

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

ERIVERTON LUIZ GONÇALVES

**ENSAIO DE PROFICIÊNCIA ANALÍTICA: PRECISÃO
INTERMEDIÁRIA EM EDULCORANTES**

BAURU
2010

ERIVERTON LUIZ GONÇALVES

**ENSAIO DE PROFICIÊNCIA ANALÍTICA: PRECISÃO
INTERMEDIÁRIA EM EDULCORANTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Química, sob a orientação da Prof^a. Dra. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato.

BAURU
2010

G635e

Gonçalves, Eriverton Luiz

Ensaio de proficiência analítica : precisão intermediária em edulcorantes / Eriverton Luiz Gonçalves -- 2010.
43 f.

Orientador: Profa. Dra. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Química) – Universidade Sagrado Coração - Bauru - SP.

1. Ensaio de proficiência. 2. Precisão intermediária. 3. Edulcorantes. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Simionato, Eliane Maria Ravasi Stéfano. II. Título.

ERIVERTON LUIZ GONÇALVES

**ENSAIO DE PROFICIÊNCIA ANALÍTICA: PRECISÃO
INTERMEDIÁRIA EM EDULCORANTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Química, sob a orientação do Prof^ª. Dra. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato.

Banca Examinadora:

Prof^ª. Ms. Márcia Aparecida Zeferino Garcia (Titular)

Prof. Ms. Dorival Roberto Rodrigues (Titular)

Prof^ª. Dr^ª. Setsuko Sato (Suplente)

Bauru, 25 de junho de 2010.

Dedico este trabalho,

aos meus pais pelo apoio e incentivo

á minha noiva que sempre esteve junto comigo

e a Deus que me abençoou nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por mais esta benção em minha vida e por todas as oportunidades e conquistas que me foram concedidas ao longo desta jornada.

Agradeço a minha mãe e ao meu pai pelo apoio e incentivo ao longo desses anos, por tudo que fizeram por mim, pelos sacrifícios para que eu conseguisse mais essa vitória.

A minha orientadora Prof^a Dra Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato pelo auxílio, presença e amizade durante a realização deste trabalho.

Agradeço a minha noiva Camila que me incentivou desde o momento da matrícula até a realização deste trabalho, pelo amor e carinho, pela compreensão nos momentos de ausência e que sem ela nada disso teria se concretizado.

A todos os meus professores, desde ao meu primeiro ano de escola até o término da faculdade, que me ensinaram muitas coisas das quais muitas me lembrarei para sempre.

Aos meus colegas de trabalho que me ajudaram na realização deste trabalho, principalmente aos analistas que me ajudaram na realização das análises.

Gostaria também de agradecer a todos que de maneira direta ou indireta me ajudaram na realização deste trabalho, que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

RESUMO

Em ensaios analíticos é importante obter medidas seguras e exatas que sejam aceitas pelas autoridades nacionais e internacionais. Dentre as substâncias que realçam o sabor dos alimentos destacam-se os edulcorantes, substâncias químicas que não são carboidratos, mas que conferem o sabor doce aos nutrientes, como o acessulfame-K e o aspartame. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um ensaio de proficiência analítica com testes de repetibilidade (precisão intermediária) para a metodologia de determinação de Acessulfame K e Aspartame, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em balas sem açúcar, visando à confiabilidade dos resultados analíticos realizados por três analistas diferentes. Todos os analistas apresentam individualmente boa repetibilidade, a qual pode ser avaliada pelo baixo coeficiente de variação observado e posteriormente analisado através da razão de Horrat (< 2.0). Quando comparadas as médias obtidas para uma mesma amostra para os três analistas foi observado que em quase todas as amostras, exceto para a amostra 5, existe diferença significativa entre os valores médios de cada analista, pois o F calculado foi maior que o F tabelado em um nível de 99 % de confiança entre os três analistas, quando avaliados pela técnica estatística de análise de variância (ANOVA). Foi feita a mesma avaliação agora com soluções padrões dos edulcorantes a qual mostrou que os analistas apresentam boa repetibilidade e média compatíveis entre si, o que indica que o problema se encontra no método de dosagem industrial dos edulcorantes (dosagem mecânica), a qual mostra grande variabilidade de dosagem em uma mesma amostra composta por 500 gramas.

Palavras-chave: Ensaio de Proficiência. Precisão Intermediária. Edulcorantes. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

ABSTRACT

In analytical tests is important to obtain reliable and accurate measurements that are accepted by national and international authorities. Among the substances that enhance the flavor of food stand out sweeteners - chemicals that are not carbohydrates, but they bring the sweet taste to nutrients such as acesulfame-K and aspartame. The aim of this study was to develop an analytical proficiency testing with tests of repeatability (intermediate precision) for the methodology of the determination of Acesulfame K and Aspartame, by High Performance Liquid Chromatography in sugar-free candies, seeking the reliability of analytical results achieved by three different analysts. All analysts have individually good repeatability, which can be evaluated by a low coefficient of variation observed and subsequently analyzed by Horrat ratio (<2.0). Comparing the averages for the same sample for the three analysts was noted that in almost all samples except for sample 5, significant difference between the average values of each analyst, because the F calculated was higher than the F tabulated in a 99% level of confidence among the three analysts, when evaluated by the statistical technique of variance analysis (ANOVA). Following the same procedure with standard solutions of the sweeteners we conclude that the analytical results through the intermediate precision showed that analysts have good repeatability but the data obtained with standard samples sweeteners when compared with the samples from the industrial production indicate that the problem lies in the method of sweeteners industrial dosage (mechanical strength), which shows great variability in the same dosage sample of 500 grams.

Keywords: Proficiency Testing. Intermediate Precision. Sweeteners. High Performance Liquid Chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma da dosagem de aspartame no processo de fabricação de balas.....	24
Figura 2	Fluxograma da dosagem de acessulfame no processo de fabricação de balas.....	25
Figura 3	Exemplo de Cromatograma.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Cálculo de Horwitz em razão da concentração do analito.....	16
Tabela 2	Limites Máximos de Aditivos Edulcorantes em Alimentos.....	18
Tabela 3	Limites Máximos de Aditivos Edulcorantes em Alimentos.....	19
Tabela 4	Especificações, valores teóricos e legislações para Acessulfame e Aspartame.....	23
Tabela 5	Resultados de Linearidade da Validação da Empresa.....	27
Tabela 6	Resultados de Exatidão da Validação da Empresa.....	28
Tabela 7	Resultados de Linearidade da Validação da Universidade.....	28
Tabela 8	Resultados de Exatidão da Validação da Universidade.....	28

Tabela 9	Resultados da Precisão Intermediária através dos resultados da Média, Desvio Padrão, Coeficiente de Variação e Horrat para os valores obtidos de Acessulfame nas amostras.....	29
Tabela 10	Resultados da Precisão Intermediária através dos resultados da Média, Desvio Padrão, Coeficiente de Variação e Horrat para os valores obtidos de Aspartame nas amostras.....	30
Tabela 11	Resultados da Precisão Intermediária de acordo com a ANOVA nas amostras.....	31
Tabela 12	Resultados da Precisão Intermediária através dos resultados da Média, Desvio Padrão, Coeficiente de Variação e Horrat para os valores obtidos de Aspartame e Acessulfame nos padrões.....	31
Tabela 13	Resultados da Precisão Intermediária de acordo com a ANOVA no padrão.....	32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BIPM	Bureau International des Poids et Mesures
BPL	Boas Práticas de Laboratório
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CODEX	Programa Conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação
CV	Coefficiente de Variação
DPR	Desvio Padrão Relativo
EP	Ensaio de Proficiência
FDA	Food and Drug Administration
GQ	Garantia de Qualidade
ICH	International Conference on Harmonization
IDA	Índice Diário Aceitável
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
ISO	International Organization for Standardization
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives
NBR	Norma Brasileira Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1	ENSAIO DE PROFICIÊNCIA.....	13
2.2	VALIDAÇÃO.....	13
2.3	REPETIBILIDADE.....	14
2.4	REPRODUTIBILIDADE.....	15
2.5	PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	16
2.6	O ANALISTA.....	17
2.7	EDULCORANTES.....	17
2.7.1	Acessulfame K.....	19
2.7.2	Aspartame	20
2.8	CROMATOGRAFIA	20
2.8.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	21
3	MATERIAL E MÉTODO	23
3.1	MATERIAL	23
3.2	REAGENTES	25
3.3	EQUIPAMENTOS	26
3.4	SOLUÇÕES	26
3.4.1	Solução de Buffer (0,05 M)	26
3.4.2	Solução de estoque de trabalho	26
3.4.3	Solução de estoque de padrão interno	26
3.4.4	Solução fase móvel 9:1	26
3.4.5	Solução padrão de calibração	26
3.4.5.1	<i>Solução (1) contendo 2,50 mg de Acessulfame K e Aspartame e 5,00 mg de Cafeína.....</i>	26
3.4.5.2	<i>Solução (2) contendo 10,00 mg de Acessulfame K e Aspartame e 5,00 mg de Cafeína.....</i>	26
3.5	MÉTODO	27
3.5.1	Metodologia analítica	27
3.5.2	Validação	27
3.5.3	Amostragem e Ensaio de Proficiência.....	28

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	34
	REFERÊNCIAS.....	35
	APÊNDICE A – Amostra 1.....	38
	APÊNDICE B – Amostra 2.....	39
	APÊNDICE C – Amostra 3.....	40
	APÊNDICE D – Amostra 4.....	41
	APÊNDICE E – Amostra 5.....	42
	APÊNDICE F – Padrão.....	43

1 INTRODUÇÃO

O propósito dos ensaios de proficiência é, primeiramente, a avaliação e melhoria contínua do desempenho do laboratório e de analistas, e não a validação de métodos.

Medidas erradas ou inexatas podem conduzir a decisões erradas que podem ter conseqüências como desperdício de recursos materiais, financeiros e mesmo, de vidas. As conseqüências humanas e econômicas de decisões erradas baseadas em medições inexatas podem ser incalculáveis. Então, é importante ter medidas seguras e exatas que sejam aceitas pelas autoridades nacionais e internacionais (BIPM, 2004).

O valor das medições químicas depende do nível de confiança que pode ser estabelecido nos resultados. De maneira crescente, a comunidade de analistas químicos está adotando princípios de GQ (Garantia de Qualidade) que, embora não garantindo realmente a qualidade dos dados produzidos, eleva a possibilidade deles serem bem fundamentados e se adequarem ao fim pretendido (ANVISA, 2005)

As técnicas de separação, tais como cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos. (RIBANI et al. 2004).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um ensaio de proficiência analítica com testes de repetibilidade (precisão intermediária) para a metodologia de determinação de Acessulfame K e Aspartame, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em balas sem açúcar, visando à confiabilidade dos resultados analíticos realizados pelos analistas.

Este trabalho também é uma continuação de um Projeto de Estágio que complementou um dos Requisitos do Standard da Empresa sobre Boas Práticas de Laboratório.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 ENSAIO DE PROFICIÊNCIA

Ensaio de proficiência (EP) é o uso de comparações interlaboratoriais com o propósito de determinar o desempenho do laboratório para ensaios ou medições e, ainda, monitorar seu desempenho contínuo. A participação dos laboratórios em atividades de EP é uma forma de avaliar e demonstrar a confiabilidade dos dados que estão sendo gerados. Isso significa dizer que por meio dos EP pode-se avaliar a habilidade do laboratório de realizar ensaios ou medições de forma competente (ABNT, 1998).

Os ensaios de proficiência são considerados ferramentas de controle de qualidade externo (EURACHEM, 1998). Nestes ensaios, cujos procedimentos também são harmonizados entre AOAC International, ISO e IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006; ISO, 1997), os laboratórios participantes analisam o material distribuído pelo organizador, utilizando o procedimento analítico adotado em suas rotinas de trabalho (SOUZA, 2007).

2.2 VALIDAÇÃO

Validação do método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (NBR ISO/IEC 17025, 2001).

A validação inclui a especificação dos requisitos do método; determinação das características do método; verificação de que os requisitos podem ser atendidos com o uso do método e uma declaração sobre a validade do método (NBR ISO/IEC 17025, 2001).

É responsabilidade do analista/laboratório verificar se as características de desempenho prescritas no método normalizado podem ser obtidas (EURACHEM, 1998).

A validação de métodos analíticos desenvolvidos no laboratório é efetuada após seleção, desenvolvimento, e otimização dos métodos (SWARTZ; KRULL, 1997).

Os atributos normalmente recomendados nos programas de validação de metodologia analítica são: exatidão (acuracidade), precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, consistência, robustez e teste de conformidade do sistema, além da seletividade e a sensibilidade do método (EMANUELLI; SCANDIUZZI, 2000).

Segundo Ribani (2004) existem dois tipos de validação:

O primeiro, chamado de validação no laboratório (“in house validation”), consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar que um método adotado de outras fontes está bem aplicado. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade. Pode-se considerar esta etapa como sendo preliminar à validação completa (“full validation”).

O segundo tipo, validação completa, envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação. Protocolos internacionalmente aceitos têm sido estabelecidos para a validação completa, mais precisamente o Protocolo Harmonizado Internacional e o procedimento ISO (“International Standard Organization”).

2.3 REPETIBILIDADE

Repetitividade (Repê) é a máxima diferença aceitável entre duas repetições, vale dizer, dois resultados independentes do mesmo ensaio e no mesmo laboratório, sob as mesmas condições. A repetitividade pode ser conceituada, também, para uma amostra, quando esta é analisada pelos mesmos instrumentos, de forma repetível (LEITE, 2008)

O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia, sendo utilizado pelo INMETRO. Por outro lado, a ANVISA utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade.

A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intra-ensaio ou intra-corrída e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (ANVISA, 2003).

Para a repetitividade, o INMETRO recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão (INMETRO, 2003).

A ICH e ANVISA sugerem que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três

repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado (ICH, 1995; ANVISA, 2003)

Na literatura, consideram-se os valores iguais ou menores que 5%, para coeficiente de variação (CV) ou DPR (desvio-padrão relativo), como bons valores de reprodutibilidade. Outra forma é obter o CV das médias da precisão, ou, ainda, a média dos CVs. (LEITE, 2008).

2.4 REPRODUTIBILIDADE

Reprodutividade (Reprô) é a máxima diferença aceitável entre dois resultados, cada um obtido em laboratório distinto, para um mesmo processo e condições específicas (ligado a ensaios interlaboratoriais). A reprodutibilidade pode ser conceituada, também, para uma amostra, quando esta é analisada por instrumentos diferentes, obtendo-se desvio aceitável e comparável (LEITE, 2008).

É muito comum encontrar desacordo entre métodos analíticos. Isto aparece quando vários laboratórios analisam uma amostra em comum, em estudos colaborativos. Frequentemente, altas variações são observadas entre os resultados. Assim, os dados provenientes de apenas um laboratório não são suficientes para avaliar a reprodutibilidade do método. Estudos colaborativos não são somente indispensáveis para avaliação da reprodutibilidade, eles também podem ser de grande ajuda para testar a exatidão do método (VIAL ; JARDY, 2001).

A IUPAC não aconselha tirar conclusões com menos de cinco laboratórios e recomenda oito laboratórios em seu guia atual. Além disso, mais crítico que o número de laboratórios envolvidos é que estes possuam competência e habilidades similares àqueles que usarão o método em rotina (RIBANI, 2004).

A documentação que apóia os estudos de precisão em nível de reprodutibilidade deve incluir estimativa do desvio padrão absoluto, estimativa do desvio padrão relativo e intervalo de confiança, foi estabelecida por Horwitz uma relação matemática para expressar a dependência entre valores do desvio padrão relativo e concentração da substância (Tabela 1), pelo exame de resultados cumulativos de estudos colaborativos envolvendo grande faixa de compostos de interesse, matrizes e técnicas analíticas. Os valores obtidos por esta relação matemática são introduzidos em um gráfico e originam a denominada Trombeta de Horwitz (HORWITZ et al. 1980).

Tabela 1 – Cálculo de Horwitz em razão da concentração do analito.

Razão de Concentração	PDPR_R
1 (100%)	2
10^{-1}	2,8
10^{-2} (1%)	4
10^{-3}	5,6
10^{-4}	8
10^{-5}	11
10^{-6} (ppm)	16
10^{-7}	23
10^{-8}	32
10^{-9} (ppb)	45

Fonte – INMETRO, 2003.

2.5 PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores (ICH, 1995).

A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI et al. 2004).

O número de ensaios necessários para se avaliar a precisão intermediária segue a mesma recomendação da ICH e ANVISA para o cálculo de repetitividade descrita acima (mínimo de nove determinações). A precisão intermediária pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) (ICH, 1995; ANVISA, 2003).

A precisão é determinada a partir de repetições/replicações de determinações realizadas em um único laboratório não simultaneamente, ou seja, em diferentes dias, com diferentes curvas de calibração, com instrumentos diferentes, por analistas diferentes, enfim em condições diferentes, está é chamada precisão intermediária. Ela se situa no interior e entre laboratórios de precisão, dependendo das condições que são variadas. Se a análise for conduzida por diferentes analistas, em diferentes dias, em diferentes equipamentos, faça 5

replicas da análise para a mesma amostra sobre estas diferentes condições, para cada nível de concentração do analito por ordem de magnitude. (AOAC, 2002).

2.6 O ANALISTA

Em análise química, a figura do analista é a mais importante para um resultado confiável. Em tempos recentes, a formação do químico, quer como técnico, prático, ou ainda, em nível superior, se iniciava pelos princípios da reação ou da operação, o que fornecia a chamada base para a continuidade de análises mais complexas (LEITE, 2008).

A evolução instrumental está sendo rápida, e, no Brasil, a geração formada tanto em nível técnico como na graduação universitária tem acompanhado a operação instrumental, mas perdendo no conhecimento da visão sistêmica analítica. Antes, o analista recebia formação com o máximo de ferramentas para resolver a análise. Hoje, a evolução dos equipamentos é mais rápida que a formação dos analistas.

Leite (2008) explica que o perfil do analista depende do trabalho que ele executará, e envolve não só o lado profissional, mas também o pessoal. As empresas, de maneira em geral, buscam o analista ideal: um misto de gênio técnico da teoria à bancada, que possa buscar sempre a “ruptura” que levará a resultados significativos.

No dia-dia, para resolver a situação do laboratório e obter a confiabilidade dos resultados, o analista deve ter alguns requisitos, como assiduidade, seriedade, honestidade ao relatar, principalmente os insucessos, e, o mais importante, deve saber trabalhar em equipe, a fazer parte do time (LEITE, 2008).

2.7 EDULCORANTES

Os adoçantes dietéticos artificiais são produtos constituídos a partir de edulcorantes, substâncias responsáveis pelo sabor doce. Possuem o poder de adoçamento muitas vezes maior que o do açúcar branco convencional e são recomendados para dietas especiais, de emagrecimento ou de restrição (ANVISA, 1997).

A legislação brasileira sobre aditivos alimentares é positiva, e como tal estabelece que um aditivo somente pode ser utilizado pela indústria alimentícia quando estiver explicitamente definido em legislação específica, com as respectivas funções, limites

máximos e categorias de alimentos permitidas. O que não constar da legislação, não tem permissão para ser utilizado em alimentos (ANVISA, 2006).

Dentre as substâncias que realçam o sabor dos alimentos destacam-se os edulcorantes – substâncias químicas que não são carboidratos, mas que conferem o sabor doce aos nutrientes, tais como, o ciclamato, a sacarina, o acesulfame-K, a sucralose e o aspartame (ANVISA, 1997).

Segundo o Codex (Órgão Internacional de Normalização de Alimentos) o principal objetivo de estabelecer níveis máximos de utilização dos aditivos alimentares em vários grupos de alimentos é assegurar que a ingestão de um aditivo em todas as suas utilizações não exceda o seu Índice Diário Aceitável (IDA). (CODEX, 2008).

Há diferenças entre a legislação brasileira (ANVISA) e a legislação internacional (CODEX) quanto aos limites máximos aceitáveis na dosagem de aditivos edulcorantes em alimentos, conforme mostram as tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Limites Máximos de Aditivos Edulcorantes em Alimentos.

INS	Aditivo Função/Nome	ALIMENTO	Limite máximo mg / Kg
950	EDULCORANTE ARTIFICIAL Acesulfame de potássio	Alimentos e bebidas para controle de peso	350
		Alimentos e bebidas para dietas com ingestão controlada de açúcares	350
		Alimentos e bebidas para dietas com restrição de açúcares	350
		Alimentos e bebidas com informação nutricional complementar	350
		Alimentos e bebidas com reduzido teor de açúcares	260
		Goma de mascar	2000
		951	Aspartame
Alimentos e bebidas para dietas com ingestão controlada de açúcares	750		
Alimentos e bebidas para dietas com restrição de açúcares	750		
Alimentos e bebidas com informação nutricional complementar	750		
Alimentos e bebidas com reduzido teor de açúcares	560		
Goma de mascar	4000		

Fonte: Adaptado ANVISA, 2001.

Tabela 3 – Limites Máximos de Aditivos Edulcorantes em Alimentos.

Nº Codex Alimento	Alimento	Função	INS	Categoria	Limite Máximo	Aprovado em:
05.2.1	Acessulfame de Potássio	Edulcorante, Intensificador de Sabor	950	Bala Dura	500 mg/kg	2007
05.2.1	Aspartame	Edulcorante, Intensificador de Sabor	951	Bala Dura	3000 Mg/kg	2008

Fonte: Adaptado CODEX, c2010.

2.7.1 Acessulfame K

Este adoçante foi descoberto acidentalmente na Alemanha por Clauss e Jensen, em 1967. É um sal de potássio sintético derivado do ácido acético, isento de calorias, que adoça 200 vezes mais do que o açúcar e que pode ser levado ao fogo sem perder a doçura. De sabor agradável, no começo da degustação é intensamente doce, sensação que desaparece depressa, mas sem deixar resíduo ruim na boca. A substância não é metabolizada, sendo excretada integralmente pela urina (TORLONI et al. 2007).

Em 1984, estudos mostraram que o sal de potássio do edulcorante acessulfame, não é metabolizado e nem tem valor calórico significativo. Investigações fármaco-cinéticas em diversos animais e também em humanos mostraram rápida e completa excreção do acessulfame-K (LIPINSKI, 1985).

O aditivo acessulfame K foi avaliado toxicologicamente pelo JECFA em 1990, recebendo a IDA numérica de 15 mg/Kg de peso corpóreo. (ANVISA,1999).

Foi aprovado pelo FDA em 1998 e, atualmente, é encontrado em milhares de produtos alimentares. O acessulfame-K é usado em centenas de produtos industrializados, desde alimentos e bebidas até produtos de higiene oral e medicamentos em mais de 90 países, incluindo os Estados Unidos. Nesse país, o acessulfame-K foi liberado para uso geral em dezembro de 2003, e é encontrado em produtos como chicletes, sucos, gelatinas e pudins, numerosos produtos assados e laticínios, além de xaropes e pastilhas para a garganta (TORLONI et al. 2007).

2.7.2 Aspartame

O aspartame, um dos adoçantes mais popularmente conhecidos, foi descoberto acidentalmente em dezembro de 1965, pelo químico James Schlatter, pesquisador vinculado à companhia *G. D. Searle & Co*, por ocasião da síntese de um tetrapeptídeo destinado ao tratamento de úlcera gástrica, a ser utilizado em um teste bioquímico. Foi introduzido nos EUA em 1983, como adoçante artificial, pela indústria de alimentos *Nutrasweet*. (HSIEN; CHEN, 2007 apud ARAUJO et al. 2008, p. 224)

O aspartame é um aditivo alimentar com as funções de edulcorante – “substância diferente dos açúcares que confere sabor doce ao alimento”, e de realçador de sabor – “substância que ressalta ou realça o sabor/aroma de um alimento”, conforme a Portaria SVS/MS nº 540 de 1997. Quimicamente, o aspartame é uma molécula composta por dois aminoácidos (L-fenilalanina e L-aspartico), ligados por um éster de metila (metanol) (ANVISA, 2006).

O aditivo aspartame foi avaliado toxicologicamente pelo JECFA em 1981, recebendo a IDA numérica de 40 mg/Kg de peso corpóreo, o que significa que a ingestão diária aceitável para uma criança de 30 Kg é de 1200 mg de aspartame, enquanto para um adulto de 60 kg é o dobro: 2400 mg. Informações químicas e toxicológicas do aspartame podem ser consultadas no sítio eletrônico do JECFA (ANVISA, 2006).

Esse edulcorante possui poder adoçante 200 vezes maior do que o açúcar e, por essa razão, é necessário um volume muito menor de aspartame para a obtenção do mesmo efeito da sacarose (ANVISA, 2006).

2.8 CROMATOGRAFIA

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. (CIOLA, 1998).

Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes, podendo a fase estacionária ser um sólido ou um líquido enquanto que a fase móvel poderá ser um fluído líquido, um gás ou um gás em condições supercríticas (acima da

temperatura crítica e a altas pressões). Se a fase móvel for um líquido, denominar-se-á a técnica de cromatografia a líquido ou cromatografia em fase líquida. Se a fase móvel for um gás ou um vapor, será cromatografia a gás ou cromatografia gasosa (CIOLA, 1998).

O termo cromatografia foi primeiramente empregado em 1906 e sua utilização é atribuída a um botânico, Mikhail Semenovich Tswett, nascido em Asti (Itália) em 14 de Maio de 1872, sendo a família originária da Rússia, ao descrever suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas, porém ficou ignorada até a década de 30, quando foi redescoberta e possibilitou seu aperfeiçoamento (NOGUEIRA, 2006).

2.8.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utiliza instrumentos muito sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (VALENTE ; COLLINS, MANFREDI, 1983). Somente a partir dos anos 70 se conseguiu um avanço considerável da cromatografia líquida moderna que até então era essencialmente subdesenvolvida (PERES, 2002).

O método mais direto para análises cromatográficas quantitativas envolve a preparação de uma série de soluções padrão de composições próximas da solução desconhecida. Os cromatogramas dos padrões são então obtidos e as alturas ou as áreas dos picos lançadas em gráfico em função da concentração. A curva obtida com esses dados deve ser uma reta que passe pela origem. As análises serão realizadas considerando esta curva. Para maior exatidão, a padronização deve ser refeita com frequência (SKOOG; HOLER; NIEMAN, 2002).

A maior precisão em cromatografia quantitativa é obtida com o uso de padrões internos porque são evitadas as incertezas produzidas na injeção da amostra. Neste procedimento, uma quantidade de uma substância medida cuidadosamente, que atua como padrão interno, é introduzida em cada padrão e na amostra. A razão entre as áreas (ou as alturas) do pico do analito e do pico do padrão interno (ou alturas) funciona como parâmetro analítico. Para que esse método tenha sucesso, é necessário que o pico do padrão interno seja bem separado dos picos de todos os outros componentes da amostra. Por outro lado, o pico do

padrão deve ser próximo do pico do analito. Com um padrão interno adequado, precisões relativas melhores do que 1% podem comumente ser obtidas. Já para a padronização externa injetam-se volumes exatamente iguais de amostras que contêm diferentes concentrações ou massas dos compostos de interesse. Com o tamanho dos picos obtidos (medidos em área ou altura do pico), constrói-se um gráfico de área ou altura de pico em função das massas analisadas (CIOLA, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 MATERIAL

Foi analisada, em quintuplicata (5 vezes), um tipo de bala sem açúcar nacional, atendendo à Legislação brasileira, adoçada com os edulcorantes Aspartame e Acessulfame de Potássio, conforme mostra a tabela 5.

Tabela 4 – Especificações, valores teóricos e legislações para Acessulfame e Aspartame.

Produto	Especificação Acessulfame mg/Kg	Valor Teórico mg/Kg	Legislação Brasileira mg/Kg	Especificação Aspartame mg/Kg	Valor Teórico mg/Kg	Legislação Brasileira mg/Kg
Balas sem açúcar Nacional	189 a 350	300	Máx. 350	378 a 750	549	Máx. 750

Fonte: Empresa A, 2001.

No processo produtivo a incorporação dos edulcorantes é feita por pré-mistura, a qual é obtida separadamente como mostram as figuras 1 e 2.

O sistema de incorporação das pré-misturas na massa da bala é feito por bombeamento mecânico o qual não apresenta precisão constante, em função de o volume produzido de bala ser de 1.000 Kg/hora.

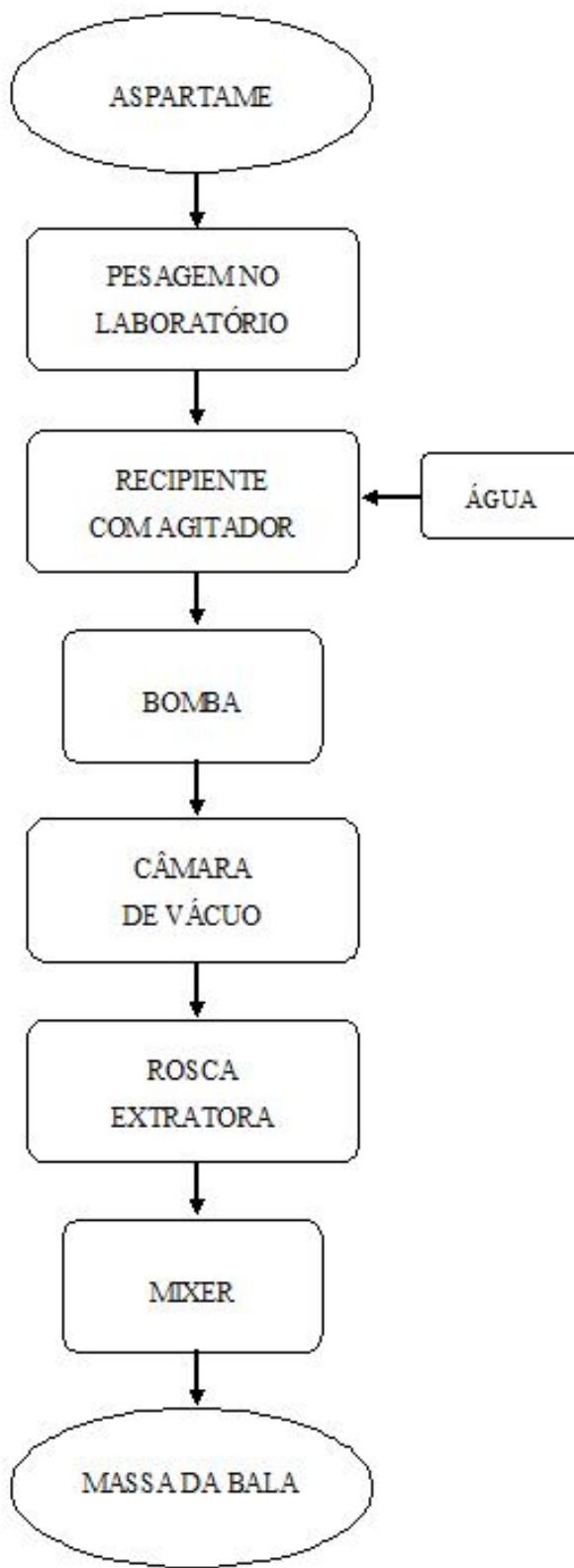


Figura 1 – Fluxograma da dosagem de aspartame no processo de fabricação de balas.
Fonte: Empresa A, 2001.

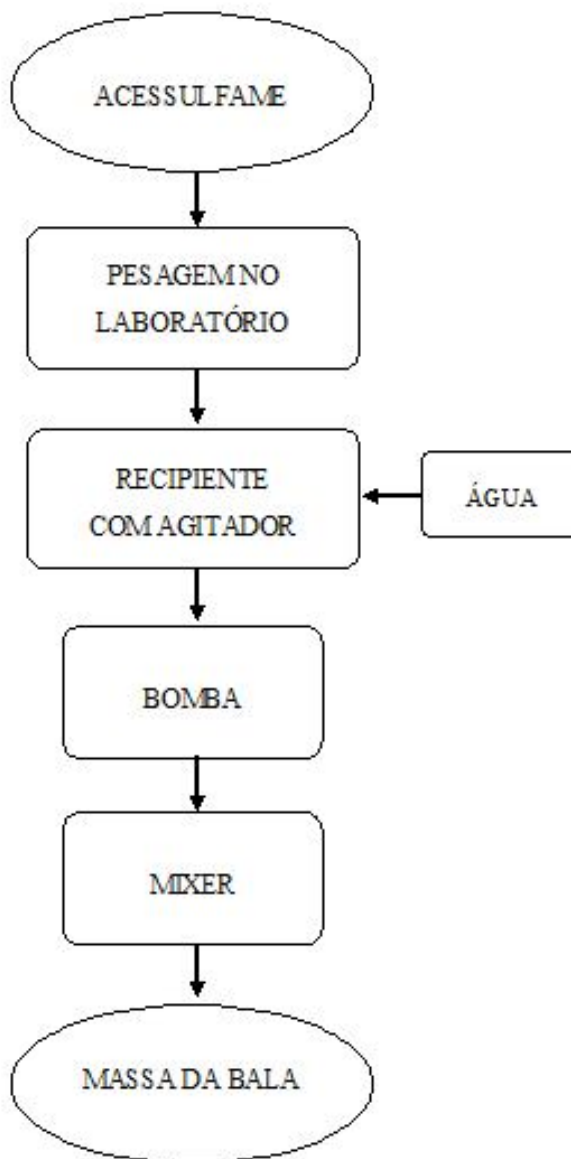


Figura 2 – Fluxograma da dosagem de acessulfame no processo de fabricação de balas.
Fonte: Empresa A, 2001.

3.2 REAGENTES

Para realização deste trabalho, foram utilizados os edulcorantes Acessulfame de Potássio com grau de pureza 99-101% (Vitasweet), Aspartame com grau de pureza 98-102% (Nutrasweet) e Cafeína 98% de pureza (J.T.Baker).

Para a preparação da fase móvel foram empregados os reagentes Acetonitrila grau CLAE 99,97%, Dihidrogenofosfato de Potássio padrão CLAE 99,5%, Metanol grau CLAE 100% (J.T. Baker) e Água purificada para CLAE.

3.3 EQUIPAMENTOS

As análises cromatográficas foram conduzidas em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência T.S.P, com Forno (Eldex CH-150) com temperatura constante de 40°C, Coluna C18 ODC (Octadecilsilano) 100 x 4,6 mm com 5 microns Hypersil T.S.P, com comprimento de onda de 254 nm para Cafeína e Acessulfame e 220 nm para Aspartame, uma Bomba Spectra System P1000 T.S.P com vazão de 1 mL/min., Detector UV 2000 T.S.P, Interface SN4000 T.S.P e acoplado a um Software Dell.

3.4 SOLUÇÕES

3.4.1 Solução de Buffer (0,05 M): 6,8045 g de Dihidrogeno Fosfato de Potássio, dissolvido em água purificada e transferido para um balão de 1L e complete o volume.

3.4.2 Solução de estoque de trabalho: 0,5 +/- 0,0005 g de Acessulfame K e Aspartame, dissolvido em água e transferido para um balão de 1L e complete o volume.

3.4.3 Solução de estoque de padrão interno: 0,5 +/- 0,0005 g de Cafeína, dissolvido em água e transferido para um balão de 1L e complete o volume.

3.4.4 Solução fase móvel 9:1: Foi preparado uma solução com Buffer/Acetonitrila (9:1), colocando 1 litro Solução de Buffer em um erlenmeyer de 4 litros e adicionado 111 mL de Acetonitrila, homogeneizado com um bastão de vidro e filtrado através do sistema de filtração com membrana de filtração 0,45 microns em seguida colocado a solução no ultra som por 15 minutos.

3.4.5 Solução padrão de calibração:

3.4.5.1 Solução (1) contendo 2,50 mg de Acessulfame K e Aspartame e 5,00 mg de Cafeína:
Foi pipetado 5 mL de solução de estoque de trabalho para um balão de 100 mL . Adicionado 10 mL de solução de estoque de padrão interno e completado o volume com água.

3.4.5.2 Solução (2) contendo 10,00 mg de Acessulfame K e Aspartame e 5,00 mg de Cafeína:
Foi pipetado 20 mL de solução de estoque de trabalho para um balão de 100 mL . Adicionado 10 mL de solução de estoque de padrão interno e completado o volume com água.

3.5 MÉTODO

3.5.1 Metodologia analítica

Como metodologia analítica foi utilizada a Instrução de Análise de Acessulfame de Potássio e Aspartame em Cromatografia Líquida da pasta de procedimentos analíticos da empresa.

Foram pesadas, em uma balança semi-analítica, 10 g de pastilhas trituradas em um erlenmeyer de 125 mL, em seguida foram adicionados 40 mL de água padrão CLAE e 10 mL de Solução de Estoque de Padrão Interno e dissolvido em um agitador magnético, após a dissolução total da bala foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL, e completado o volume com água CLAE. Em seguida foi feito uma lavagem da seringa com a amostra e conectado o filtro à seringa e enchido com amostra, transpassado um pouco de amostra pelo filtro e conectado o bico do filtro GHP da Millipore com 0,45 microns no injetor e pressionado suavemente o embolo da seringa até +/- 1 mililitro de amostra.

3.5.2 Validação

A metodologia analítica usada para a realização do ensaio foi validada tanto no laboratório da empresa, quanto no laboratório de uma Universidade de Bauru, como mostram as tabelas 5, 6, 7 e 8.

A validação foi feita a partir de amostras de bala as quais foram avaliadas juntamente com os edulcorantes, tanto na Empresa quanto na Universidade, assim retirando o efeito da matriz.

Tabela 5 – Resultados de Linearidade da Validação da Empresa.

	Constante b	r²	r	Coefficiente m
ESPECIFICAÇÃO	~ 0	> 0,99	> 0,98	~ 1
Padrão Acessulfame K	0,03	1,00	1,00	0,99
Padrão Aspartame	0,07	1,00	1,00	0,97

Fonte: Empresa A, 2001.

Tabela 6 – Resultados de Exatidão da Validação da Empresa.

	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação	% Recuperação
ESPECIFICAÇÃO	-	-	< 2.0 %	-
Padrão Acessulfame K	5,07	0,01	0,18	99,96
Padrão Aspartame	5,13	0,01	0,17	99,97

Fonte: Empresa A, 2001.

Tabela 7 – Resultados de Linearidade da Validação da Universidade.

	Constante b	r²	r	Coefficiente m
ESPECIFICAÇÃO	~ 0	> 0.99	> 0.98	~ 1
Padrão Acessulfame K	0	0,9978	0,9989	0,99
Padrão Aspartame	0	0,9984	0,9991	0,99

Fonte: Empresa A, 2001.

Tabela 8 – Resultados de Exatidão da Validação da Universidade.

	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação	% Recuperação
ESPECIFICAÇÃO	-	< 2.0 %	-
Padrão Acessulfame K	0,48	0,49	97,13
Padrão Aspartame	0,52	0,17	101,33

Fonte: Empresa A, 2001.

3.5.3 Amostragem e Ensaio de Proficiência

Foram coletadas 500g de amostras de balas duras sem açúcar do tipo: Drops Sugar Free PTB Nacional do sabor Menthol, do mesmo lote de produção, armazenadas em sacos plásticos, sendo cinco amostras, em cinco dias diferentes com diferentes calibrações.

Os três analistas, um de cada turno, executaram as análises em quintuplicata para cada amostra, isto é, foi injetada no cromatógrafo cinco vezes por analista, cada amostra de bala, totalizando setenta e cinco resultados. Os resultados obtidos foram armazenados no computador e anotados em uma planilha eletrônica (Apêndices A, B, C, D, E e F).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cromatogramas obtidos (Figura 3), num total de 90 cromatogramas, foram tabulados por analista e os resultados apresentados quanto a média, desvio padrão, coeficiente de variação e razão de Horrat.

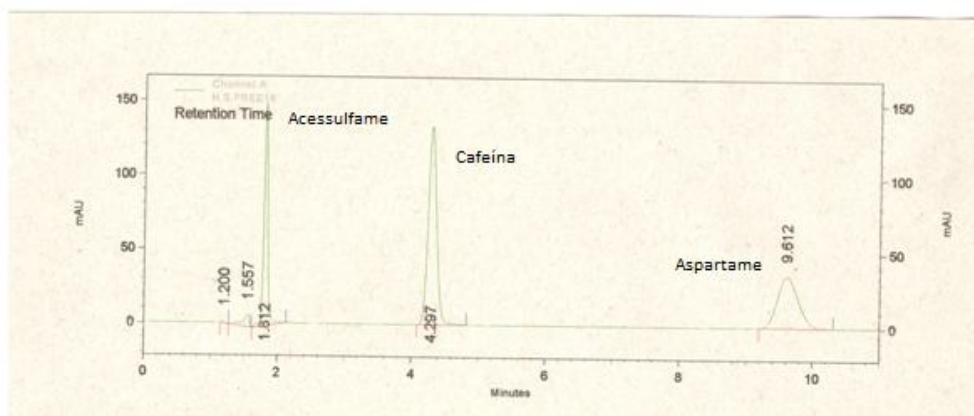


Figura 3 – Exemplo de cromatograma obtido nas análises de balas sem açúcar com Fase Móvel Acetonitrila e Dihidrogenofosfato de Potássio (9:1), Fase Estacionária Coluna de fase reversa C18 ODC (Octadecilsilano) (Hypersil) 100 mm x 4,6 mm e partículas com diâmetro de 5 microns, com fluxo de 1 mL/minutos, tempo de corrida de 11 minutos, com comprimento de onda 254 nm para Cafeína e Acesulfame e 220 nm para Aspartame.

Fonte: Empresa A, 2010.

As tabelas 9 e 10 apresentam os resultados das análises de ACESSULFAME e ASPARTAME obtidos pelos três analistas.

Todos os analistas apresentam individualmente boa repetibilidade, a qual pode ser avaliada pelo baixo coeficiente de variação (C.V.) observado e posteriormente analisado através da razão de Horrat (HOR) (HORWITZ,1980), a qual para valores em ppm do analito aceita até no máximo 2 como valor adequado para uma análise com boa repetibilidade (INMETRO,2003).

Tabela 9 – Resultados da Precisão Intermediária através dos resultados da Média, Desvio Padrão, Coeficiente de Variação e Horrat para os valores obtidos de ACESSULFAME nas amostras.

	Parâmetro Analisado	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
ANALISTA 1	Média (mg/Kg)	249,904	243,609	371,208	286,117	293,927
	D.P.	7,00	2,14	0,41	3,22	2,56
	C.V (%)	2,80	0,88	0,11	1,13	0,87
	HOr.	0,17	0,05	0,01	0,07	0,05
ANALISTA 2	Média (mg/Kg)	281,269	338,971	377,024	282,036	293,915
	D.P.	2,34	1,87	6,39	2,22	1,68
	C.V (%)	0,83	0,55	1,70	0,79	0,57
	HOr.	0,05	0,03	0,11	0,05	0,04
ANALISTA 3	Média (mg/Kg)	241,831	315,355	383,355	286,489	293,067
	D.P.	0,26	1,66	1,15	2,50	0,81
	C.V (%)	0,11	0,53	0,30	0,87	0,28
	HOr.	0,01	0,03	0,02	0,05	0,02

Tabela 10 – Resultados da Precisão Intermediária através dos resultados da Média, Desvio Padrão, Coeficiente de Variação e Horrat para os valores obtidos de Aspartame nas amostras.

	Parâmetro Analisado	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
ANALISTA 1	Média (mg/Kg)	742,028	429,581	532,895	618,266	435,244
	D.P.	7,15	1,92	4,28	2,40	2,76
	C.V (%)	0,96	0,45	0,80	0,39	0,63
	HOr.	0,06	0,03	0,05	0,02	0,04
ANALISTA 2	Média (mg/Kg)	725,974	416,087	493,553	622,382	435,961
	D.P.	4,18	2,69	5,13	1,41	3,67
	C.V (%)	0,58	0,65	1,04	0,23	0,84
	HOr.	0,04	0,04	0,07	0,01	0,05
ANALISTA 3	Média (mg/Kg)	753,935	440,481	550,647	627,404	432,552
	D.P.	2,42	1,23	1,61	3,09	5,32
	C.V (%)	0,32	0,28	0,29	0,49	1,23
	HOr.	0,02	0,02	0,02	0,03	0,08

Quando comparadas as médias obtidas para uma mesma amostra para os três analistas foi observado que em quase todas as amostras, exceto para a amostra 5, existe diferença significativa entre os valores médios de cada analista, pois o F calculado foi maior que o F tabelado em um nível de 99 % de confiança entre os três analistas, quando avaliados pela técnica estatística de análise de variância (ANOVA) (VIEIRA,1999), como mostra a tabela 11.

Tabela 11 – Resultados da Precisão Intermediária de acordo com a ANOVA nas amostras.

Amostra	Edulcorante	F calculado	F tabelado
1	Acessulfame	119,45	6,93
	Aspartame	39,65	6,93
2	Acessulfame	3424,05	6,93
	Aspartame	180,21	6,93
3	Acessulfame	13,07	6,93
	Aspartame	270,84	6,93
4	Acessulfame	4,25	6,93
	Aspartame	18,18	6,93
5	Acessulfame	0,36	6,93
	Aspartame	0,98	6,93

Visando avaliar se esta diferença de uma mesma amostra se devia a problemas analíticos ou a dosagem industrial dos edulcorantes foi feita uma análise de uma solução padrão de Acessulfame e Aspartame pelos analistas envolvidos no teste, conforme mostra a tabela 12.

Tabela 12 – Resultados da Precisão Intermediária através dos resultados da Média, Desvio Padrão, Coeficiente de Variação e Horrat para os valores obtidos de Aspartame e Acessulfame no padrão.

	Parâmetro Analisado	Acessulfame	Aspartame
ANALISTA 1	Média (mg/Kg)	290,005	606,267
	D.P.	1,11	1,80
	C.V (%)	0,38	0,30
	HOr.	0,02	0,02
ANALISTA 2	Média (mg/Kg)	290,075	605,058
	D.P.	0,68	0,60
	C.V (%)	0,23	0,10
	HOr.	0,01	0,01
ANALISTA 3	Média (mg/Kg)	291,689	605,952
	D.P.	1,04	0,91
	C.V (%)	0,35	0,15
	HOr.	0,02	0,01

Os valores obtidos mostram boa repetibilidade para cada analista, o que pode ser observado pela razão de Horrat (HORWITZ,1980) e também as médias quando avaliadas pela ANOVA não apresentam diferenças significativas, pois o F calculado foi menor que o F tabelado em um nível de 99% de confiança entre os três analistas (VIEIRA,1999), como mostra a tabela 13.

Tabela 13 – Resultados da Precisão Intermediária de acordo com a ANOVA no padrão.

Amostra	Edulcorante	F calculado	F tabelado
Padrão	Acessulfame	4,93	6,93
	Aspartame	1,33	6,93

5 CONCLUSÕES PARCIAIS

A avaliação da confiabilidade dos resultados analíticos através da precisão intermediária mostrou que os analistas apresentam boa repetibilidade, porém os dados obtidos com a amostra padrão dos edulcorantes quando comparados com as amostras provenientes da produção industrial indicam que o problema se encontra no método de dosagem industrial dos edulcorantes (dosagem mecânica), a qual mostra grande variabilidade de dosagem em uma mesma amostra composta por 500 gramas.

Para melhor acompanhamento e correção do problema detectado é sugerido que as amostragens e análises que acompanham o processo produtivo sejam feitas em intervalos de tempo menores que os atuais, que são de uma coleta por turno.

Outra possibilidade é a avaliação de um novo sistema de dosagem para os edulcorantes que apresente maior precisão.

REFERÊNCIAS

ABNT ISO/IEC GUIA 2 - **Normalização e atividades relacionadas**: Vocabulário geral. Rio de Janeiro, 1998.

ABNT. NBR ISO/IEC 17025. **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de calibração e de ensaios**. Rio de Janeiro, 2001.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 out. 1997.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. **Anvisa.org.br**, c2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm> Acesso em 3 mar. 2010.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 3, de 02/01/2001. Regulamento Técnico que aprova o uso de Aditivos Edulcorantes estabelecendo seus Limites máximos para os Alimentos. **Anvisa.org.br**, c2003. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/03_01rdc.htm> Acesso em 3 mar. 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 17, de 19/01/2006. **Anvisa.org.br**, c2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/informes/17_190106.htm> Acesso em: 3 mar. 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para qualidade em química analítica**: uma assistência a habilitação. Brasília, 2005. (Séries temáticas para Laboratório, v. 1).

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 out. 1997.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 251, de 30 de junho de 1999. **Anvisa.gov.br**, c2003. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/251_99.htm> Acesso em: 3 mar. 2010.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Washington: AOAC, 2002.

ARAÚJO, D. B.; ARAÚJO, R. P. C.; BARRAL, T. Características de produtos contendo aspartame. **Pesquisa Brasileira de Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v. 8, n. 2, p. 223-228, maio/ago. 2008.

BIPM. Introduction. **Bipm.org**, c2004. Disponível em:
< <http://www.bipm.org/en/convention/wmd/2004/introduction.html> > Acesso em: 15 mar. 2010.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2000. 179 p.

CODEX. General Standard For Food Additives. CODEX STAN 192-1995. **Codexalimentarius.net**, c2010. Disponível em: <
www.codexalimentarius.net/gsfaonline/CXS_192e.pdf > Acesso em 1 abr. 2010.

EMANUELLI, T.; SCANDIUZZI, M. Validação de processos na indústria farmacêutica. In: CONGRESSO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS E COSMÉTICOS, 2000, Rio Grande do Sul. **Anais...** Rio Grande do Sul: Universidade do Rio Grande do Sul, 2000. p.57.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics**. Teddington: LGC, 1998. 61p.

HORWITZ, W. Quality Assurance in the analyses of foods for trace constituents. **Journal of the Association of Analytical Chemistry**, Washington, EUA v. 63, n. 6, 1980. p. 1344-1354, 1980.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, Rev. 1. mar.2003. 36p.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

ISO. International Standards Organization. ISO/IEC Guide 43-1. **Proficiency testing by interlaboratory comparisons: Part 1: development and operation of proficiency testing schemes**. Geneva: ISO, 1997. 16 p.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 5. ed. Campinas, SP: Ed. Átomo, 2008. 351 p.

LIPINSKI, G. W.R. The new intense sweetener acesulfame-K. **Food Chemistry**, v. 16, p. 259-269, 1985.

NOGUEIRA, J. M. F. **Mikhail Semenovitch Tswett: Um legado para a cromatografia moderna**. **Química**, São Paulo, n.100, p.51-56, 2006.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 227-229, 2002.

RIBANI, M. et al. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SKOOG, K. A.; HOLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Cromatografia líquida de alta eficiência. In:_____. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002, p. 642-677.

SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. 297 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) -Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, MG.

SWARTZ, M.; KRULL, I. (Ed.). **Analytical Method Development**. NewYork: Ed. Marcel Dekker, 1997.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Publication of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)**, v. 74, p. 835-855, 2002.

TORLONI, M. et al. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 5, p. 267-75, 2007.

VALENTE, A. L. P.; COLLINS, C. H.; MANFREDI, J. E. Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, p.103-109, jul.1983.

VIAL, J.; JARDY, A. Interlaboratory studies: the best way to estimate the characteristics of dispersion of an HPLC method and a powerful tool for analytical transfers, **Journal of Chromatographia**. Paris, França v. 53, 141 p. 2001.

VIEIRA, S. **Estatística para a qualidade**. Rio de Janeiro, RJ: Ed Campos, 1999. 216 p.

ENSAIO DE PROFICIÊNCIA - ANÁLISE DE ACESSULFAME E ASPARTAME

Dispositivo: **CROMATÓGRAFO LÍQUIDO - CLAE**

Tipo: **T.S.P**

Nº série: **061/11/752-5**

Nº identificação: **25495**

Modelo: **P1000**

Unidade de Medida: **mg/Kg**

Frequência de Calibração: **6 MESES**

Data do Teste: **06/04/2010**

Amostra: **Drops Sugar Free PTB Nacional Mentho**

Resultados

Analista 1		Analista 2			Analista 3			
Amostra	Acessulfame	Aspartame	Amostra	Acessulfame	Aspartame	Amostra	Acessulfame	Aspartame
1	260,591	750,698	1	280,268	723,655	1	242,039	755,511
2	245,351	747,443	2	280,241	724,766	2	241,728	755,577
3	242,186	732,591	3	285,454	723,389	3	241,566	750,903
4	250,709	739,284	4	279,973	724,687	4	241,652	751,727
5	250,684	740,125	5	280,411	733,373	5	242,171	755,956
Média	249,904	742,028	Média	281,269	725,974	Média	241,831	753,935
Desvio Padrão	7,00	7,15	Desvio Padrão	2,34	4,18	Desvio Padrão	0,26	2,42
Coefficiente de Variação	2,80	0,96	Coefficiente de Variação	0,83	0,58	Coefficiente de Variação	0,11	0,32
HORRAT	0,17	0,06	HORRAT	0,05	0,04	HORRAT	0,01	0,02

Observações: As amostras foram coletadas dia 05/04/2010 as 14:30 horas.

APÊNDICE B – Amostra 2

ENSAIO DE PROFICIÊNCIA - ANÁLISE DE ACESSULFAME E ASPARTAME

Dispositivo: CROMATÓGRAFO LÍQUIDO - CLAE											
Tipo: T.S.P											
Nº série: 06111752-5											
Nº Identificação: 25495											
Modelo: P1000											
Unidade de Medida: mg/Kg											
Frequência de Calibração: 6 MESES											
Data do Teste: 17/04/2010											
Amostra: Drops Sugar Free PTB Nacional Mentho											
Resultados											
Analista 1				Analista 2				Analista 3			
Amostra	Acessulfame	Aspartame	Amostra	Acessulfame	Aspartame	Amostra	Acessulfame	Aspartame	Amostra	Acessulfame	Aspartame
1	242,800	428,025	1	337,616	414,894	1	315,081	439,215	1	315,081	439,215
2	246,446	432,874	2	337,484	418,349	2	313,723	439,292	2	313,723	439,292
3	244,387	429,271	3	340,000	414,404	3	315,156	441,759	3	315,156	441,759
4	243,797	428,445	4	341,784	413,282	4	316,989	441,658	4	316,989	441,658
5	240,614	429,288	5	337,969	419,508	5	317,885	440,481	5	317,885	440,481
Média	243,609	429,581	Média	338,971	416,087	Média	315,767	440,481	Média	315,767	440,481
Desvio Padrão	2,14	1,92	Desvio Padrão	1,87	2,69	Desvio Padrão	1,66	1,23	Desvio Padrão	1,66	1,23
Coefficiente de Variação	0,88	0,45	Coefficiente de Variação	0,55	0,65	Coefficiente de Variação	0,53	0,28	Coefficiente de Variação	0,53	0,28
HORRAT	0,05	0,03	HORRAT	0,03	0,04	HORRAT	0,03	0,02	HORRAT	0,03	0,02
Observações: As amostras foram coletadas dia 17/04/2010 as 09:15 horas.											

APÊNDICE C – Amostra 3

ENSAIO DE PROFICIÊNCIA - ANÁLISE DE ACESSULFAME E ASPARTAME

Dispositivo: CROMATÓGRAFO LÍQUIDO - CLAE		Amostra: Drops Sugar Free PTB Nacional Mentho														
Tipo: T.S.P		Resultados														
Nº série: 06111752-5		Analista 1					Analista 2					Analista 3				
Nº Identificação: 25495		Amostra	Acessulfame	Aspartame	Amostra	Acessulfame	Aspartame	Amostra	Acessulfame	Aspartame	Amostra	Acessulfame	Aspartame	Amostra	Acessulfame	Aspartame
Modelo: P1000		1	371,728	526,458	1	369,308	498,139	1	382,077	560,506	2	383,295	552,780	3	383,486	551,699
Unidade de Medida: mg/Kg		2	371,260	532,458	2	383,511	486,404	2	383,295	552,780	3	383,486	551,699	4	382,744	549,209
Frequência de Calibração: 6 MESES		3	371,463	537,980	3	379,510	490,008	3	383,486	551,699	4	382,744	549,209	5	385,172	549,041
		4	370,820	535,259	4	371,160	497,618	4	382,744	549,209	Média	383,355	550,647			
		5	370,778	532,321	5	381,633	495,598	5	385,172	549,041	Desvio Padrão	1,15	1,61			
		Média	371,208	532,895	Média	377,024	493,553	Média	383,355	550,647	Coefficiente de Variação	0,30	0,29			
		Desvio Padrão	0,41	4,28	Desvio Padrão	6,39	5,13	Desvio Padrão	1,15	1,61	HORRAT	0,02	0,02			
		Coefficiente de Variação	0,11	0,80	Coefficiente de Variação	1,70	1,04	Coefficiente de Variação	0,30	0,29						
		HORRAT	0,01	0,05	HORRAT	0,11	0,07	HORRAT	0,02	0,02						
Observações: As amostras foram coletadas dia 02/05/2010 as 11:00 horas.																

APÊNDICE D – Amostra 4

ENSAIO DE PROFICIÊNCIA - ANÁLISE DE ACESSULFAME E ASPARTAME

Dispositivo: <u>CROMATÓGRAFO LÍQUIDO - CLAE</u>	Amostra: <u>Drops Sugar Free PTB Nacional Mentho</u>											
Tipo: <u>T.S.P</u>	Data do Teste: <u>08/05/2010</u>											
Nº série: <u>06111752-5</u>	Resultados											
Nº Identificação: <u>25495</u>	Analista 1			Analista 2			Analista 3					
Modelo: <u>PI1000</u>	Amostra	Acessulfame	Aspartame	Amostra	Acessulfame	Aspartame	Amostra	Acessulfame	Aspartame	Amostra	Acessulfame	Aspartame
Unidade de Medida: <u>mg/Kg</u>	1	291,416	614,559	1	279,901	620,570	1	282,944	627,447			
Frequência de Calibração: <u>6 MESES</u>	2	286,082	620,664	2	282,802	623,613	2	284,742	632,701			
	3	282,739	619,693	3	286,478	621,689	3	288,358	626,180			
	4	284,832	617,362	4	280,463	622,050	4	288,255	625,623			
	5	285,516	619,051	5	281,536	623,989	5	288,148	625,070			
	Média	286,117	618,266	Média	282,036	622,382	Média	286,489	627,404			
Desvio Padrão	3,22	2,40		Desvio Padrão	2,22	1,41	Desvio Padrão	2,50	3,09			
Coefficiente de Variação	1,13	0,39		Coefficiente de Variação	0,79	0,23	Coefficiente de Variação	0,87	0,49			
HORRAT	0,07	0,02		HORRAT	0,05	0,01	HORRAT	0,05	0,03			
Observações: As amostras foram coletadas dia 07/05/2010 as 10:00 horas.												

APÊNDICE E – Amostra 5

ENSAIO DE PROFICIÊNCIA - ANÁLISE DE ACESSULFAME E ASPARTAME

Dispositivo: CROMATÓGRAFO LÍQUIDO - CLAE

Tipo: T.S.P

Nº série: 06111752-5

Nº Identificação: 25495

Modelo: P1000

Unidade de Medida: mg/Kg

Frequência de Calibração: 6 MESES

Data do Teste: 12/05/2010

Amostra: Drops Sugar Free PTB Nacional Mentho

Resultados

Amostra	Analista 1			Analista 2			Analista 3		
	Acessulfame	Aspartame	Amostra	Acessulfame	Aspartame	Amostra	Acessulfame	Aspartame	Amostra
1	295,135	434,559	1	296,376	440,277	1	293,494	433,160	
2	294,860	439,185	2	292,873	432,705	2	294,072	439,203	
3	291,002	436,744	3	292,333	431,737	3	292,497	434,341	
4	291,577	433,525	4	293,101	436,624	4	292,018	424,523	
5	297,063	432,205	5	294,891	438,463	5	293,254	431,535	
Média	293,927	435,244	Média	293,915	435,961	Média	293,067	432,552	
Desvio Padrão	2,56	2,76	Desvio Padrão	1,68	3,67	Desvio Padrão	0,81	5,32	
Coefficiente de Variação	0,87	0,63	Coefficiente de Variação	0,57	0,84	Coefficiente de Variação	0,28	1,23	
HORRAT	0,05	0,04	HORRAT	0,04	0,05	HORRAT	0,02	0,08	

Observações: As amostras foram coletadas dia 11/05/2010 as 11:30 horas.

