filtração	Cromatografia líquida de alta temperatura acoplada a espectrometria de massa em tandem	Coluna Shodex ETRPI (4 µm, 3.0 x 150 mm). Gradiente de temperatura: 0-9 min: 110 °C até 150 °C (8 °C/min); 150 °C (6 min); 150 a 110 °C em 3 min (tempo total = 23 min).	Mistura de água e acetato de amónio 5 mM (fase A) e etanol (fase B).	0,25	0,83	Ordoñez et al., 2015
Diluição com MeOH:H2O (8:92, v/v). Banho ultrassónico (5 min).	Filtração (filtro de 0,22 µm)	UPLC - PDA (230 nm)	Coluna C18 (1.7 µm, 2.1 x 50 mm)	Sistema de solvente binário constituído por acetonitrilo e tampão fosfato (dissolução de 0,136 g em 1 l de água ultrapura. Ajustar o pH para 6, com solução de hidróxido de potássio). Eluição com gradiente.	-	0,05	Lorenzo et al., 2015
Diluição com MeOH:H2O (8:92, v/v). Banho ultrassónico (5 min).	Filtração (filtro de 0,22 µm)	LC - MS/MS - ESI	Coluna C8 (4.6 µm, 150 mm x 4,5 mm)	Fase A: água e acetato de amónio 20 mmol.L ⁻¹ . Fase B: metanol e acetato de amónio 20 mmol.L ⁻¹ . Eluição com gradiente.	-	0,0004	Lorenzo et al., 2015
Sonificação (15 min). Diluição em mistura de água, metanol e acetona com ácido acético 0,1% (v/v) (75:20:5, v/v/v). Diluição 1:100	Centrifugação (7000 rpm, 5 min)	HPLC - MS/MS/ESI	Coluna C18 (2.7 µm, 100 mm x 4,6 mm)	Fase A: água, metanol e acetona com ácido acético 0,1% (v/v) (75:20:5, v/v/v). Fase B: acetonitrilo e acetona com ácido acético 0,1% (v/v) (95:5, v/v).	0,00163	0,0049	Kubica et al., 2015
Sonificação (15 min).	Centrifugação (7000 rpm, 5min)	RPLC - MS/MS	Coluna C18 (2,7 µm, 100 mm x 4,6 mm)	Fase A: metanol, água e acetona (20:75:5, v/v/v) com ácido acético 0,1% (v/v). Fase B: acetonitrilo e acetona (95:5, v/v) com ácido acético 0,1% (v/v). Eluição com gradiente.	0,00163	0,0049	Kubica et al., 2016
Sonificação (15 min).	Centrifugação (7000 rpm, 5min)	Cromatografia líquida de interação hidrófila acoplada à espectrometria de massa em tandem (HILIC - MS/MS)	Coluna Acclaim™ Trinity™ P2 (3 µm, 100 mm x 2,1 mm)	Fase A: 40 mM de acetato de amónio pH 6,8 Fase B: acetonitrilo com ácido acético 0,1% (v/v). Eluição com gradiente.	0,00111	0,00333	Kubica et al., 2016

Capítulo II
PARTE EXPERIMENTAL

II.1. Material e métodos

II.1.1. Amostragem

A escolha das amostras incidiu sobre o critério de que pelo menos um dos edulcorantes em análise tinha que estar presente. Assim, e de acordo com a disponibilidade do mercado, foram adquiridas 56 amostras na zona central de Portugal no mês de Janeiro de 2018. Das amostras estudadas, 41 são refrigerantes, das quais 27 são classificados como refrigerantes tradicionais, 10 como refrigerantes à base de extratos de chás e 4 como refrigerantes à base de águas minerais. Foram também analisadas 2 bebidas energéticas, 4 bebidas desportivas e 9 néctares. A rotulagem das amostras possuía apenas informação qualitativa acerca dos aditivos, sem referir as suas concentrações.

Após a primeira abertura, todas as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente. As amostras obtidas em latas, após a sua abertura e por isso sem método de fecho, foram seladas com parafilme.

A caracterização das amostras encontra-se registada no Anexo I, tendo sido agrupadas de acordo com a classe da bebida correspondente. Foi atribuída uma nomenclatura a cada amostra, composta por uma letra, dependente da sua categoria de bebida, e um número, dependente da disposição por ordem alfabética em cada uma das classes.

II.1.2. Reagentes e material

Os padrões utilizados para preparar as soluções padrão *stock*, o acessulfame – K (PubChem CID: 11074431), a sacarina (Pubchem CID: 5143) e o aspártamo (PubChem CID: 134601) foram obtidos a partir de fontes distintas, Fluka (Buchs, Alemanha), Merck (Darmstadt, Germany) e Sigma Aldrich (Madrid, Espanha), respetivamente (Tabela 15).

O metanol, utilizado para lavagem da coluna da HPLC, foi adquirido através da VWR Chemicals (Briare, França). O fosfato monopotássico e o acetoneitrilo foram adquiridos a

partir da Merck (Darmstadt, Germany) e da Sigma Aldrich (Rehovot, Israel), respetivamente. O ácido fosfórico também foi adquirido a partir da Merck (Darmstadt, Germany). Todos os reagentes utilizados apresentavam uma pureza de pelo menos 98 % (Tabela 15).

A água Milli – Q utilizada para HPLC foi produzida através de um sistema de purificação de Milli-Q® Direct 8 (Millipore, Darmstadt, Germany).

Tabela 15. Especificação da marca, fórmula e peso molecular, em g/mol, dos reagentes utilizados.

Reagente	Marca	Fórmula	Peso molecular (g/mol)
Acesulfame – K (≥ 99 %)	Fluka	$C_4H_4KNO_4S$	201,24
Acetonitrilo para HPLC ($\geq 99,9$ %)	Sigma - Aldrich	C_2H_3N	41,05
Ácido fosfórico (98 – 100 %)	Merck	H_3PO_4	46,03
Aspártamo	Sigma Aldrich	$C_{14}H_{18}N_2O_5$	294,30
Fosfato monopotássico (99,5 %)	Merck	KH_2PO_4	136,09
Metanol, para HPLC (100 %)	VWR Chemicals	CH_4O	32,04
Sal de sódio de sacarina dihidratado (> 99 %)	Merck	$C_7H_4NNaO_3S \cdot 2H_2O$	241,16

II.1.3. Soluções

A solução de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) 0,05 M foi preparada através da dissolução de 13,61 g de KH_2PO_4 em 2000 mL de água Mili-Q num balão volumétrico de volume apropriado. De modo a homogeneizar foi colocado num banho de ultrassons durante 15 min.

A fase móvel é composta pelo tampão fosfato 0,05 M e acetonitrilo (ACN) na proporção 85:15 (v/v) respetivamente. O pH foi ajustado a 4,2 – 4,4 pela adição de aproximadamente 3 a 4 gotas de ácido fosfórico (H_3PO_4) a 20 %. De seguida, a fase móvel foi filtrada a vácuo, e por último, desgaseificada num banho de ultrassons por 15 min.

Tendo em conta a preparação de soluções padrão *stock*, para cada um dos edulcorantes (ACE – K, SAC, ASP) foi preparada uma solução de 1 mg/mL (*stock* I) e uma de 10 mg/mL (*stock* II). Para o caso do ACE – K e da SAC, a solução padrão com concentração de 1 mg/mL resultou da pesagem de 100 mg de cada um dos repetivos edulcorantes que posteriormente foram colocados no seu respetivo balão volumétrico de 100 mL e dissolvidos em 100 mL de fase móvel. Como a quantidade de ASP disponível era relativamente menor em relação aos outros edulcorantes em estudo, a solução padrão de 1 mg/mL deste foi preparada pela dissolução de 50 mg em 50 mL de fase móvel num balão volumétrico apropriado. Todas as três soluções padrão de 10 mg/mL foram preparadas pela pesagem de 50 mg de cada um dos edulcorantes e posterior dissolução em 5 mL de fase móvel, em cada um dos balões volumétricos de 5 mL. Após a sua preparação, todas as soluções padrão foram colocadas num banho de ultrassons (15 min) para procurar a homogeneização.

A solução intermédia (100 µg/mL) foi preparada para cada um dos edulcorantes num balão volumétrico de 50 mL, através da diluição de 5 mL da solução *stock* I em fase móvel.

A solução trabalho de 10 µg/mL, foi preparada por diluição de 5 mL da solução a 100 µg/mL do respetivo edulcorante com 45 mL da fase móvel. Em relação à solução de trabalho II (20 µg/mL) a sua preparação apenas apresenta uma variável, a fase móvel adicionada é de apenas 20 mL.

Todas as soluções preparadas e as suas respetivas composições encontram – se sumariadas na Tabela 16.

As soluções padrão para a curva de calibração quer em fase móvel quer na matriz foram preparadas entre 10 – 350 mg/L (10, 35, 100, 200 e 350 mg/L) para o ACE – K, 10 – 100 mg/L (10, 40, 80, 90 e 100 mg/L) para a SAC e 25 - 600 mg/L (25, 50, 200, 400 e 600 mg/L) para o ASP, como se pode observar nas Figuras 21-26.

Tabela 16. Simplificação do procedimento de preparação de cada uma das soluções utilizadas.

Solução	Composição
Tampão fosfato 0,05 M	13,61 g KH ₂ PO ₄ em 2 L H ₂ O Milli-Q
Fase móvel (85:15 v/v)	850 mL KH ₂ PO ₄ 0,05 M + 150 mL ACN
Ácido fosfórico (20 %)	80 mL H ₂ O + 20 mL Ácido fosfórico
Solução padrão I mg/mL (stock I)	
➤ ACE – K	100 mg ACE-K + 100 mL fase móvel (85:15 v/v)
➤ SAC	100 mg SAC + 100 mL fase móvel (85:15 v/v)
➤ ASP	50 mg ASP + 50 mL fase móvel (85:15 v/v)
Solução padrão 10 mg/mL (stock II)	
➤ ACE – K	50 mg ACE-K + 5 mL fase móvel (85:15 v/v)
➤ SAC	50 mg SAC + 5 mL fase móvel (85:15 v/v)
➤ ASP	50 mg ASP + 5 mL fase móvel (85:15 v/v)
Solução padrão 100 µg/mL (intermédia)	
➤ ACE – K	5 ml solução I mg/mL + 45 mL fase móvel (85:15, v/v)
➤ SAC	5 ml solução I mg/mL + 45 mL fase móvel (85:15, v/v)
➤ ASP	5 ml solução I mg/mL + 45 mL fase móvel (85:15, v/v)
Soluções padrão 10 µg/mL (trabalho I)	
➤ ACE – K	5 ml solução 100 µg/mL + 45 mL fase móvel (85:15, v/v)
➤ SAC	5 ml solução 100 µg/mL + 45 mL fase móvel (85:15, v/v)
➤ ASP	5 ml solução 100 µg/mL + 45 mL fase móvel (85:15, v/v)
Soluções padrão 20 µg/mL (trabalho II)	
➤ ACE – K	5 ml solução 100 µg/mL + 20 mL fase móvel (85:15, v/v)
➤ SAC	5 ml solução 100 µg/mL + 20 mL fase móvel (85:15, v/v)
➤ ASP	5 ml solução 100 µg/mL + 20 mL fase móvel (85:15, v/v)

II.1.4. Equipamento

A balança analítica utilizada para a pesagem dos padrões foi a Mettler Toledo AG285. Tanto para a preparação das soluções como para as amostras foi utilizado o banho de ultrassons Bandelin Sonorex RK510S, com controlo de tempo. O sistema de ultrapurificação de água usado foi o Milli-Q® Direct 8 (Millipore, Darmstadt, Germany). Para a filtração a vácuo foi utilizado o sistema Vaccum Pump V-700 Butchi. Quando necessário todas as soluções e amostra foram armazenadas num frigorífico a 4 °C.

O potenciómetro utilizado para medir o pH foi o Jenway modelo 3505, com seleção de modo via controlos rotativos.

A centrífuga utilizada para preparar as amostras de néctar foi a Sigma 3-16K.

A separação analítica dos edulcorantes foi concretizada através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa. O sistema cromatográfico era constituído por bomba (modelo de bomba 305, de Gilson, França), coluna Hichrom C18 (5 µm de porosidade, 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro) e injetor de 20 µL (modelo 7125 Rheodyne, Cotatim Califórnia, USA).

A fase móvel tamponada foi sujeita a um fluxo de 0,7 mL/min. A deteção foi realizada com detetador de ultravioleta (modelo 116, de Gilson, França), a 254 nm. A integração foi efetuada através de um integrador modelo SP4290 (Spectra – Physics, San Jose, California, USA). A quantificação foi realizada através do método de padrão externo.

II.1.5. Cálculo da ingestão diária estimada

A ingestão diária estimada (EDI) foi calculada usando um método determinístico através da equação II.1.5.1., onde $\sum c$ corresponde á soma da concentração do aditivo nas amostras analisadas, expressa em mg/L, C coincide com a ingestão anual média estimada por pessoa, N é o número total de amostras estudadas, D é o número de dias num ano e K é o peso corporal médio da população.

$$EDI = \frac{\sum c \cdot C}{N \cdot D \cdot K} \quad \text{Equação II.1.5.1.}$$

Tendo em conta a última avaliação realizada em Portugal em 2016, foram produzidas 718,8 milhões de litros de refrigerantes, dos quais 388,6 milhões de litros são bebidas refrigerantes gaseificadas, 204,5 milhões de litros são bebidas de chás/café, 79,9 milhões de litros são refrigerantes sem gás, 5,5 milhões de litros são bebidas energéticas, 1,7 milhões de litros são bebidas desportivas e 17,3 milhões de litros são águas aromatizadas, o que corresponde a 37,66, 19,82, 7,74, 0,53, 0,16 e 1,68 L / habitante, respetivamente. No caso dos néctares foram produzidos 109,7 milhões de litros o que corresponde a 10,63 L /

habitante (Probeb, 2016). Considerando os dados de Azeres *et al.*, (2006), o peso corporal médio para a população portuguesa adulta foi considerado 69 kg.

II.2. Procedimento experimental

II.2.1. Preparação da amostra

A metodologia escolhida para realizar a preparação e a purificação da amostra foi baseada no método descrito por Lino & Pena (2010) e encontra-se esquematizada na Figura 19. Inicialmente, cerca de 5 a 10 ml de cada amostra foram transferidos para um respetivo tubo de ensaio, com excepção dos néctares. De seguida foram submetidos a desgaseificação num banho de ultrassons durante 15 min. Por último foi realizada uma filtração com um filtro de membrana de 0,22 μm para um novo tubo de ensaio, de modo a eliminar os interferentes presentes na amostra, antes de se proceder á injeção no sistema cromatográfico.

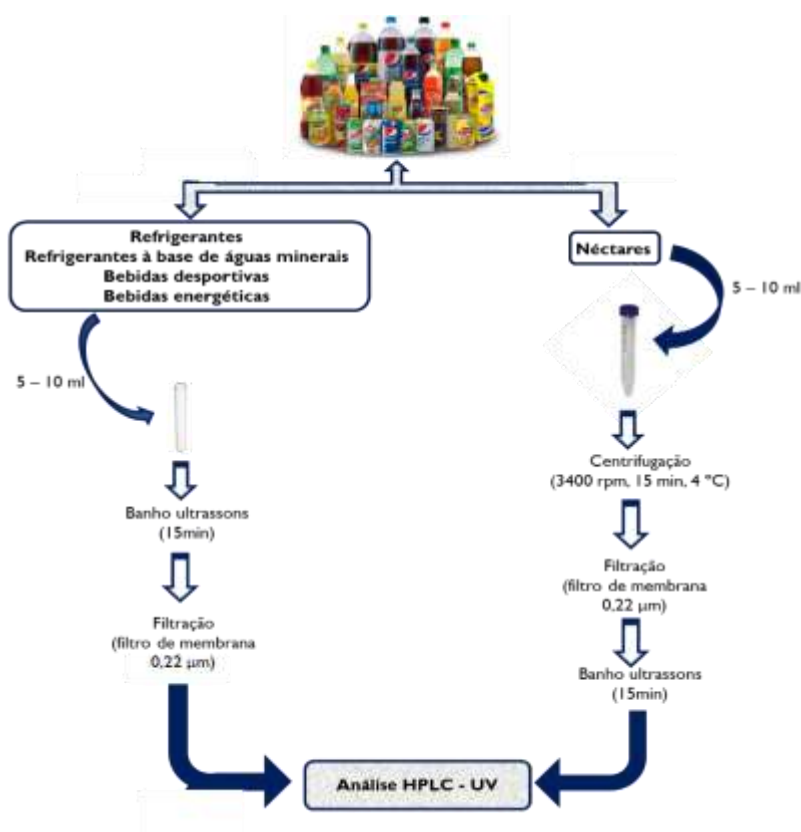


Figura 19. Esquema representativo do método adotado para a preparação e purificação das amostras.

No que respeita às amostras de néctar, foi necessário proceder à transferência de cerca de 5 a 10 ml para um tubo falcon e efetuar a centrifugação a 3400 rpm durante 15 min (4 °C). Posteriormente foi efectuado mais um processo de purificação, em concreto uma filtração com um filtro de membrana de 0,22 µm, para um novo tubo de ensaio. Para finalizar, as amostras foram submetidas a degaseificação num banho de ultrassons durante 15 min.

II.2.2. Deteção e quantificação

A identificação da presença do ACE – K, SAC e ASP nas diferentes amostras foi realizada através da comparação dos tempos de retenção obtidos com os tempos de retenção das soluções padrão injetadas nesse mesmo dia.

A quantificação dos três edulcorantes nas distintas amostras foi efetuada através do método do padrão externo. Em cada um dos dias de análise, uma solução padrão constituída por uma mistura dos três edulcorantes com concentrações de 100 µg/mL, 80 µg/mL e 200 µg/mL, para o ACE – K, SAC e ASP, respetivamente, foi injetada no sistema de HPLC.

II.2.3. Ensaio de fortificação

No que respeita aos ensaios de fortificação foram preparados três níveis de fortificação distintos para cada um dos edulcorantes e para cada um destes foram executados três replicados (Figura 20).

Assim, para o ACE – K os níveis de fortificação foram de 35, 100 e 350 mg/L, enquanto para a SAC foram de 40, 80 e 100 mg/L e para o ASP foram de 50, 200 e 600 mg/L.

A escolha destes níveis de concentração para os três níveis de fortificação justifica-se devido às amostras a analisar apresentarem presumivelmente teores de edulcorantes neste intervalo de concentrações. O nível mais baixo (35 mg/L de ACE – K, 40 mg/L de SAC e

50 mg/L de ASP), foi escolhido tendo em conta o facto de que ainda que sejam baixas concentrações estas consigam ser detetadas e quantificadas, enquanto o nível de fortificação mais elevado (350 mg/L de ACE – K, 100 mg/L de SAC e 600 mg/L de ASP), foi escolhido pelo facto destas concentrações coincidirem com os limites máximos permitidos.

O procedimento adotado encontra-se representado na Figura 20 e consistiu em injetar a solução padrão no sistema HPLC, o branco e para finalizar cada um dos replicados dos três níveis de fortificação. O procedimento descrito foi realizado de igual forma em três dias distintos, para que para além da exatidão fosse também possível determinar a repetibilidade inter – dia.

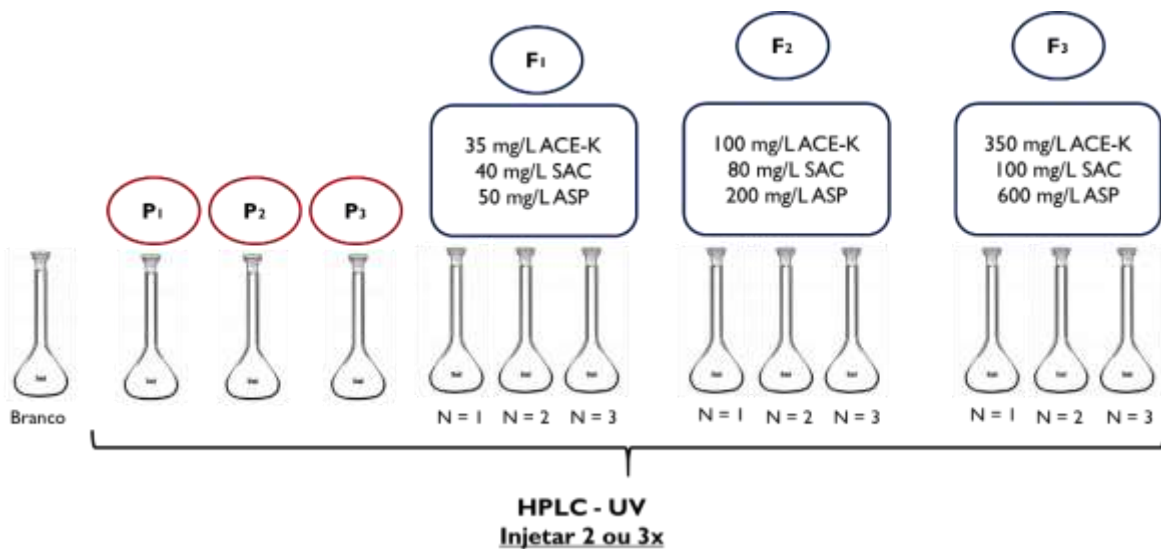


Figura 20. Esquema representativo do procedimento adotado em cada um dos três dias dos ensaios de fortificação.

II.2.4. Limite de deteção e limite de quantificação

O limite de deteção (LOD) diz respeito à quantidade mais baixa de analito que pode ser detetada com precisão e exatidão admissíveis e foi calculado através da equação II.2.4.1., onde k corresponde a uma constante, que como recomendado pela IUPAC, é lhe atribuído o valor de 3,3, b é o declive da reta da curva de calibração em solvente do respetivo edulcorante e S_{Br} é uma estimativa da dispersão do branco.

$$LOD/Q = \frac{k \cdot S_{Br}}{b} \quad \text{Equação II.2.4.1}$$

O limite de quantificação (LOQ) define a menor concentração que pode ser quantificada com rigor e é determinada através de uma equação semelhante á descrita para o LOD. A única variável é a constante k , que neste caso corresponde ao valor 10.

II.3. Resultados e Discussão

II.3.1. Otimização dos procedimentos analíticos

II.3.1.1. Composição da fase móvel

Como anteriormente mencionado, a fase móvel usada é composta por tampão fosfato 0,05 M e acetonitrilo na proporção 85:15 (v/v) respetivamente. Inicialmente a proporção adotada foi de 90:10 (v/v), visto que quanto maior a proporção da fase orgânica comparativamente à fase aquosa, maior a polaridade da fase móvel e como consequência a eluição dos edulcorantes seria mais rápida. No entanto a proporção da fase orgânica teve que ser reduzida para 85 e a fase aquosa elevada para 15 porque na corrida cromatográfica os tempos de retenção do acessulfame – K e da sacarina encontravam-se muito próximos, afetando assim a sensibilidade do método, e no caso dos picos cromatográficos do aspártamo, a sua resolução estava comprometida.

II.3.1.2. Fluxo da fase móvel

As soluções padrão trabalho de cada um dos edulcorantes foram injetadas no sistema de HPLC, com um fluxo de fase móvel de 1 mL/min, para que fossem estudados os respetivos tempos de retenção. No entanto, em conjugação com a alteração da fase móvel para 85:15 (v/v), o fluxo teve que ser reduzido para 0,700 mL/min visto que com a injeção das soluções a 10, 20 e 100 µg/mL de ASP não era possível quantificar este edulcorante.

A adopção do fluxo a 0,700 mL/min contribuiu também para uma melhor resolução dos picos cromatográficos do acessulfame – K e da sacarina, visto que estes dois edulcorantes apresentam tempos de retenção muito próximos.

Apesar do menor fluxo da fase móvel que por sua vez implica a obtenção de cromatogramas com um tempo de retenção superior, a longo prazo originam um menor desgaste da coluna porque esta condição coloca o sistema numa circunstância de menor pressão.

II.3.1.3. Volume de injeção

Após a execução de alguns testes onde foram injetados no sistema HPLC as soluções padrão de ACE – K a 10 e 20 µg/mL, SAC a 10 e 20 µg/mL e ASP a 10 e 20 µg/mL, bem como a 1 mg/mL, tendo como um dos principais objetivos analisar o formato e resolução dos picos cromatográficos destes três edulcorantes, observou-se que com a injeção de 20 µL era possível quantificar com boa resolução o ASP e que o problema da distinção visual entre os picos cromatográficos do ACE – K e da SAC não existia.

A redução do volume de injeção apenas se justificou quando se procedeu à análise de amostras de néctares e de alguns refrigerantes. No caso dos néctares, a opção de injetar apenas o volume de 5 µL deveu-se ao facto das amostras, no intervalo de tempo entre os 3 e os 7 min, apresentarem muitos picos cromatográficos, o que dificultava a identificação quantitativa e qualitativa tanto do ACE – K como da SAC, pelo que esta redução do volume de injeção facilitou e tornou mais rigorosa a quantificação destes edulcorantes.

Para determinados refrigerantes, a redução do volume de injeção para 10 µL e por vezes de apenas 5 µL, permitiu resolver certas dúvidas perante a possível identificação de um edulcorante não mencionado na rotulagem, visto que a manutenção desse pico a um menor volume de injeção indicava a sua presença e eliminava a possibilidade se ser considerado um interferente.

II.3.1.4. Tempo de corrida cromatográfica

Visto que o ACE – K apresentava um tempo de retenção na ordem dos 5,90 a 6,40 min, a SAC no intervalo dos 6,80 a 7,20 min e o ASP entre os 17,30 e os 19 min, o tempo de

corrida estabelecido para as soluções padrão nos ensaios das curvas de calibração e para os ensaios de fortificação foi de 20 min. Os tempos de retenção são afetados pela temperatura, o que justifica os intervalos de retenção de cada um destes aditivos alimentares e tendo as análises no sistema HPLC sido realizados numa sala não climatizada a temperatura ia aumentando ao longo do dia atingindo um máximo de 25 °C, o que originava um menor tempo de corrida dos edulcorantes, sem que esta compromettesse a separação dos analitos e a resolução dos picos cromatográficos. De modo a evitar uma falsa interpretação de resultados, a anterior situação do aumento de temperatura emitido por um sistema de aquecimento foi evitado ao máximo quando se procedeu à análise das amostras.

O tempo de corrida estabelecido para as amostras foi superior, 25 min, para que deste modo se evitasse situações em que na análise seguinte pudessem aparecer interferentes, presentes em certas bebidas, devido à retenção na coluna de compostos de amostras anteriormente injetadas, sendo por isso preventivo este maior tempo de corrida.

II.3.1.5. Comprimento de onda de deteção

Apesar da metodologia adotada seguir o procedimento relatado por Lino & Pena (2010), a determinação dos edulcorantes em estudo no comprimento de onda 235 nm não se demonstrou eficaz no sentido em que não permitia a quantificação do ASP, e pela presença substancial de interferentes.

Ainda na gama do ultravioleta, o aumento do comprimento de onda para 254 nm permitiu a redução dos interferentes e uma boa resolução na quantificação do ASP, bem como uma aceitável separação dos picos cromatográficos do ACE – K e da SAC.

As condições cromatográficas utilizadas na deteção e quantificação dos edulcorantes em estudo encontram-se documentadas no Anexo II e no Anexo III apresenta-se um

cromatograma de uma solução padrão de ACE – K (100 mg/L), SAC (80 mg/L) e ASP (200 mg/L).

II.3.2. Desempenho analítico

No desenvolvimento deste trabalho experimental foram realizados três parâmetros, a linearidade através da construção das curvas de calibração, em fase móvel e em matriz, e os ensaios de fortificação, a fim de avaliar a exatidão e a precisão da metodologia analítica.

II.3.2.1. Linearidade

A linearidade avaliada através do traçado das curvas de calibração em fase móvel e em matriz foi estudada para as gamas de concentração entre 10 e 350 mg/L para o ACE – K, entre 10 e 100 mg/L para a SAC e entre 25 e 600 mg/L para o ASP.

A determinação da linearidade da gama de trabalho adotada foi possível através da elaboração da curva de calibração, neste caso em fase móvel, obtida através do processo de regressão linear dos mínimos quadrados entre a média das áreas dos picos cromatográficos e a concentração do analito na solução padrão.

Nas Figuras 21 a 23 estão representadas as curvas de calibração em fase móvel do ACE – K, da SAC e do ASP, respetivamente.

Os coeficientes de regressão linear (R^2) permitem avaliar a linearidade das curvas de calibração obtidas. De acordo com o guia de controlo interno de qualidade do Instituto Nacional de Saúde (INSA) para o resultado ser considerado adequado, o R^2 deve ser superior ou igual a 0,995. Como se pode observar nas Figuras 21 a 23, os coeficientes de regressão linear obtidos nas curvas de calibração em fase móvel foram 0,9997 para o ACE

– K, 0,9977 para a SAC e 0,9959 para o ASP. Portanto em todas as curvas obtidas, o R^2 foi superior ao valor estabelecido pelo guia de controlo interno de qualidade do INSA.

Tal como para as anteriores curvas de calibração em fase móvel, as linearidades em matriz foram obtidas através do processo de regressão linear dos mínimos quadrados entre a média das áreas dos picos cromatográficos e a concentração do analito na solução padrão.

Nas Figuras 24 a 26 estão representadas as curvas de calibração em matriz do ACE – K, da SAC e do ASP, respetivamente.

Como se pode observar pelas Figuras 24 a 26, os coeficientes de determinação obtidos nas curvas de calibração em matriz foram 0,9993 para o ACE – K, 0,9997 para a SAC e 0,9989 para o ASP. Tal como para as curvas de calibração em fase móvel, em todas estas curvas o R^2 foi superior ao valor estabelecido pelo guia de controlo interno de qualidade do INSA. Portanto tanto em fase móvel como em matriz, as linearidades foram adequadas.

Através das curvas de calibração é possível calcular o efeito da matriz, nomeadamente através da equação II.3.2.1.1., onde B representa o declive da curva de calibração em matriz e A representa o declive da curva de calibração em fase móvel.

$$EM(\%) = \frac{B}{A} \times 100 \quad \text{Equação II.3.2.1.1.}$$

O efeito da matriz absoluta permite determinar se a matriz escolhida é responsável por um aumento ($EM(\%) > 100 \%$) ou diminuição do sinal ($EM(\%) < 100 \%$), ou mesmo se esta não revela qualquer efeito sobre o sinal ($EM(\%) = 100 \%$). Portanto, como em todos os edulcorantes, o EM% foi inferior a 100 %, nomeadamente 98 % para o ACE – K e para o ASP e 95 % para a SAC (Tabela 17), a matriz utilizada é responsável por uma supressão do sinal pouco significativa.



Figura 21. Curva de calibração do acessulfame – K em fase móvel. Área do pico cromatográfico, em mV, representado no eixo dos yy e a concentração deste edulcorante, em mg/L, no eixo dos xx.



Figura 22. Curva de calibração da sacarina em fase móvel. Área do pico cromatográfico, em mV, representado no eixo dos yy e a concentração deste edulcorante, em mg/L, no eixo dos xx.



Figura 23. Curva de calibração do aspártamo em fase móvel. Área do pico cromatográfico, em mV, representado no eixo dos yy e a concentração deste edulcorante, em mg/L, no eixo dos xx.



Figura 24. Curva de calibração do acessulfame - K em matriz. Área do pico cromatográfico, em mV, representado no eixo dos yy e a concentração deste edulcorante, em mg/L, no eixo dos xx.



Figura 25. Curva de calibração da sacarina em matriz. Área do pico cromatográfico, em mV, representado no eixo dos yy e a concentração deste edulcorante, em mg/L, no eixo dos xx.



Figura 26. Curva de calibração do aspártamo em matriz. Área do pico cromatográfico, em mV, representado no eixo dos yy e a concentração deste edulcorante, em mg/L, no eixo dos xx.

Tabela 17. Determinação do efeito da matriz (%) para cada um dos três edulcorantes, a partir dos declives da reta obtidos na curva da calibração em matriz e em fase móvel.

Edulcorantes	Equação da reta		Coeficiente de Regressão linear (R ²)		Declive da reta		Efeito de matriz (%)
	Matriz	Fase móvel	Matriz	Fase móvel	Matriz	Fase móvel	
ACE – K	Y = 24 473x + 89 416	Y = 25 245x + 16 366	0,9993	0,9997	24 473	25 245	98
SAC	Y = 9 824,1x + 10 534	Y = 10 343x - 9 757,1	0,9997	0,9977	9 824,1	10 343	95
ASP	Y = 1 037,9x - 3 073,5	Y = 1 056,6x - 12 299	0,9989	0,9959	1 037,9	1 056,6	98

II.3.2.2. Exatidão e precisão

Como mencionado no subcapítulo II.2.3., os ensaios de fortificação foram realizados com três replicados para cada um dos níveis de fortificação no mesmo dia e em em três dias distintos e o procedimento adotado encontra-se esquematizado nas Figuras 19 e 20.

Os três níveis de fortificação escolhidos neste procedimento de validação foram 35, 100 e 350 mg/L para o ACE – K, 40, 80 e 100 mg/L para a SAC e 50, 200 e 600 mg/L para o ASP.

Os resultados obtidos para a exatidão, avaliada através da percentagem de recuperação, e para a precisão, analisada a partir da repetibilidade intra-dia e inter-dia, encontram-se na Tabela 18.

No caso do ACE – K as recuperações médias (n=3) foram de 89,67 %, 106,2 % e 97,6 % para os níveis de fortificação de 35, 100 e 350 mg/L, respetivamente. A exatidão obtida para a SAC nos níveis de fortificação de 40, 80 e 100 mg/L foi de 85,63 %, 104,5 % e 97,8 %, respetivamente. Por último, o ASP apresenta recuperações médias de 92 %, 95,13 % e 91,7 % para os níveis de concentração de 50 mg/L, 200 mg/L e 600 mg/L, respetivamente. Portanto como as percentagens de recuperação oscilaram entre 85,63 % (SAC a 40 mg/L)

e 106,2 % (ACE – K a 100 mg/L), e considerando o critério de aceitação definido para este tipo de ensaios (recuperação > 75 %) pode-se afirmar que foi obtida uma exatidão aceitável.

Em relação à precisão, os resultados obtidos para a repetibilidade intra-dia são bastante coerentes. Este parâmetro de validação é decrescente com o aumento do nível de fortificação do ACE – K, tendo se obtido os valores de 4,34, 4,11 e 2,26 para os níveis de fortificação a 35, 100 e 350 mg/L, respetivamente. Para a SAC verifica-se que a repetibilidade intra-dia varia entre 1,68 e 5,97 para os níveis de fortificação a 40 e 100 mg/L respetivamente. A precisão intra-dia obtida para o ASP foi de 3,12, 3,78 e 3,68 para níveis de fortificação a 50, 200 e 600 mg/L, respetivamente.

A nível da repetibilidade inter-dia, os resultados foram mais dispersos. Para o ACE – K foram obtidos valores de 11,56, 3,05 e 10,49 para os níveis de fortificação a 35, 100 e 350 mg/L, respetivamente. Tanto para a SAC como para o ASP a precisão inter-dia diminui com o aumento da concentração, tendo-se observado para a SAC os valores de 19,87 13,17 e 11,3 para os níveis de fortificação de 40, 80 e 100 mg/L, respetivamente. Os valores obtidos para o ASP foram de 22,9, 15,67 e 10,4, respetivamente para 50, 200 e 600 mg/L.

Tabela 18. Exatidão, repetibilidade intra-dia e inter-dia obtidas para cada um dos níveis de fortificação do acessulfame – K, da sacarina e do aspártamo.

Edulcorantes	Nível de fortificação (mg/L)	Exatidão (n=3)	Repetibilidade Intra - dia	Repetibilidade Inter - dia
ACE – K	35	89,67	4,34	11,56
	100	106,2	4,11	3,05
	350	97,6	2,26	10,49
SAC	40	85,63	1,68	19,87
	80	104,5	5,64	13,17
	100	97,8	5,97	11,3
ASP	50	92	3,12	22,9
	200	95,13	3,78	15,67
	600	91,7	3,68	10,4

II.3.2.3. Limites de deteção e de quantificação

Como mencionado no subcapítulo II.2.4., os limites de deteção e de quantificação foram calculados através da equação II.2.4.1. As variáveis b e S_{Br} , da anterior equação, foram obtidas a partir das curvas de calibração em solvente de cada um dos três edulcorantes em estudo.

Na Tabela 19 encontram-se registados os valores de LODs e LOQs obtidos para o ACE – K, a SAC e o ASP.

Tabela 19. Limite de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) obtidos para cada um dos edulcorantes em análise.

Edulcorantes	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
ACE – K	9,55	28,94
SAC	6,86	20,77
ASP	59,86	181,30

Os limites de deteção oscilaram entre 6,86 mg/L para a SAC e 59,86 mg/L para o ASP, enquanto os limites de quantificação variaram entre 20,77 e 181,30 mg/L também para a SAC e para o ASP, respetivamente. O intervalo entre o LOD e o LOQ é relativamente reduzido para o ACE – K e para a SAC enquanto para o ASP irá se verificar muitas amostras com concentrações dentro desta gama pelo facto de englobar concentrações entre 59,86 e 181,30 mg/L, um intervalo muito amplo. De notar que o LOQ determinado para a SAC (20,77 mg/L) corresponde a 25 % do limite máximo permitido em refrigerantes sem gás e o do ASP (181,30 mg/L) corresponde a 30 % do permitido em refrigerantes e néctares.

Comparativamente a outros investigadores que também utilizaram a técnica HPLC-UV para a determinação de edulcorantes em matrizes alimentares, verifica-se que os LODs e os

LOQs obtidos para os edulcorantes em análise são de facto muito mais elevados e por isso há uma menor sensibilidade. Diogo *et al.* (2013) obtiveram valores de LOQ de 1,5 mg/L para o ACE – K, 3,0 mg/L para a SAC e 6,0 mg/L para o ASP. Também Kritsunankul & Jakmune (2011) encontraram um LOD de 1,1 mg/L e um LOQ de 3,6 mg/L para o ACE – K, e para a SAC 1,2 mg/L e 4,0 mg/L, respetivamente.

II.3.3. Ocorrência de edulcorantes em bebidas

Concluída a validação da metodologia analítica, procedeu-se à deteção e quantificação dos três edulcorantes nas 56 amostras adquiridas em zonas comerciais da zona centro do país.

O procedimento experimental adotado para preparação e purificação encontra-se esquematizado na Figura 19. A classificação das amostras na sua respetiva categoria de bebida está presente no Anexo I. Todas as amostras foram analisadas através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a deteção por ultravioleta a 254 nm.

Na Figura 27 pode-se observar através de um gráfico de barras empilhado a concentração de cada um dos edulcorantes em análise em cada uma das amostras, encontrando-se agrupado de acordo com a sua categoria de bebida.

Desta forma verifica-se que a presença de cada um dos edulcorantes está dependente da categoria de bebida em questão, pois por exemplo em bebidas desportivas apenas se verifica a presença de ACE – K, no caso de bebidas energéticas para além do ACE – K também está presente o ASP, em maior teor, e em refrigerantes à base de águas minerais o ASP é o edulcorante mais utilizado, mas também se encontra ACE – K e SAC, em apenas uma amostra embora em menores concentrações. Tanto os refrigerantes tradicionais como os refrigerantes à base de extratos de chá apresentam os três edulcorantes em análise e a sua concentração é bastante distinta entre amostras e aparenta também ser influenciada pela marca produtora (Figura 27).

Através da Figura 27 e do Anexo IV também é possível observar situações em que de facto estes edulcorantes estão presentes em quantidades que ultrapassam as DMU. No caso dos refrigerantes tradicionais, os três edulcorantes estão dentro dos limites, sendo a amostra R21 a que apresenta um maior teor de edulcorante nesta categoria, 419,17 mg/L de ASP, no entanto não ultrapassam a DMU. Os refrigerantes à base de águas minerais e à base de extratos de chá não revelam qualquer situação preocupante tendo em conta o ACE – K e o ASP, no entanto no que respeita à SAC as amostras C1, C4 e C5 apresentam concentrações de 80,5, 101,76 e 82,9 mg/L, respetivamente, ultrapassando a DMU estabelecida. As bebidas desportivas não revelam situações inquietantes. Os néctares e as bebidas energéticas apresentam estes edulcorantes em concentrações aceitáveis, com excepção das amostras E2, N3 e N8, que apresentam o ASP (679,8 mg/L), o ACE – K (641,48 mg/L) e a SAC (93,68 mg/L), respetivamente, em concentrações bem superiores às DMU permitidas (Anexo IV).

No Anexo I observa-se a gama de pHs presentes nas diferentes amostras analisadas. Começando por analisar o ACE – K, observa-se que está presente a um pH mínimo de 2,78 numa amostra de néctar e a um pH máximo de 4,08 numa amostra de refrigerante à base de extratos de chás. De notar que este edulcorante não apresenta qualquer problema com esta gama de pHs visto que, como se observa na Tabela 3, mesmo até 100 semanas de armazenamento à temperatura ambiente (20 °C) não apresenta nenhuma variação considerável na sua concentração. A SAC apenas sofre hidrólise em condições extremas durante um tempo prolongado, como temperatura altas e pH alto ou baixo, e por exemplo o aquecimento durante 1 h a 150 °C de uma solução de sacarina tamponada a pH entre 3,3 – 8,0 mantém a solução praticamente inalterada. Visto as amostras que apresentam SAC se encontrarem na gama de pH entre 2,88 – 3,69, associado a um refrigerante à base de águas mineral e a um à base de extratos de chá, respetivamente, a única questão que se levanta é se as condições de armazenamento serão suficientes para originar o produto da hidrólise da SAC em condições ácidas (pH < 3,3), o ácido 2 – sulfobenzóico. No entanto visto se encontrarem muito possivelmente à temperatura ambiente isto dificilmente acontecerá (8 amostras). O ASP está presente nas matrizes analisadas a um pH mínimo de 2,78 (amostra de néctar) e a um máximo de 4,65 (refrigerante à base de água mineral). Considerando esta gama de pHs, verifica-se que inclui o valor ao qual apresenta estabilidade máxima (pH = 4,3), mas por outro lado abrange a faixa (pH < 3,0) na qual sofre hidrólise

em aspartilfenilalanina e metanol. De notar a existência de 5 amostras que contém ASP e apresentam $\text{pH} < 3,0$.

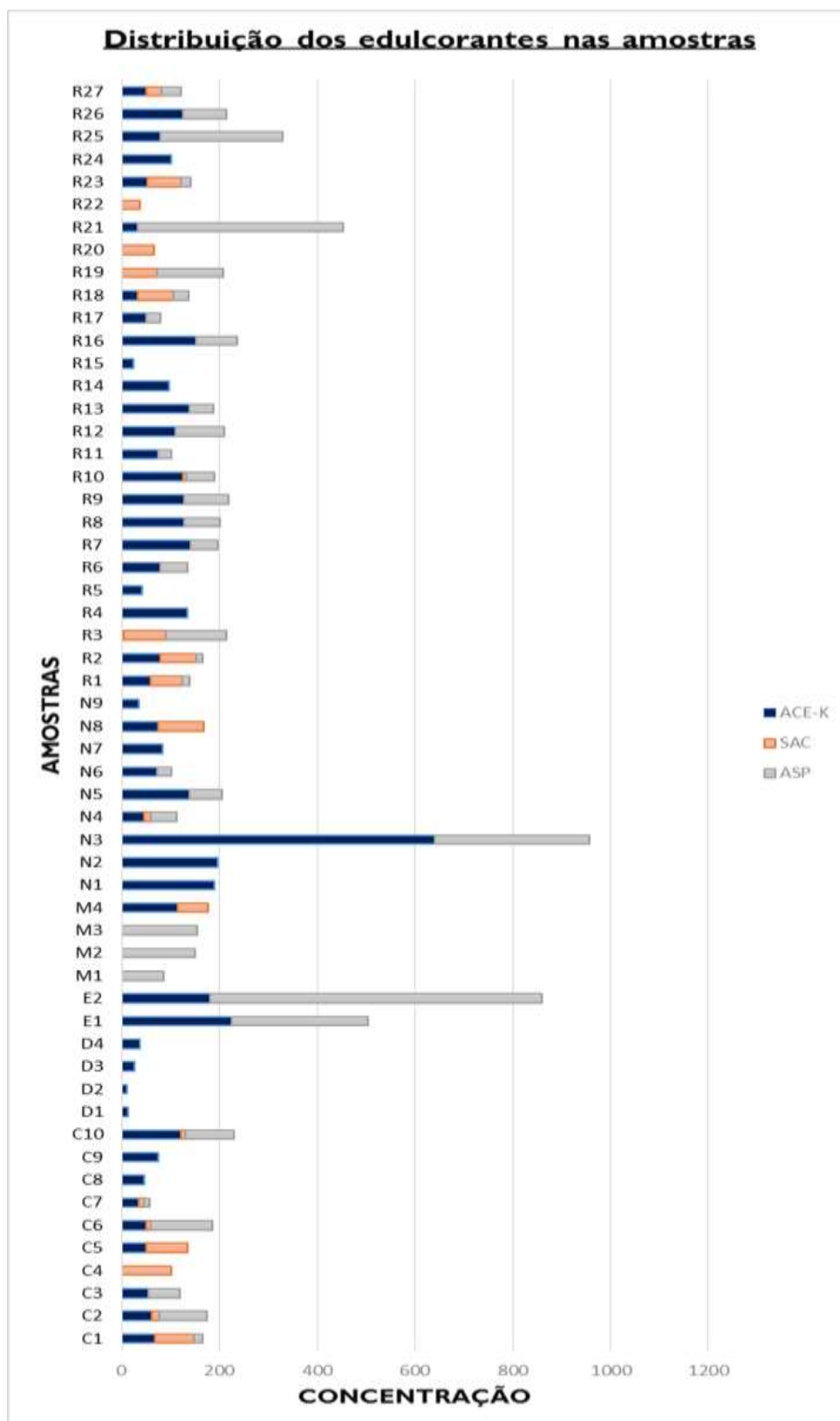


Figura 27. Distribuição das concentrações do acessulfame – K, da sacarina e do aspártamo perante as diferentes amostras analisadas. As amostras encontram-se agrupadas por categorias de bebidas.

Na Tabela 20 estão representadas as combinações de edulcorantes utilizadas nas distintas categorias de bebidas analisadas. Como se pode observar, para além dos edulcorantes em análise nas amostras também surgem o ciclamato (CYC), a neohesperidina dihidrocalcona (NHDC) e a sucralose (SUC).

Tabela 20. Contabilização da utilização das misturas de edulcorantes nos refrigerantes (tradicionais, à base de extratos de chá e à base de águas minerais), nas bebidas desportivas e energéticas e nos néctares.

Mistura de edulcorantes	Refrigerantes					
	Tradicionais	À base de extratos de chá	À base de águas minerais	Bebidas desportivas	Bebidas energéticas	Néctares
ACE – K / ASP	5	5	-	-	2	3
ACE – K / ASP / SUC	1	-	-	-	-	1
ACE – K / ASP / CYC	5	-	-	-	-	-
ACE – K / ASP / NHDC	1	-	-	-	-	-
ACE – K / SAC / CYC	-	-	1	-	-	-
ACE – K / SAC / SUC	-	1	-	-	-	-
ACE – K / SAC / ASP / CYC	6	1	-	-	-	-
ACE – K / SAC / ASP / SUC	1	-	-	-	-	-
ACE – K / SUC	5	2	-	4	-	5
ASP	-	-	3	-	-	-
SAC	1	-	-	-	-	-
SAC / ASP / CYC	1	-	-	-	-	-
SAC / CYC	1	-	-	-	-	-
SAC / CYC / NHDC	-	1	-	-	-	-
TOTAL	27	9	4	4	2	9

A mistura ACE – K / SAC / ASP / CYC é a mais frequente nas amostras de refrigerantes tradicionais analisadas, aparecendo em 6 das amostras, seguindo-se as misturas ACE – K / ASP, ACE – K / ASP / CYC e ACE – K / SUC (n=5). Nos refrigerantes à base de extratos de chá, a mistura ACE – K / ASP é a mais comum (n=5) e nos refrigerantes à base de águas minerais a utilização é a de apenas ASP (n=3). Nas bebidas desportivas apenas é utilizado a mistura ACE – K / SUC e, nas bebidas energéticas apenas a mistura ACE – K / ASP (n=2). Nos néctares, a mistura ACE – K / ASP / SUC (n=1) é a menos presente e mais comum coincide com a mistura ACE – K / SUC (n=5) (Tabela 20).

Na Tabela 21 encontra-se explicitada a ocorrência, expressa em percentagem, a variação e a média, expressas em miligramas por litro, de cada um dos edulcorantes em cada uma das categorias de bebidas analisadas. O número de amostras de cada uma das categorias que

apresentam um dado edulcorante numa concentração dentro da gama de concentrações entre o LOD e o LOQ também é expresso nesta tabela.

Como se pode observar na referida tabela, o ACE – K em comparação com a SAC e o ASP é o mais utilizado, estando presente em 49 das 56 amostras adquiridas na zona centro do país. Verifica-se a sua presença a 100 % das amostras de bebidas desportivas, energéticas e néctares, com concentrações médias de 21,89, 202,59 e 164,14 mg/L, respetivamente. Tendo em conta os refrigerantes, o ACE – K está presente em 90 % dos refrigerantes à base de extratos de chás, 89 % dos refrigerantes tradicionais e em apenas uma amostra de refrigerantes à base de águas minerais, com concentrações médias de 62,55 e 85,29, respetivamente. Das amostras analisadas apenas uma amostra de néctar revelou uma concentração de 641,48 mg/L, que ultrapassa bastante a DMU estabelecida de 350 mg/L. Apesar de na rotulagem mencionar que, pelo facto de se tratar de um concentrado, seria necessário diluir esta amostra sete vezes, e de nesses termos a concentração do ACE – K passar a estar dentro do permitido (91,64 mg/L), não existe uma DMU distinta para este tipo de matriz alimentar. No geral, todas as outras amostras apresentam este edulcorante bem abaixo dos 350 mg/L estabelecidos, verificando – se uma concentração máxima de 152,61, 120,31, 38,12 e 225,18 mg/L para os refrigerantes tradicionais, refrigerantes à base de extratos de chá, bebidas desportivas e bebidas energéticas, respetivamente.

Comparativamente a outros estudos realizados na Europa, a concentração média de ACE – K determinada em refrigerantes tradicionais, 85,29 mg/L, é superior ao descrito anteriormente em Portugal por Lino *et al.* (2008), 72 mg/L, e por Diogo *et al.* (2013), 38 mg/L. Situação análoga foi observada por Leth *et al.* (2007) na Dinamarca (62 mg/L) e por Zigler *et al.* (2011) na Polónia (38 mg/L), enquanto Huvaere *et al.* (2011), na Bélgica, encontraram teores médios significativamente mais elevados (88 mg/L), assim como Zigler *et al.* (2011) (91,8 mg/L). No Brasil, Bergamo *et al.* (2011) encontraram teores de 143 mg/L em refrigerantes. No continente asiático, Sakai *et al.* (2015), no Japão, Zhu *et al.* (2005), na China e Kritsunankul & Jakmune (2011), na Tailândia, observaram concentrações médias de ACE-K em refrigerantes de 127 mg/L, 1290,37 mg/L e 177 mg/L, respetivamente, sendo o caso da China mais de 10 vezes superior. Nos EUA, Shah *et al.* (2014) encontraram menores concentrações médias em refrigerantes carbonatados (59,4 mg/L) e em não

carbonatados (38,7 mg/L). Apenas uma amostra de refrigerantes à base de águas minerais continha ACE – K com um teor de 114,6 mg/L, valor superior ao descrito anteriormente em Portugal, 48 e 34,1 mg/L, por Lino *et al.* (2008) e por Diogo *et al.* (2013), respetivamente. A concentração média obtida em bebidas desportivas (21,89 mg/L) foi inferior ao descrito no Japão por Sakai *et al.* (2015), 64,05 mg/L, e ao obtido na Bélgica por Huvaere *et al.* (2011), 55 mg/L. Relativamente ao descrito anteriormente por Diogo *et al.* (2013) em Portugal (66,3 mg/L) e por Huvaere *et al.* (2011) na Bélgica (20 mg/L), a concentração média determinada em bebidas energéticas, 202,59 mg/L, é sem dúvida muito mais elevada. Quanto aos néctares, a concentração média de ACE – K determinada (164,14 mg/L) é superior ao descrito a nível europeu por Janvier *et al.* (2015), em Itália (50 mg/L), e por Lino *et al.* (2008) (128 mg/L) e por Diogo *et al.* (2013) (88,2 mg/L), em Portugal. Tal como no presente documento, Lino *et al.* (2008) também descreveram uma situação em que a concentração de ACE – K em néctares (356 mg/L) foi superior ao estabelecido pela legislação.

Dos edulcorantes em análise, a SAC é sem dúvida a menos frequentemente utilizada, estando presente em 20 das 56 amostras em estudo. Não foi detetada nas 4 bebidas desportivas e nas 2 bebidas energéticas analisadas. Considerando os refrigerantes tradicionais, a SAC está presente em 10 (37,03 %) com uma concentração média de 57,27 mg/L, variando entre 29,51 e 85,4 mg/L, valores inferiores à DMU estabelecida para os refrigerantes com gás, 100 mg/L. Nos refrigerantes à base de extratos de chás, a concentração média é de 44,31 mg/L e a frequência de deteção é de 70 %. No que respeita às amostras de refrigerantes à base de águas minerais, apenas uma continha SAC, 61,04 mg/L. Apesar de este edulcorante ser de facto menos utilizado é o que apresenta um maior número de amostras com teores que ultrapassam a DMU, tendo tal situação sido verificada em três casos de refrigerantes à base de extratos de chás (80,5, 101,76 e 82,69 mg/L) e um de néctares (93,68 mg/L). A concentração média de SAC nos néctares é de 53,55 mg/L (Tabela 21).

Tabela 21. Ocorrência (%) variação e média das concentrações (mg/L) do acesulfame – K, da sacarina e do aspártamo em refrigerantes tradicionais, à base de águas minerais e à base de extratos de chá, em bebidas desportivas e energéticas e em néctares. Quantificação do número de amostras com concentração entre o LOD e o LOQ. (Valores acima da DMU encontram-se marcados a amarelo).

TIPO DE AMOSTRA	AMOSTRAS ANALISADAS	ACESULFAME – K (ACE – K)					SACARINA (SAC)					ASPARTAMO (ASP)				
		OCORRÊNCIA (%)	VARIACÃO (mg/L)	LOD < LOQ	MÉDIA (mg/L)	OCORRÊNCIA (%)	VARIACÃO (mg/L)	LOD < LOQ	MÉDIA (mg/L)	OCORRÊNCIA (%)	VARIACÃO (mg/L)	LOD < LOQ	MÉDIA (mg/L)	OCORRÊNCIA (%)	VARIACÃO (mg/L)	LOD < LOQ
REFRIGERANTES TRADICIONAIS	27	89	nd - 152,61	1	85,29	37,03	nd - 85,4	0	57,27	74,07	nd - 419,17	7	87,82			
REFRIGERANTES À BASE DE ÁGUAS MINERAIS	4	25	-	0	-	25	-	0	-	75	nd - 153,66	3	129,33			
REFRIGERANTES À BASE DE EXTRATOS DE CHÁ	10	90	nd - 120,31	0	62,55	70	nd - 101,76	4	44,31	60	nd - 126,1	4	69,215			
BEBIDAS DESPORTIVAS	4	100	11,7 - 38,12	3	21,89	0	-	0	-	0	-	0	-			
BEBIDAS ENERGÉTICAS	2	100	180 - 225,18	0	202,59	0	-	0	-	100	277,88 - 679,8	0	478,84			
NÉCTARES	9	100	34,86 - 641,48	0	164,14	22,22	nd - 93,68	1	53,55	44	nd - 314,6	1	116,19			

De notar a existência de amostras em que a SAC está presente mas não se encontra referida na rotulagem, nomeadamente em 4 amostras de refrigerantes à base de extratos de chá (16,88, 7,03, 11,46 e 9,85 mg/L) e em 2 amostras de néctares (13,42 e 93,68 mg/L), sendo uma destas situações derespeitadora da legislação em vigor.

Em relação ao espectro europeu verifica-se que as concentrações médias de SAC determinadas em refrigerantes tradicionais (57,27 mg/L) é inferior ao relatado em Portugal por Lino *et al.* (2008) (75 mg/L), na Polónia por Zigler *et al.* (2011) (92,65 mg/L em referigerantes carbonatados), mas superior ao descrito em Portugal (18,4 mg/L em refrigerantes) por Diogo *et al.* (2013), na Bélgica (27 mg/L em refrigerantes carbonatados) por Huvaere *et al.* (2011) e na Dinamarca (29 mg/L em refrigerantes carbonatados e 37 mg/L em refrigerantes) por Leth *et al.* (2007). Nos EUA e no Brasil as concentrações médias descritas também são bem superiores, 121,5 mg/L em refrigerantes carbonatados e 136,5 mg/L em refrigerantes, respetivamente. Situação análoga se verifica na China (381,81 mg/L em refrigerantes carbonatados) (Zhu *et al.*, 2005). Considerando os refrigerantes à base de águas minerais, Diogo *et al.* (2013) também descreveram a presença de SAC em apenas uma amostra (3,2 mg/L) mas em concentrações muito inferiores às determinadas no presente estudo (61,04 mg/L). À semelhança do atual estudo, a SAC não foi detetada por Huvaere *et al.* (2011), na Bélgica, em bebidas desportivas e energéticas nem por Diogo *et al.* (2013) em Portugal em bebidas energéticas. De todos os investigadores mencionados na Tabela 10, apenas Diogo *et al.* (2013) relataram a presença de SAC numa amostra de néctares, portanto a concentração média determinada neste estudo, 53,55 mg/L, é de facto a maior até ao momento descrita. Como já mencionado, no presente estudo, ocorreram 4 situações em que as concentrações de SAC são superiores ao permitido legalmente. A nível europeu foi relatado por Lino *et al.* (2008) e por Diogo *et al.* (2013) a existência de amostras de refrigerantes nas mesmas circunstâncias, 89 e 80,5 mg/L, respetivamente, e por Zyglér *et al.* (2011) numa amostra de refrigerante carbonatado (173,7 mg/L).

No caso do ASP, este está presente em 35 amostras das 56 amostras de diferentes tipos de bebidas, com excepção das bebidas desportivas em que não foi detetada a sua presença. Considerando os refrigerantes, o ASP apresenta uma ocorrência de 75 % nos refrigerantes à base de águas minerais, 74,07 % nos refrigerantes tradicionais e 60 % nos refrigerantes à

base de extratos de chá. A sua concentração média é de 69,215 mg/L em refrigerantes à base de extratos de chá, variando entre 11,16 e 126,1 mg/L. A nível dos refrigerantes tradicionais, este edulcorante apresenta uma concentração média de 87,82 mg/L, oscilando entre 71,32 e 419,17 mg/L. Nas três amostras de refrigerantes à base de águas minerais a concentração média foi de 129,33 mg/L, com teores entre 84,93 e 153,66 mg/L. Tendo em conta os néctares, o ASP está presente em quatro das amostras analisadas (44,4 %) com uma concentração média de 116,19 mg/L, apresentando teores entre os 66,19 e 314,6 mg/L. Por último, nas duas amostras de bebidas energéticas analisadas, o ASP apresentou teores de 277,88 e 679,8 mg/L situando-se este valor acima do permitido (Tabela 21).

A concentração média de ASP obtida nos refrigerantes tradicionais envolvidos neste estudo, 87,82 mg/L, quando comparada com as obtidas por Lino *et al.* (2008), em Portugal (89 mg/L), Leth *et al.* (2007), na Dinamarca (124 mg/L em refrigerantes e 450 mg/L em refrigerantes carbonatados), e Zygler *et al.* (2011), na Polónia (221,7 mg/L em refrigerantes carbonatados) é inferior. Situações semelhantes verificaram-se fora da Europa, nomeadamente no Brasil (Bergamo *et al.*, 2011) (94 mg/L em refrigerantes), nos EUA (Shah *et al.*, 2014) (235 mg/L em refrigerantes não carbonatados e 154,6 mg/L em refrigerantes carbonatados), no Japão (Sakai *et al.*, 2015) (159,1 mg/L em bebidas carbonatadas) e na China (Zhu *et al.*, 2005) (5030,5 mg/L em refrigerantes carbonatados). Diogo *et al.* (2013), em Portugal (16,3 mg/L em refrigerantes), e Huvaere *et al.* (2011), na Bélgica (45 mg/L em bebidas carbonatadas), descreveram concentrações médias de ASP inferiores às obtidas no presente estudo. Dados acerca das concentrações médias em refrigerantes à base de águas minerais foram anteriormente descritos em Portugal por Lino *et al.* (2008) e por Diogo *et al.* (2013), 82 e 56,3 mg/L, respetivamente, valores inferiores ao determinado no atual estudo (129,33 mg/L). Tal como se observa em Portugal, o ASP não foi detetado em bebidas desportivas por Sakai *et al.* (2015) no Japão e por Huvaere *et al.* (2011) na Bélgica. A nível de bebidas energéticas, a concentração média determinada (478,84 mg/L) é superior ao descrito anteriormente em Portugal por Diogo *et al.* (2013) (33,3 mg/L) e na Bélgica por Huvaere *et al.* (2011) (15 mg/L). No que respeita aos néctares constata-se que a concentração média obtida de 116,19 mg/L é superior aos valores descritos em Portugal por Lino *et al.* (2008) (73 mg/L) e por Diogo *et al.* (2013) (97,8 mg/L), assim como em Itália por Janvier *et al.* (2015) (39 mg/L). No geral, na Europa não tem sido relatada a presença de ASP em amostras com concentrações superiores ao limite legislado, tendo a

concentração mais alta sido descrita por Diogo *et al.* (2013) numa amostra de refrigerante à base de água mineral (568,3 mg/L).

A Tabela 22 permite analisar a concentração média de cada um dos edulcorantes, expressa em miligramas por litro (mg/L), consoante o sabor das amostras das diferentes categorias de bebidas. Além disso os refrigerantes tradicionais também estão classificados em carbonatados e não carbonatados. Embora muitas destas classes de sabores apresentem somente uma amostra ($n=1$), estas são consideradas para o estudo das concentrações conforme o sabor da bebida.

Relativamente aos refrigerantes tradicionais carbonatados verifica-se que o ACE – K e o ASP estão presentes em maiores quantidades em amostras de cola, 106,76 e 102,9 mg/L, respetivamente. No caso da SAC, a sua concentração é de 0,65 mg/L em amostras de cola, surgindo em maiores concentrações em amostras de gasosa (42,33 mg/L), de seguida em amostras de laranja (47,57 mg/L) e em maiores quantidades numa amostra de ananás (63,22 mg/L).

Considerando os refrigerantes tradicionais não carbonatados, a SAC apenas está presente em duas destas amostras, uma amostra de pêssego com 72,16 mg/L e uma amostra de laranja, limão e cenoura com 29,52 mg/L. O ASP também só está presente em três amostras não carbonatadas, uma de laranja, cenoura e limão (40,76 mg/L), outra de maçã (27,47 mg/L) e uma terceira de pêssego (13,1 mg/L). No caso do ACE-K, aparece em todos os seis diferentes sabores, nomeadamente com uma concentração média de 99,24 mg/L nas amostras de sabor tropical e cenoura e por outro lado surge com 42,41 mg/L numa amostra de sabor de limão. As concentrações de ACE – K, SAC e ASP, tanto em refrigerantes tradicionais carbonatados como não carbonatados, não revelam qualquer preocupação no que respeita à DMU.

Observando os refrigerantes à base de águas minerais, verifica-se que as amostras de sabor de limão ($n=3$) não apresentam ACE – K nem SAC, e exibem ASP a uma concentração de

129,33 mg/L. Por outro lado, a amostra de aroma natural não revela a presença de ASP mas contém ACE – K (114,6 mg/L) e SAC (61,04 mg/L).

Em relação aos refrigerantes à base de extratos de chá, a maior concentração de ACE – K, 75,28 mg/L, verifica-se numa amostra de sabor de cidreira, tília, camomila e limão, e no caso do ASP, 71,87 mg/L, está associada a amostras de sabor a manga (n=2). As menores concentrações de ACE – K, SAC e ASP estão associadas às amostras de sabor de limão e chá verde (n=3), 45,33, 3,82 e 25,59 mg/L, respetivamente. De notar a existência de uma amostra de sabor a pêsego que apresenta um teor de SAC de 82,69 mg/L, valor superior ao estabelecido pela legislação (80 mg/L).

Tabela 22. Concentração de acessulfame – K, de sacarina e de aspártamo em refrigerantes tradicionais, com e sem gás, refrigerantes à base de águas minerais, refrigerantes à base de extratos de chás e em néctares, consoante o sabor da amostra (Quando n>1, é considerado a média das concentrações.) (Valores acima da DMU encontram-se marcados a amarelo).

AMOSTRAS	ACE – K (mg/L)	SAC (mg/L)	ASP (mg/L)
REFRIGERANTES			
COM GAS			
Ananás (n=1)	59,232	63,22	16,94
Cola (n=9)	106,76	0,65	102,9
Gasosa (n=5)	47,47	42,33	101,06
Laranja (n=4)	52,215	47,57	56,72
SEM GAS			
Laranja (n=2)	79,34	-	-
Laranja, Limão e Cenoura (n=1)	51,02	29,52	40,76
Limão (n=1)	42,41	-	-
Maçã (n=1)	50,85	-	27,47
Pêssego (n=1)	79,21	72,16	13,1
Tropical e cenoura (n=2)	99,24	-	-
REFRIGERANTES À BASE DE ÁGUAS MINERAIS			
Aroma natural (n=1)	114,6	61,04	-
Limão (n=3)	-	-	129,33
REFRIGERANTES À BASE DE EXTRATOS DE CHÁ			
Cidreira, Tília, Camomila e Limão (n=1)	75,28	-	-
Limão (n=3)	60,5	42,83	64,93
Limão e chá verde (n=3)	45,33	3,82	25,59
Manga (n=2)	59,48	43,77	71,87
Pêssego (n=1)	51,2	82,69	-
NECTARES			
Concentrado (n=1)	641,48	-	314,6
Frutos vermelhos (n=1)	73,8	93,68	-
Laranja (n=2)	117,91	6,71	102,75
Manga (n=1)	34,86	-	-
Manga e laranja (n=2)	111,29	-	33,095
Pêssego (n=1)	71,68	-	30,73
Tropical (n=1)	197,07	-	-

Por último, a nível dos néctares, a SAC apenas surge a uma concentração média de 6,71 mg/L em amostras de sabor a laranja (n=2), enquanto uma amostra de frutos vermelhos (93,68 mg/L) ultrapassa a DMU. O ASP encontra-se a 314,6 mg/L numa amostra de concentrado. Uma vez que na respetiva rotulagem se menciona que deve ser diluída sete vezes em água, a concentração real será de 44,94 mg/L, o que coloca a concentração deste edulcorante próximo da concentração média encontrada em amostras de sabor a manga e laranja (33,095 mg/L), assim como da concentração de uma amostra de sabor a pêsego (30,73 mg/L). De facto as concentrações de ASP são inferiores ao permitido pela legislação, visto a concentração média mais alta ter sido encontrada em amostras de sabor a laranja, 102,75 mg/L. Na amostra de concentrado anteriormente referida para o ASP, a concentração para o ACE – K foi quase o dobro da permitida, 641,48 mg/L. No que respeita às restantes amostras, a concentração média de ACE-K foi quase idêntica em amostras de sabor a laranja e a manga e laranja, 117,91 e 111,29 mg/L, repetidamente. A menor concentração de ACE – K em néctares encontra-se numa amostra de sabor a manga (34,86 mg/L).

II.3.4. Ingestão diária estimada dos edulcorantes e avaliação de risco

Como referido no subcapítulo II.1.5., a EDI foi calculada através da equação II.1.51.1. A soma da concentração nas amostras analisadas ($\sum c$), em mg/L, foi obtida através das concentrações dos edulcorantes descritas no Anexo IV. A ingestão anual média estimada por pessoa (C) foi retirada da Probeb e corresponde ao ano de 2016. O número total de amostras (N) varia conforme a categoria. O número de dias neste ano (D) é de 365 e o peso corporal médio da população (K) considerado é de 69 kg.

A Tabela 23 apresenta as EDIs calculadas, expressas em (mg/kg p.c./dia), para cada um dos edulcorantes em estudo, tendo em conta cada uma das categorias de bebidas, bem como a respetiva comparação com a ADI do edulcorante em questão.

Observando a Tabela 23 verifica-se que para o ACE – K a ingestão diária estimada foi de 0,14 mg/kg p.c./dia pelo consumo de refrigerantes tradicionais, 0,069 mg/kg p.c./dia através

do consumo de néctares, 0,044 mg/kg p.c./dia a partir de refrigerantes à base de extratos de chás, 0,0043 mg/kg p.c./dia por bebidas energéticas, 0,0019 mg/kg p.c./dia através de refrigerantes à base de águas minerais e $1,39 \times 10^{-4}$ mg/kg p.c./dia a partir de bebidas desportivas.

A percentagem para o ACE – K oscilou entre $9,27 \times 10^{-4}$ e 0,911 % da ADI para as bebidas desportivas e refrigerantes tradicionais, respetivamente, pelo que a população portuguesa adulta está menos exposta a este edulcorante comparativamente ao descrito por Huvaere *et al.* (2011), na população belga adulta (5 % da ADI), e mais exposta que o relatado por Donne *et al.* (2017), na população italiana (0,715 % da ADI). Comparativamente ao descrito por Diogo *et al.* (2013), verifica-se que atualmente a população portuguesa adulta consome uma maior quantidade de ACE – K através de refrigerantes tradicionais (0,911 % da ADI) e néctares (0,46 %), visto que em 2013 este consumo representava 0,7 % e 0,07 % da ADI, respetivamente, enquanto pelo consumo de refrigerantes à base de águas minerais esta exposição decresceu cerca de 0,007 %.

Para a SAC não foi possível calcular a EDI através do consumo de bebidas desportivas e de bebidas energéticas. Os valores da EDI para este edulcorante oscilaram entre 0,001 mg/kg p.c./dia através do consumo de refrigerantes à base de águas minerais, o que corresponde a 0,041 % da ADI, e 0,24 mg/kg p.c./dia a partir do consumo de refrigerantes à base de extratos de chá, representando 9,76 % da ADI. A população portuguesa está mais exposta a este edulcorante que a população belga adulta (Huvaere *et al.*, 2011) e que a população italiana (Donne *et al.*, 2017). Em relação ao descrito por Diogo *et al.* (2013) observa-se que o consumo de SAC através de refrigerantes tradicionais é hoje aproximadamente três vezes superior (0,5 % da ADI, em 2013, e 1,53 % da ADI, em 2018), cerca de 10 vezes inferior (0,5 % da ADI em 2013 e 0,041 % da ADI em 2018) através do consumo de refrigerantes à base de águas minerais, e, no caso dos néctares, cerca de 4,5 vezes inferior (0,9 % da ADI, em 2013, e 0,2 % da ADI, em 2018).

Tabela 23. Ingestão diária estimada (EDI) (mg/ kg p.c. / dia) do acesulfame – K, da sacarina e do aspártamo pela população portuguesa a partir de refrigerantes (tradicionais, à base de águas minerais e à base de extratos de chá), bebidas desportivas e energéticas, e néctares. Comparação com a repetiva ingestão diária aceitável (ADI) (mg/ kg p.c. / dia).

EDULCORANTES	ADI	REFRIGERANTES											
		TRADICIONAIS		À BASE DE ÁGUAS MINERAIS		À BASE DE EXTRATOS DE CHÁ		BEBIDAS DESPORTIVAS		BEBIDAS ENERGÉTICAS		NÉCTARES	
		EDI	ADI (%)	EDI	ADI (%)	EDI	ADI (%)	EDI	ADI (%)	EDI	ADI (%)	EDI	ADI (%)
ACE - K	15	0,14	0,911	0,0019	0,013	0,044	0,3	1,39x10 ⁻⁴	9,27x10 ⁻⁴	0,0043	0,028	0,069	0,46
SAC	2,5	0,038	1,53	0,001	0,041	0,24	9,76	-	-	-	-	0,005	0,2
ASP	40	0,12	0,29	0,006	0,016	0,033	0,082	-	-	0,01	0,025	0,022	0,054

Como não está presente em bebidas desportivas, também não é possível calcular a EDI do ASP nesta categoria alimentar. Tal como para a SAC, os refrigerantes à base de águas minerais são as fontes neste estudo que menos contribuem para a EDI do ASP (0,006 mg/kg p.c./dia) representando apenas 0,016 % da ADI e os refrigerantes tradicionais são os principais contribuintes para o consumo deste edulcorante (0,12 mg/kg p.c./dia), correspondendo a 0,29 % da ADI.

A população adulta belga ingere uma maior quantidade de ASP através das distintas matrizes alimentares, representando 1 % da ADI (Huvaere *et al.*, 2011) e a população italiana está exposta a uma menor quantidade deste edulcorante (0,24 % da ADI) (Donne *et al.*, 2017). Considerando o anteriormente descrito em Portugal por Diogo *et al.* (2013), confirma-se que a população está atualmente exposta a uma maior quantidade de ASP através do consumo de refrigerantes tradicionais (0,08 % da ADI, em 2013, e 0,29 % da ADI, em 2018) e de néctares (0,02 % da ADI, em 2013, e 0,054 % da ADI, em 2018).

Perante o pior cenário para cada um dos edulcorantes (225,18 mg/L de ACE – K numa amostra de bebida energética, 101,76 mg/L de SAC numa amostra de extrato de chá e 679,8 mg/L de ASP numa amostra de bebida energética), as EDI obtida foram 0,47 mg/kg p.c./dia para o ACE – K, 8,01 mg/kg p.c./dia para a SAC e 1,43 mg/kg p.c./dia para o ASP, o que corresponde a 3,13 %, 320,4 % e 3,58 % da ADI, respetivamente. Assim o consumo de refrigerantes à base de extratos de chá com teores de SAC de 101,76 mg/L constituem um elevado risco para os respetivos consumidores.

Considerando a ADI de 15 mg/kg p.c./dia para o ACE – K, 2,5 mg/kg p.c./dia para a SAC e 40 mg/kg p.c./dia para o ASP e o peso corporal médio de 69 kg para um adulto (M/F), verifica-se que para atingir a ADI é necessário a ingestão de 1035 mg/dia de ACE – K, 172,5 mg/dia de SAC e 2760 mg/dia de ASP. Assim, tendo também em conta as concentrações médias obtidas em cada uma das matrizes alimentares analisadas (Tabela 21) é possível determinar as quantidades necessárias, expressas em litros, de cada um dos aditivos alimentares para atingir cada uma das respetivas ADI (Tabela 24).

Portanto como se pode observar na Tabela 24 e tendo como fonte apenas as matrizes alimentares analisadas, para o caso do ACE – K, os resultados obtidos são significativamente distintos, existindo soluções que provavelmente não colocarão a ingestão do ACE – K acima da ADI, da qual são exemplo as bebidas desportivas em que para que a ADI estabelecida não seja respeitada é necessário ingerir 47,28 L/dia. A exposição ao ACE – K através de bebidas energéticas aparenta apresentar maior risco porque é a matriz que necessita de menor quantidade, 5,11 L/dia, para que a ADI seja excedida.

Com base na Tabela 24, verifica-se que a quantidade de SAC para atingir a ADI é relativamente idêntica em todas as matrizes alimentares em questão, sendo necessário a ingestão de aproximadamente 3-4 L/dia. Ainda que muito semelhantes, a fonte de maior risco consiste nos refrigerantes à base de águas minerais (2,83 L/dia) e a menor corresponde aos refrigerantes à base de extratos de chás (3,89 L/dia).

Tal como para o ACE – K, o principal risco de exposição ao ASP está associado ao consumo de bebidas energéticas, uma vez que para exceder a ADI é necessário o consumo de 5,76 L/dia. De resto pode-se confirmar pela Tabela 24, que todas as outras matrizes alimentares dificilmente colocarão a população adulta em risco, sendo os refrigerantes à base de extratos de chá as fontes que colocam a população em menor risco, visto que são necessários 39,88 L/dia para que ADI seja excedida.

De um modo geral, considerando apenas as fontes de ingestão analisadas, tanto para o ACE – K como para o ASP, o risco da exposição ser superior à ADI não é preocupante, devido à necessidade de valores excessivos de consumo para tal se verificar. O consumo de bebidas energéticas aparenta ser um risco considerável, visto a ADI ser ultrapassada pela ingestão de 5,11 L/dia (ACE – K) e 5,76 L/dia (ASP), e estes são valores que, embora menores, não deixam de ser irrealistas e só se tornam preocupantes quando se conjugam com a exposição destes edulcorantes provenientes de outras matrizes alimentares que fazem parte da alimentação de um dado indivíduo. Com base na Tabela 24, pode-se também verificar que a exposição à SAC é a mais elevada dos edulcorantes em estudo, uma vez que de um modo geral para que a ADI seja excedida é apenas necessário praticamente 3 L/dia de qualquer uma das bebidas analisadas e conjugando com a exposição proveniente de

outras matriz alimentares, a sua ADI será mais facilmente excedida, também pelo facto de ser relativamente baixa (2,5 mg/kg p.c./dia).

Tabela 24. Quantidade de cada um dos edulcorantes, em litros, para atingir a ADI, tendo em conta cada uma das categorias de bebidas em estudo.

		Refrigerantes			Bebidas desportivas	Bebidas energéticas	Néctares
		Tradicionais	A base de águas minerais	A base de extratos de chá			
ACE – K	Concentração média (mg/L)	85,29	114,6	62,55	21,89	202,59	164,14
	Quantidade ACE – K para atingir a ADI (L)	12,14	9,03	16,55	47,28	5,11	6,31
SAC	Concentração média (mg/L)	57,27	61,04	44,31	-	-	53,55
	Quantidade SAC para atingir a ADI (L)	3,01	2,83	3,89	-	-	3,22
ASP	Concentração média (mg/L)	87,82	129,33	69,215	-	478,84	116,19
	Quantidade ASP para atingir a ADI (L)	31,43	21,34	39,88	-	5,76	23,75

Conclusões

Após as devidas optimizações, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta, a 254 nm, utilizada neste estudo mostrou ser adequada e eficiente para a quantificação dos edulcorantes acessulfame – K, sacarina e aspártamo em amostras de refrigerantes tradicionais, refrigerantes à base de águas minerais, refrigerantes à base de extratos de chás, bebidas desportivas, bebidas energéticas e néctares.

Nas matrizes analisadas a combinação mais comum é a de ACE – K / SUC surgindo em 16 amostras, sendo bastante frequente em refrigerantes tradicionais e em néctares, seguindo-se a mistura ACE – K / ASP presente em 15 amostras, maioritariamente em refrigerantes tradicionais e em refrigerantes à base e extratos de chá. Aparecendo em apenas uma das amostras são exemplos, as misturas ACE – K / ASP / NHDC, ACE – K / SAC / CYC, ACE – K / SAC / SUC, entre outras.

No que respeita aos teores de edulcorantes, nos diferentes tipos de bebidas, verificou-se que a maioria cumpre a legislação em vigor, excepto no que concerne ao ACE – K em uma amostra de um concentrado de néctar, à SAC em três amostras de refrigerantes à base de extratos de chá e numa de néctar e ao ASP em uma amostra de bebida energética. Assim, os dados obtidos evidenciam a necessidade de uma vigilância contínua sobre os teores dos diferentes edulcorantes nos diversos tipos de géneros alimentícios.

De notar também a existência de seis amostras que apresentam SAC (quatro refrigerantes à base de extratos de chá e dois néctares) e a sua presença não é mencionada na rotulagem.

Dos edulcorantes em estudo, conclui-se que a exposição da população adulta portuguesa à SAC através de refrigerantes à base de extratos de chá é a maior fonte tanto desta como dos edulcorantes em análise, representando 9,76 % da ADI. Os refrigerantes tradicionais são as maiores fontes de ingestão de ACE – K e ASP, tendo em conta as matrizes analisadas, representando 0,911 % e 0,29 % da ADI, respetivamente.

Este trabalho serviu para demonstrar como se encontra a situação atual da utilização dos edulcorantes escolhidos pela indústria nas diferentes bebidas comumente consumidas em Portugal, tendo em conta o anteriormente descrito tanto no nosso país como a nível mundial. Assim e considerando os resultados obtidos surge a questão de que se será benéfico passar a ser obrigatório também a menção quantitativa do edulcorante em questão na rotulagem.

A existência de tantas amostras com concentrações de SAC acima do permitido é de referir devido à sua reduzida presença no mercado em relação aos outros dois edulcorantes, além disso apresenta a maior EDI determinada e o maior risco de exceder a ADI. Portanto num futuro breve, é necessário avaliar também outras possíveis fontes destes três edulcorantes para que a análise seja mais rigorosa e se possa concluir se de facto a população portuguesa está longe ou perto de atingir a ADI.

Referências Bibliográficas

- Aditivos Alimentarios (2016). [Consultado 02 fevereiro 2018] *E962 – Sal de Aspartame y Acesulfamo*. Disponível em: <http://www.aditivos-alimentarios.com/2016/01/E962.html>
- ALMEIDA, I.; AZEVEDO, F.; LOUREIRO, M. (2010). [Consultado 14 dezembro 2017] *Síntese Aspartame*. Disponível em: <https://sites.google.com/site/sinteseaspartame/>
- ANTON, S. D.; MARTY, C. K.; HAN, H.; COULON, S.; CEFALU, W. T.; GEISELMAN, P.; WILLIAMSON, D. A. (2010) – Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*. 55, 37-43.
- AREZES, P. M.; BARROSO, M. P.; COSTA, L. G.; MIGUEL, A. S. (2004) – Anthropometric study of Portuguese workers. *International Journal of Industrial Ergonomics*. 35, 401-410.
- BERGAMO, A. B.; SILVA, J. A. F.; JESUS, D. P. (2011) – Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Food Chemistry*. 124 (4), 1714-1717.
- BIAN, X.; CHI, L.; GAO, B.; TU, P.; RU, H.; LU, K. (2017) – The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice. *PLoS One*. 12 (6), e0178426.
- BRITO, A.; PINA, A.; PEREIRA, V. (2011). [Consultado 14 dezembro 2017] *Sacarina*. Disponível em: <https://sites.google.com/site/sacarina1011/home>
- BURKEA M. V.; SMALL, D. M. (2015) – Physiological mechanisms by which non-nutritive sweeteners may impact body weight and metabolism. *Physiology & Behavior*. 152, 381-388.
- BUTCHKO, H. H.; STARGEL, W. W.; CORNER, C. P.; MAYHEW, D. A.; ANDRESS, S. E. (2001) – Aspartame. In *Alternative Sweeteners*. 3ª ed. rev. 2001. ISBN 0-8247-0437-1. Cap 4, 41-61.
- CARDOSO, M. (2014). [Consultado 14 dezembro 2017] *Sacarose*. Disponível em: <https://www.infoescola.com/quimica/sacarose/>
- CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. (2017) – Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. *Food and Chemical Toxicology*. 107, 302-317.

CHANDRASHEKAR, J.; HOON, M. A.; RYBAZ, N. J. P.; ZUKER, C. S. (2006) – The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*. 444, 288-294.

Chinese Standards for Food Additives - GB2760-2015 de 28/04/2015

Decreto-Lei n° 394/98 de 10 de Dezembro de 1998 in Diário da República – I Série-A, N° 284 de 10/12/1998, p. 6731-6738.

Decreto-Lei n.º 28/2011 de 24 de Fevereiro de 2011 in Diário da República, I.ª série - N.º 39 de 24/02/2011, pg 1152-1165.

DIOGO, J. S. G.; SILVA, L. S. O.; PENA, A.; LINO, C. M. (2013) – Risk assessment of additives through soft drinks and nectars consumption on Portuguese population: A 2010 survey. *Food and Chemical Toxicology*. 62, 548-553.

Directiva 94/35/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de Junho de 1994.

DITSCHUN, T. L.; WINTER, C. K. (2000) – Food Additives. In *Food Toxicology*. 1ª ed. rev. Florida. 2000. ISBN 0-8493-2760-1 Cap 8, 191-206.

DONNE, C. L.; MISTURA, L.; GOSCINNY, S.; JANVIER, S.; CUYPERS, K.; D'ADDEZIO, L.; SETTE, S.; CATASTA, G.; FERRARI, M.; PICCINELLI, R.; LOCO, J. V.; TUTTINI, A. (2017) – Assessment of dietary intake of 10 intense sweeteners by the Italian population. *Food and Chemical Toxicology*. 102, 186-197.

DUBOIS, G. (2012) – Saccharin and Cyclamate. In *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*. 2ª ed. rev. 2012. ISBN 978-0-470-65968-7. cap 7, 137-166.

DUBOIS, G. E.; PRAKASH, I. (2012) – Non-Caloric Sweeteners, Sweetness Modulators, and Sweetener Enhancers. *Annual Review of Food Science and Technology*. 3, 353-380.

DUBOIS, G. E. (2016) – Molecular mechanism of sweetness sensation. *Physiology & Behavior*. 164, 453-463.

EDWARDS, C. H.; ROSSI, M.; CORPE, C. P.; BUTTERWORTH, P. J.; ELLIS, P. R. (2016) – The role of sugars and sweeteners in food, diet and health: Alternatives for the future. *Trends in Food Science & Technology*. 56, 158-166.

EFSA (2014) – Scientific Opinion on Aspartame.

EFSA PANEL ON FOOD ADDITIVES AND NUTRIENT SOURCES ADDED TO FOOD (2016) – Safety of the proposed extension of use of acesulfame K (E 950) in foods for special medical purposes in young children. *EFSA Journal*. ISSN 1831- 4732.

FDA (2017). [Consultado 4 fevereiro 2018] *Code of Federal Regulations Title 21 - Sec. 172.800 Acesulfame potassium*. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=172.800>

FITCH, C.; KEIM, K. S. (2012) – Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 112 (5), 739-758.

GARCIA – ALMEIDA, J. M. ; FDEZ, G. M. C. ; ALEMÁN, J. G. (2013) - A current and global review of sweeteners; regulatory aspects. *Nutrición Hospitalaria*. 28 (4), 17 – 31.

GARDNER, C.; WYLIE – ROSETT, J.; GIDDING, S. S. ; STEFFEN, L. M. ; JOHNSON, R. K.; READER, D.; LICHTENSTEIN, A. H. (2012) – Nonnutritive Sweeteners: Current Use and Health Perspectives. *Circulation*. 126, 509-519.

GREMBECKA, M. (2015) – Natural Sweeteners in a human diet. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*. 66(3), 195-202.

GUILLEM – LLOBAT, X. (2012) – Defining, regulating and using saccharin at the outset of the industrial food era (1888–1914). *Appetite*. 59 (3), 905-911.

HAN, C.; YAO, Y.; WANG, W.; QU, L.; BRADLEY, L.; SUN, S.; ZHAO, Y. (2017) – Rapid and sensitive detection of sodium saccharin in soft drinks by silver nanorod array SERS substrates. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 251, 272-279.

HUVAERE, K.; VANDEVIJVERE, S.; HASNI, M.; VINKX, C.; LOCO, J. V. (2011) – Dietary intake of artificial sweeteners by the Belgian population. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 29 (1), 54-65.

JANVIER, S.; GOSCINNY, S.; DONNE, C. L.; LOCO, J. V. (2015) – Low - calorie sweeteners in food and food supplements on the Italian market. *Food Additives & Contaminants: Part B*. 8 (4), 298-308.

KARSTADT, M. (2013) – Inadequate Toxicity Tests of Food Additive: Acesulfame. *International Journal of Occupational and Environmental*. 16 (1), 89-96.

KIRKLAND, D.; GATEHOUSE, D. (2015). Aspartame: A review of genotoxicity data. *Food and Chemical Toxicology*. 84, 161-168.

KLUG, C.; LIPINSKI, G. - W. v. R. (2012) – Acesulfame K. In *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*. 2ª ed. rev. 2012. ISBN 978-0-470-65968-7. cap 5, 93-115.

KOKOTOU, M; ASIMAKOPOULOS, A.; THOMAIDIS, N. (2015) – Intense Sweeteners. In Handbook of Food Analysis. 3ª ed. rev. 2015. ISBN 9781466556546. cap 11, 219-232.

KRITSUNANKUL, O.; JAKMUNEE, J. (2011) – Simultaneous determination of some food additives in soft drinks and other liquid foods by flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography. Talanta. 84 (5), 1342-1349.

KUBICA, P.; NAMIESNIK, J., WASIK, A. (2015) – Determination of eight artificial sweeteners and common *Stevia rebaudiana* glycosides in non-alcoholic and alcoholic beverages by reversed-phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 407 (5), 1505-1512.

KUBICA, P.; NAMIESNIK, J., WASIK, A. (2016) – Comparison of hydrophilic interaction and reversed phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for the determination of eight artificial sweeteners and common steviol glycosides in popular beverages. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 127 (5), 184-192.

KUK, J. L.; BROWN, R. E. (2016) – Aspartame intake is associated with greater glucose intolerance in individuals with obesity. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism. 41, 795-798.

LETH, T.; FABRICIUS, N.; FAGT, S. (2007) – Estimated intake of intense sweeteners from non-alcoholic beverages in Denmark. Food Additives and Contaminants. 24(3), 227-235.

LINDSETH, G. N.; COOLAHAN, S. E.; PETROS, T. V.; LINDSETH, P. D. (2014) – Neurobehavioral Effects of Aspartame Consumption. Research in Nursing & Health. 37(3), 185-193.

LINO, C. M.; COSTA, I. M.; PENA, A.; FERREIRA, R.; CARDOSO, S. M. (2008) – Estimated intake of the sweeteners, acesulfame-K and aspartame, from soft drinks, soft drinks based on mineral waters and nectars for a group of Portuguese teenage students. Food Additives and Contaminants. 25 (11), 1291-1296.

LINO, C. M.; PENA, A. (2010) – Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment. Food Chemistry. 121, 503-508.

LIPINSKI, Gert; HANGER, Lisa (2001) – Acesulfame K. In Alternative Sweeteners. 3ª ed. rev. 2001. ISBN 0-8247-0437-1. Cap 2, pg 13-30.

LORENZO, R. A.; PENA, M. T.; FERNÁNDEZ, P.; GONZÁLEZ, P.; CARRO, A. M. (2015) – Artificial sweeteners in beverages by ultra performance liquid chromatography with photodiode array and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Control*. 47, 43-52.

MAGNUSON, B. A.; CARAKOSTAS, M. C.; MOORE, N. H.; POULOS, S. P.; RENWICK, A. G. (2016) – Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutrition Reviews*. 74 (11), 670-689.

MARINOVICH, M.; GALLI, C. L.; BOSETTI, C.; GALLUS, S.; VECCHIA, C. L. (2013) – Aspartame, low-calorie sweeteners and disease: Regulatory safety and epidemiological issues. *Food and Chemical Toxicology*. 60, 109-115.

MONTEIRO, R. (2015). [Consultado 9 dezembro 2017] *Plano de dieta cetogénica: os melhores e os piores adoçantes low – carb*. Disponível em: <http://www.paleodiario.com/2015/08/plano-de-dieta-cetogenica-os-melhores-e.html>

MOSCUCCI, I. (2014) – TABELLE CON INDICE GLICEMICO, CARICO GLICEMICO E INDICE INSULINICO DEGLI ALIMENTI Vol. I. Dolce Senza Zucchero.

MURRAY, A. B.; LOMELINO, C. L.; SUPURAN, C. T.; MCKENNA, R. (2017) – “Seriously Sweet”: Acesulfame K Exhibits Selective Inhibition Using Alternative Binding Modes in Carbonic Anhydrase Isoforms. *Journal of Medicinal Chemistry*. 10.1021/acs.jmedchem.7b01470.

MyFitnessPal (2017). [Consultado 14 dezembro 2017] *Pesquisa de alimentos*. Disponível em: <http://www.myfitnesspal.com/food/calorie-chart-nutrition-facts>

NABORS, L. O'B. (2001) – Alternative Sweeteners: An Overview. In *Alternative Sweeteners*. 3ª ed. rev. 2001. ISBN 0-8247-0437-1. Cap 1, 1-12.

OBE, A. R.; DREWNOWSKI, A.; VECCHIA, C. (2016). [Consultado 1 novembro 2017] *Low calorie sweeteners: Role and benefits*. Disponível em: https://www.sweeteners.org/assets/uploads/articles/files/ISA_short-booklet_insights-role-benefits-low-calorie-sweeteners.pdf

O'DONNELL, Kay (2012) – Aspartame, Neotame and Advantame. In *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*. 2ª ed. rev. 2012. ISBN 978-0-470-65968-7. cap 6, pg 117-136.

ORDOÑEZ, E. Y.; RODIL, R.; QUINTANA, J. B.; CELA, R. (2015) – Determination of artificial sweeteners in beverages with green mobile phases and high temperature liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 169, 162-168.

OSCARVAN (2017). [Consultado 14 dezembro 2017] *O que é acesulfame de potássio?* Disponível em: <http://varela.elonmuskk.com/o-que-e-acesulfame-de-potassio/#content>

PASSOS, F. IVO, P. (2016). [Consultado 9 dezembro 2017] *Adoçe, mas não adoça.* Disponível em: <https://flaviopassos.com/2016/07/16/adoce-mas-nao-adoeca/>

PEARSON, R. L. (2001) – Saccharin. In *Alternative Sweeteners*. 3ª ed. rev. 2001. ISBN 0-8247-0437-1. Cap 9, 147-165.

PEDERSON, W. (1991) – *Alternative Sweeteners*. In *Biotechnology and Food Ingredients*. 1ª ed. rev. Nova Iorque. 1991. ISBN 0442002726. Cap 16, 393-414.

PÉREZ, Y. (2011). [Consultado 14 dezembro 2017] *La química de los alimentos. Definición y clasificación de edulcorantes.* Disponível em: <https://educacionquimica.wordpress.com/2011/06/13/la-quimica-de-los-alimentos-definicion-y-clasificacion-de-edulcorantes/>

PETERS, J. C.; BECK, J. (2016) – Low Calorie Sweetener (LCS) use and energy balance. *Physiology & Behavior*. 164, 524-528.

Probeb – Associação Portuguesa das bebidas refrescantes não alcoólicas (2017). [Consultado 8 fevereiro 2018] *Portugal*. Disponível em: <http://probeb.pt/conteudo/Mercado-e-estat%C3%ADsticas/-/47>

PRODOLLIET, J.; BRUELHART M. (1993) – Determination of aspartame and its major decomposition products in foods. *Journal of AOAC International*. 76, 275-282.

RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA N.º.18, de 24 de Março de 2008.

REGULAMENTO (UE) N.º 1169/2011 DO Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011

REGULAMENTO (CE) N.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008

RENWICK, A. G.; NORDMANN, H. (2007) – First European conference on aspartame: Putting safety and benefits into perspective. Synopsis of presentations and conclusions. *Food and Chemical Toxicology*. 45 (7), 1308-1313.

RENWICK, A. G.; MOLINARY, S. V. (2010) – Sweet-taste receptors, low-energy sweeteners, glucose absorption and insulin release. *British Journal of Nutrition*. 104. 1415-1420.

RIBEIRO, F. (2013). [Consultado 14 dezembro 2017] *A lactose engorda?* Disponível em: <https://www.musculacao.net/a-lactose-engorda/>

SALMINEN, S.; HALLIKAINEN, A. (2001) – Sweeteners. In *Food Additives*. 2ª ed. rev. Nova Iorque. 2001. ISBN 0-8247-9343-9. cap 15, 447-476.

SAKAI, H.; YAMASHITA, A.; TAMURA, M.; UYAMA, A.; MOCHIZUKI, N. (2015) – Simultaneous determination of sweeteners in beverages by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 32 (6), 808-816.

SCF (2000) – Re-evaluation of acesulfame K with reference to the previous SCF opinion of 1991.

SHAH, R.; FARRIS, S.; JAGER, L. S. D.; BEGLEY, T. H. (2015) – A novel method for the simultaneous determination of 14 sweeteners of regulatory interest using UHPLC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 32 (2), 141-151.

SHANKAR, P.; AHUJA, S.; SRIRAM, K. (2013) – Non - nutritive sweeteners: Review and update. *Nutrition*. 29, 1293-1299.

SHIBAMOTO, T.; BJELDANES, L. F. (2009) – Food Additives. In *Introduction to Food Toxicology*. 2ª ed. rev. Califórnia. 2009. ISBN 978-0-12-374286-5. cap 10, 229-252.

SILVA, V. (2014). [Consultado 14 dezembro 2017] *Cálculos de Nutrição Parenteral*. Disponível em: <https://pt.slideshare.net/vernecksilva/clculos-em-np>

SOUTO, D. (2009). [Consultado 14 dezembro 2017] *Adoçantes: Origem do Aspartame*. Disponível em: <http://debbys2008.blogspot.pt/2009/03/adocantes-origem-do-aspartame.html>

SUEZL, J.; KOREM, T.; ZILBERMAN – SCHAPIRAL, G.; SEGAL, E.; ELINAVL, E. (2015) – Non - caloric artificial sweeteners and the microbiome: findings and challenges. *Gut Microbes*. 6 (2), 149-155.

SWITHERS, S. E. (2015) – Artificial sweeteners are not the answer to childhood obesity. *Appetite*. 93, 85-90.

VIN, K.; CONNOLLY, A., MCCAFFREY, T.; MCKEVITT, A.; O'MAHONY, C.; PRIETO, M.; TENNANT, D.; HEARTY, A.; VOLATIER, J. L. (2013) – Estimation of the dietary intake of 13 priority additives in France, Italy, the UK and Ireland as part of the FACET project. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 30 (12), 2050–2080.

WALTERS, E. (2013) [Consultado 14 dezembro 2017] *Acesulfame potassium*. High Potency Sweeteners. In *The Sweetener Book*. 1ª ed. rev. Illinois. 2013. ISBN 978-0989109208. 48. Disponível em: <http://www.sweetenerbook.com/index.html>

WEIHRAUCH, M. R.; DIEHL, V. (2004) – Artificial sweeteners - do they bear a carcinogenic risk? *Annals of Oncology*. 15, 1460-1465.

WHITEHOUSE, C. R.; BOULLATA, J.; MCCAULEY, L. A. (2008) – The Potential Toxicity of Artificial Sweeteners. *Official Journal of the American Association of Occupational Health Nurses*. 56 (6), 251-259.

YANG, D. – J.; CHEN; B. (2009) – Simultaneous Determination of Nonnutritive Sweeteners in Foods by HPLC/ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 3022-3027.

YAZIO (2017). [Consultado 14 dezembro 2017] *Edulcorante aspartame*. Disponível em: <https://www.yazio.com/es/alimentos/edulcorante-aspartame.html>

YILMAZ, S.; UÇAR, A. (2014) – A review of the genotoxic and carcinogenic effects of aspartame: does it safe or not? *Cytotechnology*. 66, 875-881.

ZHU, Y.; GUO, Y.; YE, M.; JAMES, F. S. (2005) – Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1085 (1), 143-146.

ZYGLER, A.; WASIK, A.; KOT – WASIK, A.; NAMIESNIK, J. (2011) – Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 400, 2159-2172.

Anexos

Anexo I – Caracterização das amostras de bebidas analisadas

Nomenclatura	Amostras	Edulcorantes	Ingredientes	pH	Data de validade	Lote
REFRIGERANTES À BASE DE EXTRATOS DE CHÁS						
C₁	Auchan Ice tea Manga	ACE – K SAC ASP CYC	Água, acidificante (E330), regulador de acidez (E33 iii), edulcorantes (ciclato, acesulfame – K, aspartame e sacarina), aromas de chá e manga, conservantes (benzoato de sódio e sorbato de potássio) e corante (caramelo sulfítico de amónia). Contem aspartame (uma fonte de fenilalanina).	3,33	27/12/2018	621902
C₂	Continente equilíbrio Ice Tea limão	ACE – K ASP	Água, sumo de limão proveniente de concentrado (1%), acidificante (E330), extrato de chá (0,14%), aromas, reguladores de acidez (E33 iii) e edulcorantes (E950 e E951). Contém aspartame (uma fonte de fenilalanina).	3,60	08/01/2019	38311719 34
C₃	Dia Tisana limão e chá verde	ACE – K ASP	Água, açúcar, extrato de chá verde (0,16%), acidificante (ácido cítrico), sumo de limão proveniente de concentrado (0,5%), aroma natural de limão com outros aromas naturais, antioxidante (ácido ascórbico), conservante (sorbato de potássio), edulcorantes (acesulfame k e aspartame). Contém uma fonte de fenilalanina.	3,43	06/2018	A17817 0270002
C₄	Don Simon té frio Limão	CYC SAC NHDC	Água, acidificantes (E330 e E331), extrato de chá solúvel, edulcorantes (E952, E954 e E959) e aromas.	3,69	13/02/2019	K207DA 3313:29
C₅	Freetea Pêssego 0% açúcares	ACE – K SAC CYC	Água, acidificante (ácido cítrico), 0,2% de sumo de pêssego obtido a partir de um produto concentrado, 0,12 % extrato de chá, aromas, edulcorantes (ciclato de sódio, sacarina, acesulfame K), regulador de acidez (citratos de sódio).	3,51	11/04/2019	107704 0601XX
C₆	Pingo Doce Ice tea manga zero açúcares	ACE – K ASP	Água, sumo de manga à base de concentrado (0,2%), reguladores de acidez (ácido cítrico, citrato trissódico), extrato de chá (0,125%), edulcorantes (acesulfame k, aspártamo), aroma de manga. Contém uma fonte de fenilalanina.	4,08	24/11/2018	36328700 13
C₇	Pleno Chá verde e Limão	ACE – K ASP	Água, açúcar, sumo de limão (0,5%), extrato de chá verde (0,16%), regulador de acidez (ácido cítrico), aroma natural de limão e outros aromas naturais, conservantes (sorbato de potássio e dicarbonato de dimetilo) e edulcorantes (aspartame e acesulfame K). Contém uma fonte de fenilalanina.	3,40	16/05/2018	18051630 04

Anexo I – Caracterização das amostras de bebidas analisadas (cont.)

Nomenclatura	Amostras	Edulcorantes	Ingredientes	pH	Data de validade	Lote
REFRIGERANTES À BASE DE EXTRATOS DE CHÁS						
C₈	Pleno Chá verde e Limão Light	ACE – K SUC	Água, açúcar, sumo de limão (0,5%), extrato de chá verde (0,16%), regulador de acidez (ácido cítrico), aroma natural de limão e outros aromas naturais, conservantes (sorbato de potássio e dicarbonato de dimetilo) e edulcorantes (sucralose e acesulfame K).	3,46	10/07/2018	18071030 05
C₉	Pleno Cidreira, Tília, Camomila e Limão	ACE – K SUC	Água, açúcar, sumo de limão à base de concentrado (0,5%), extrato de ervas (0,25%), regulador de acidez (ácido cítrico), aroma natural de limão e lima e outros aromas naturais, conservantes (sorbato de potássio e dicarbonato de dimetilo), corante (caramelo sulfítico de amónia) e edulcorantes (sucralose e acesulfame K). Isento de glúten.	3,53	10/07/2018	18071030 10
C₁₀	Refresco de chá Limão Aliada	ACE – K ASP	Água mineral natural (99%), acidificante (ácido cítrico), extrato de chá (0,13%), corretor de acidez (citrato de sódio), antioxidante (ácido ascórbico), edulcorantes (acesulfame K e aspártamo) e aroma de limão. Contém aspártamo (uma fonte de fenilalanina).	3,60	18/11/2018	7327H144 5
BEBIDAS DESPORTIVAS						
D₁	Gatorade Cool Blue	ACE – K SUC	Água, açúcar, maltodextrina; acidificante ácido cítrico, sais minerais (cloreto de sódio, citrato de sódio); estabilizadores: E-414 E E-445, fosfato de potássio, óxido de magnésio, aroma; edulcorantes: sucralosa, acesulfame K; Corante: E-133.	3,58	28/09/2018	160503
D₂	Gatorade Limão	ACE – K SUC	Água, açúcar, maltodextrina; acidificante: ácido cítrico, sais minerais (cloreto de sódio, citrato de sódio); fosfato de potássio, antioxidante E-300; estabilizadores: E-414 E E-445, óxido de magnésio, aroma; edulcorantes: sucralosa, acesulfame K; Corante: betacaroteno.	3,52	03/08/2018	160505
D₃	Powerade Citrus Charge	ACE – K SUC	Água, açúcar, reguladores de acidez E-330 e E-331, estabilizadores E-414 e E-445, aromas, edulcorantes E-950 e E-955 e corante E-104.	3,87	20/07/2018	V3X11:29
D₄	Powerade Orange Burst	ACE – K SUC	Água, açúcar, reguladores de acidez E-330 e E-331, estabilizadores E-414 e E-445, antioxidante ácido ascórbico, aromas, edulcorantes E-950 e E-955 e corante E-160-a.	3,82	27/06/2018	V3723:07

Anexo I – Caracterização das amostras de bebidas analisadas (cont.)

Nomenclatura	Amostras	Edulcorantes	Ingredientes	pH	Data de validade	Lote
BEBIDAS ENERGÉTICAS						
E1	DIA Bebida energética light	ACE – K ASP	Água carbonatada, acidificante (E330), taurina (0,4%), regulador de acidez (E331), corante (E150b), edulcorantes (E950, E951), cafeína (0,032%), inositol, estabilizador (E415), vitaminas (B3, B5, B6, B2, B12) e aroma. Contém aspartamo (uma fonte de fenilalanina).	3,90	06/07/2019	28187708 37
E2	Red Bull Sugar Free	ACE – K ASP	Água, acidificante ácido cítrico, dióxido de carbono, taurina (0,4%), regulador de acidez (carbonatos de sódio, carbonato de magnésio), edulcorantes (acesulfame K, aspartame), cafeína (0,03%), vitaminas (niacina, ácido pantoténico, B6, B12), aromas, espessante goma xantana, corantes (caramelo simples, riboflavina). Contém uma fonte de fenilalanina.	3,71	13/09/2018	1583752
REFRIGERANTES À BASE DE ÁGUAS MINERAIS						
M1	Água Com Gas Pingo Doce Limão	ASP	Água da nascente arrieiro carbonatada, aroma natural de limão e lima-limão, regulador de acidez (E330), sumos de maçã e limão à base de concentrado (0,5%), antioxidante (E300), edulcorante (E951), conservantes (E211, E202). Contém uma fonte de fenilalanina.	3,40	08/2018	00418041 105
M2	Continente água gaseificada Limão	ASP	Água de nascente gaseificada, acidificante (ácido cítrico), sumo de maçã à base de concentrado, aroma natural de limão, regulador de acidez (citrato trissódico), edulcorante (aspartame) e conservante (benzoato de sódio). Pode conter vestígios de sulfetos. Contém uma fonte de fenilalanina.	3,68	06/2018	32617041 112
M3	Frize Limão	ASP	Água mineral natural frize (98,5%), sumo de maçã à base de concentrado, regulador de acidez (ácido cítrico), aroma de limão, edulcorante (aspartame), conservante (benzoato de sódio). Contém uma fonte de fenilalanina.	4,65	11/2018	370262
M4	Schweppes Tónica Zero calorias	ACE – K SAC CYC	Água, dióxido de carbono, acidificante (ácido cítrico), aromas naturais, edulcorante (E952, E950 e E954), aroma quinino.	2,88	30/09/2018	02:52 T5

Anexo I – Caracterização das amostras de bebidas analisadas (cont.)

Nomenclatura	Amostras	Edulcorantes	Ingredientes	pH	Data de validade	Lote
NÉCTARES						
N₁	Auchan Laranja light	ACE – K SUC	Sumo de laranja obtido a partir de um produto concentrado (50%), água, edulcorantes (sucralose e acesulfame K), acidificante (ácido cítrico) e antioxidante (ácido L-ascórbico).	3,84	21/02/2019	7325M2
N₂	Auchan Tropical light	ACE – K SUC	Sumo de frutos parcialmente proveniente de concentrado (50%) (uva, banana, laranja, ananás, manga, maçã, pera, goiaba e maracujá), água, acidificante (ácido cítrico), edulcorantes (sucralose e acesulfame K), e antioxidante (ácido L-ascórbico).	3,65	13/03/2019	7347A2
N₃	Auchan Parfum Agrumes 0% de açúcar	ACE – K ASP SUC	Água, sumo de frutos obtidos a partir de um produto concentrado 18% (toranja rosa (8%), laranja (5%), limão (5%)), dextrina, acidificante (ácido cítrico), aromas, edulcorantes (aspartame, acesulfame K, sucralose), espessante (goma xantana), conservantes (sorbato de potássio, benzoato de sódio). Contém uma fonte de fenilalanina.	2,78	05/2019	141328C0 2
N₄	Continente equilíbrio Laranja	ACE – K ASP	Sumo de laranja a partir de concentrado (50%), água, acidificante (E330), antioxidante (E300), edulcorante (E951, E950). Contém aspartame (uma fonte de fenilalanina).	3,85	11/2018	32417B
N₅	Continente equilíbrio Manga e Laranja	ACE – K ASP	Água, sumo de laranja a partir de concentrado (30%), puré de manga (15%), acidificante (E330), antioxidante (E300), edulcorante (E951, E950). Contém aspartame (uma fonte de fenilalanina).	3,84	07/2018	191178
N₆	Continente é Pêssego	ACE – K ASP	Polpa de pêssego (50%), água, acidificante (E330), edulcorantes (E950 e E951) e antioxidante (E300). Contém aspartame (uma fonte de fenilalanina).	3,66	11/2018	31017M

Anexo I – Caracterização das amostras de bebidas analisadas (cont.)

Nomenclatura	Amostras	Edulcorantes	Ingredientes	pH	Data de validade	Lote
NÉCTARES						
N₇	Dia Néctar laranja e manga light	ACE – K SUC	Água, puré de manga concentrado (21%), sumo de laranja proveniente de concentrado (17%), polpa de laranja (2%), acidificante (E330), antioxidante (E300), edulcorantes (E955, E950).	3,76	11/2018	32017
N₈	Dia Néctar Vital Frutos vermelhos light	ACE – K SUC	Água, sumos de frutos provenientes de concentrado (40%) (uva tinta, maçã, groselha, morango, romãs, framboesa e mirtilo-vermelho), acidificante (ácido cítrico) e edulcorantes (sucralose e acesulfame K).	3,41	13/12/2018	7347NI
N₉	Disfruta exótico Manga	ACE – K SUC	Água, sumo de manga a partir de concentrado (25%), acidificante (ácido cítrico), antioxidante (ácido L-ascórbico), edulcorante (sucralose e acesulfame K) e aroma.	3,82	08/02/2019	7312NI
REFRIGERANTES TRADICIONAIS						
R₁	Auchan Ananás com gás	ACE – K SAC ASP CYC	Água carbonatada, xarope de glucose e frutose, sumo de ananás proveniente de concentrado, acidificante (ácido cítrico), edulcorantes (ciclato, sacarina, acesulfame K e aspartame), aroma, conservante (sorbato de potássio), estabilizadores (goma arábica e ésteres de glicerol de colofónia), antioxidante (ácido ascórbico) e corante (betacaroteno). Contem uma fonte de fenilalanina.	3,01	21/12/2018	518772
R₂	Auchan Pêssego sem gás	ACE – K SAC ASP CYC	Água, acidificante (ácido cítrico), edulcorantes (ciclato, acesulfame K, aspartame e sacarina), aromas, conservantes (benzoato de sódio e sorbato de potássio), estabilizadores (goma arábica e ésteres de glicerol de colofónia) e corantes (betacaroteno e beta – apo – 8' - carotenal). Contem aspartame (uma fonte de fenilalanina).	3,07	11/07/2018	671433
R₃	Auchan Refrigerante com gás 0% açúcares Laranja	ACE – K Sal SAC – Na ASP CYC	Água carbonatada, sumo de laranja obtido a partir de um produto concentrado (8%), acidificante (E330), edulcorantes (ciclato de sódio, sal de sódio da sacarina, acesulfame K e aspartame), aromas, estabilizadores (E440, E410, E414 e E445), conservante (E202), antioxidante (E300) e corante (E160a). Contem uma fonte de fenilalanina.	3,38	15/12/2018	444027

Anexo I – Caracterização das amostras de bebidas analisadas (cont.)

Nomenclatura	Amostras	Edulcorantes	Ingredientes	pH	Data de validade	Lote
REFRIGERANTES TRADICIONAIS						
R₄	Auchan Refrigerante sem gás Laranja	ACE – K SUC	Água carbonatada, sumo de laranja obtido a partir de um produto concentrado (8%), xarope de glucose – frutose, acidificante (E330), estabilizadores (E440, E410, E414 e E445), aromas, conservante (E242, E202), antioxidante (E300), edulcorantes (acesulfame k e sucralose), e corantes (E160a, E160e).	3,23	15/12/2018	486091
R₅	Blimonada Limonada sem gás	ACE – K SUC	Água, sumo de limão à base de concentrado (10%), açúcar, polpa de citrinos (0,7%), aromas, antioxidante (ácido ascórbico) e edulcorantes (sucralose e acesulfame K).	3,76	08/2018	370410
R₆	Cola Aliada Light	ACE – K ASP CYC	Água carbonatada, corante (E150d), acidificante (E338, E330), edulcorantes (E952, E951, E950), cafeína, aromas naturais. Contém aspartame (uma fonte de fenilalanina).	3,10	19/03/2018	28078705 28
R₇	Cola Aliada Zero	ACE – K ASP CYC	Água carbonatada, corante (E150d), acidificante (E338), edulcorantes (E952, E951, E950), corretor de acidez (E331iii), cafeína, aroma natural. Contém aspartame (uma fonte de fenilalanina).	3,00	24/09/2018	28267700 44
R₈	Coca-cola Light	ACE – K ASP CYC	Água, dióxido de carbono, corantes (caramelo E150d), edulcorantes (E952, E950 e aspartame), acidificantes (E338 e E330) e aromas naturais (incluindo cafeína). Contém uma fonte de fenilalanina.	2,93	24/05/2018	240857
R₉	Coca-Cola Zero açúcares	ACE – K ASP CYC	Água, dióxido de carbono, corantes (caramelo E150d), edulcorantes (E952, E950 e aspartame), acidificantes (E338), aromas naturais (incluindo cafeína) e regulador de acidez (E331). Contém uma fonte de fenilalanina.	3,12	24/05/2018	241515
R₁₀	Cola eSky	ACE – K SAC ASP CYC	Água carbonatada, xarope de glicose-frutose, corante (E150d), acidificante (E338), edulcorantes (E952, E950, E951, E954), aromas (incluindo cafeína). Contém aspartame (uma fonte de fenilalanina).	2,94	21/12/2018	544103
R₁₁	Cola Dia light	ACE – K ASP	Água carbonatada, corante (E150d), acidificantes (E338, E330), edulcorantes (E952, E951, E950), conservante (E202) e aromas (incluindo cafeína). Contém uma fonte de fenilalanina.	3,14	29/08/2018	299421

Anexo I – Caracterização das amostras de bebidas analisadas (cont.)

Nomenclatura	Amostras	Edulcorantes	Ingredientes	pH	Data de validade	Lote
REFRIGERANTES TRADICIONAIS						
R12	Cola Freeway 0%	ACE – K ASP CYC	Água gaseificada, corante (caramelo sulfítico de amónia), edulcorantes (ciclamate de sódio, acesulfame K, aspartame), acidificante (ácido fosfórico), regulador de acidez (citrato trissódico), aroma (cafeína), aroma natural. Contém uma fonte de fenilalanina.	2,95	11/12/2018	119519 3112XX
R13	Continente Zero cola	ACE – K ASP	Água carbonatada, corante (E150d), acidificantes (E338), regulador de acidez (E331iii), edulcorantes (E951, E950 e E952), aroma (cafeína) e aroma natural). Contém aspartame (uma fonte de fenilalanina).	3,10	31/08/2018	35243714 48
R14	Continente Tropical e Cenoura Sem gás	ACE – K SUC	Água, sumo a partir de concentrado (17%) (laranja: 11,8%, cenoura: 3,1%, ananás: 1,3% e maracujá: 0,8%), xarope de glucose e frutose, acidificante (E330), vitaminas (provitamina A (betacaroteno), C, E), antioxidante (E300), estabilizadores (E440, E410), aromas, conservantes (E242, E202) e edulcorantes (E950 e E955).	3,60	14/12/2018	422603
R15	Dia Laranja sem gás	ACE – K SUC	Água mineral, sumo de laranja proveniente de concentrado (10%), açúcar, xarope de glucose e frutose, acidificante (E330), estabilizadores (E440, E410), antioxidante (E300), corante (E160a), edulcorantes (E950, E955) e aromas.	3,33	26/11/2018	7335H002 4
R16	Fanta zero açúcares Laranja	ACE – K ASP SUC	Água, sumo de laranja proveniente de concentrado (7%), dióxido de carbono, acidificantes (E330 e E296), edulcorantes (E950, aspartame e E955), regulador de acidez (E331), conservante (E202), aromas naturais de laranja e outros aromas naturais, antioxidante (E300), estabilizador (E412) e corante (betacaroteno). Contém uma fonte de fenilalanina.	3,50	29/06/2018	590735
R17	Fruitis sem gás Maça verde	ACE – K ASP	Água, xarope de glucose-frutose, sumo de maçã à base de concentrado (16%), açúcar, regulador de acidez (ácido málico e citrato de sódio), aroma, conservantes (E211, E202), antioxidante (ácido ascórbico), corante (E150d), edulcorantes (aspartame e acesulfame K). Contém uma fonte de fenilalanina.	3,71	06/2018	9525072
R18	Gasosa Contínente é zero açúcares	ACE – K ASP SAC CYC	Água, dióxido de carbono, acidificante (E330), edulcorantes (E952, E950, E951, E954), aroma. Contém aspartame (uma fonte de fenilalanina).	3,25	13/12/2018	655769

Anexo I – Caracterização das amostras de bebidas analisadas (cont.)

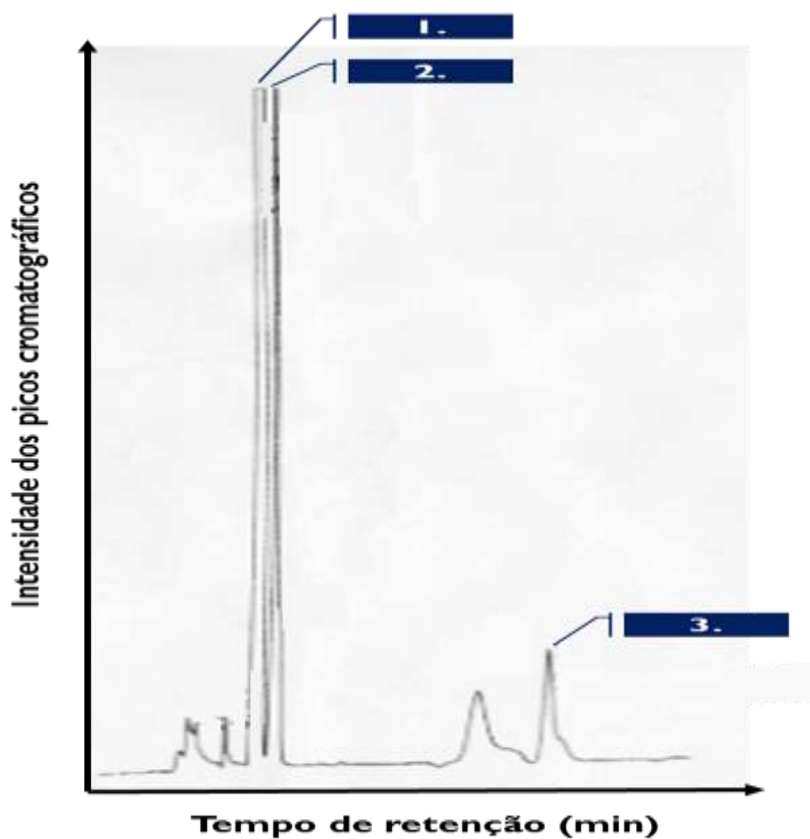
Nomenclatura	Amostras	Edulcorantes	Ingredientes	pH	Data de validade	Lote
REFRIGERANTES TRADICIONAIS						
R₁₉	Gasosa Aliada zero açúcares	ASP SAC CYC	Água carbonatada, acidificante (E330), edulcorantes (E952, E954, E951), aroma natural de limão com outros aromas naturais. Contém aspartame, uma fonte de fenilalanina.	3,35	27/11/2018	22331718 51
R₂₀	Gasosa Freeway sem açúcares	SAC CYC	Água com gás carbónico, acidificante (ácido cítrico), edulcorantes (ciclamate de sódio, sacarina), aromas.	3,22	25/11/2018	219509 0811XX
R₂₁	Pepsi MAX Zero açúcar	ACE – K ASP	Água gaseificada, corante (E150d), reguladores de acidez (ácido fosfórico, citrato de sódio e ácido cítrico), edulcorantes (aspartame e acesulfame K), aromas (caféina, extratos e aromas naturais). Contém uma fonte de fenilalanina.	3,24	12/06/2018	61618BL7 3461
R₂₂	Pingo doce Laranja com gás	SAC	Água carbogaseificada, xarope de glucose-frutose, açúcar, sumo de laranja à base de concentrado (8%), essências de laranja, regulador de acidez (ácido cítrico), antioxidante (ácido ascórbico), edulcorante (sacarina), estabilizador (goma arábica), corante (beta-caroteno).	3,27	12/2018	33817021 212
R₂₃	Refrigerante continente é Laranja com gás	ACE – K ASP SAC CYC	Água, dióxido de carbono, xarope de glicose-frutose, sumo de laranja proveniente de concentrado (0,45%), acidificantes (E330), edulcorantes (E952, E954, E950 e E951), estabilizadores (E414, E445), conservantes (E202), aromas, antioxidantes (E300) e corantes (E160a e E160e). Contém aspartame (uma fonte de fenilalanina).	3,08	18/12/2018	508440
R₂₄	Santal Active Drink Frutos Tropicais e Cenoura	ACE – K SUC	Água, sumos de frutos e vegetais provenientes de concentrados (15%) (limão, laranja (2,5%), cenoura (2,5%) ananás (1,5%), maçã, polpa de manga (1,5%), maracujá (0,5%)), frutose, açúcar, regulador de acidez (ácido cítrico), conservantes (sorbato de potássio), aroma, vitaminas (C e E, e provitamina A), edulcorantes (acesulfame k e sucralose).	3,46	22/07/2018	18072230 03

Anexo I – Caracterização das amostras de bebidas analisadas (cont.)

Nomenclatura	Amostras	Edulcorantes	Ingredientes	pH	Data de validade	Lote
REFRIGERANTES TRADICIONAIS						
R₂₅	Seven up free Zero açúcares	ACE – K ASP	Água, dióxido de carbono, reguladores de acidez (ácido cítrico, ácido málico e citrato de sódio), aromas naturais de lima e limão, edulcorantes (aspartame e acesulfame K), conservantes (E221). Contém uma fonte de fenilalanina.	3,63	10/05/2018	12718AL7 3141
R₂₆	Sprite Baixo em calorias	ACE – K ASP NHDC	Água, açúcar e/ou xarope de glicose-frutose, dióxido de carbono, reguladores de acidez (E330 e E331) edulcorantes (E950, aspartame, e E959) e aromas naturais de lima e limão. Contém uma fonte de fenilalanina.	3,11	06/06/2018	2G03:00
R₂₇	Sucol Laranja, limão e cenoura Sem gás	ACE – K SAC ASP SUC	Água, açúcar, sumos de laranja (5,8%), limão (3,2%), e cenoura (3%), provenientes de concentrado (teor mínimo de sumo: 12%), regulador de acidez (ácido cítrico), aromas, vitaminas E e pró-vitamina A, estabilizador (E440 e E140), antioxidante (ácido ascórbico), conservantes (sorbato de potássio e benzoato de sódio), edulcorantes (aspartame, acesulfame K, ciclamato de sódio e sacarina). Contém aspartame (uma fonte de fenilalanina).	3,31	16/01/2019	19011630 03

Anexo II – Condições cromatográficas utilizadas na detecção e quantificação dos edulcorantes em estudo

Parâmetros	Condições
Modo de separação	Fase reversa
Fase móvel	KH ₂ PO ₄ 0.05 M / ACN (85:15)
Fluxo	0,700 mL/min
Pressão	2,11 KPsi
Volume de injeção	5 – 20 µL
Comprimento de onda	254 nm
Temperatura das amostras	T _{Ambiente}
Tempo de corrida	20 – 25 min

Anexo III – Cromatograma de uma solução padrão de acesulfame – K (100 mg/L), sacarina (80 mg/L) e aspártamo (200mg/L).

(1). Acesulfame – K, $t_R = 6,16$ min.

(2). Sacarina, $t_R = 6,91$ min.

(3). Aspártamo, $t_R = 17,46$ min.

Anexo IV – Concentrações (mg/L) do acessulfame – K, da sacarina e do aspártamo nas amostras analisadas (valores acima da DMU encontram-se a vermelho).

CATEGORIA	AMOSTRA	ACE – K (mg/L)	SAC (mg/L)	ASP (mg/L)
REFRIGERANTES À BASE DE EXTRATOS DE CHÁS	C ₁	67,40	80,50	< LOD (17,64)
	C ₂	61,18	16,88	96,35
	C ₃	54,30	-	65,60
	C ₄	-	101,76	-
	C ₅	51,20	82,69	-
	C ₆	51,55	7,03	126,10
	C ₇	34,66	11,46	< LOD (11,16)
	C ₈	47,04	-	-
	C ₉	75,28	-	-
	C ₁₀	120,31	9,85	98,44
BEBIDAS DESPORTIVAS	D ₁	12	-	-
	D ₂	11,7	-	-
	D ₃	25,74	-	-
	D ₄	38,12	-	-
BEBIDAS ENERGÉTICAS	E ₁	225,18	-	277,88
	E ₂	180	-	679,8
REFRIGERANTES À BASE DE ÁGUAS MINERAIS	M ₁	-	-	84,93
	M ₂	-	-	149,4
	M ₃	-	-	153,66
	M ₄	114,6	61,04	-
NÉCTARES	N ₁	189,14	-	-
	N ₂	197,07	-	-
	N ₃	641,48	-	314,6
	N ₄	46,68	13,42	< LOD (53,25)
	N ₅	139,49	-	66,19
	N ₆	71,68	-	< LOD (30,73)
	N ₇	83,09	-	-
	N ₈	73,80	93,68	-
	N ₉	34,86	-	-
REFRIGERANTES	R ₁	59,232	63,22	< LOD (16,94)
	R ₂	79,21	72,16	< LOD (13,10)
	R ₃	< LOD (3,87)	85,40	124,69
	R ₄	134,04	-	-
	R ₅	42,41	-	-
	R ₆	79,98	-	< LOD (54,21)
	R ₇	141,73	-	< LOD (55,39)
	R ₈	129	-	71,32
	R ₉	128,98	-	89,38
	R ₁₀	126,22	< LOD (5,88)	< LOD (58,60)
	R ₁₁	74,40	-	< LOD (27,14)
	R ₁₂	109,28	-	101
	R ₁₃	137,98	-	< LOD (49,79)
	R ₁₄	97,21	-	-
	R ₁₅	24,64	-	-
	R ₁₆	152,61	-	82,71
	R ₁₇	50,85	-	< LOD (27,47)
	R ₁₈	32,51	72,71	< LOD (32,57)
	R ₁₉	-	72,05	134,58
	R ₂₀	-	66,88	-
	R ₂₁	33,26	-	419,17
	R ₂₂	-	36,43	-
	R ₂₃	52,38	68,43	< LOD (19,46)
	R ₂₄	101,26	-	-
	R ₂₅	79,88	-	249,05
	R ₂₆	124,97	-	89,12
	R ₂₇	51,02	29,51	< LOD (40,76)