

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DE CONHECIMENTO DE CIÊNCIA DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ESTEVIOSÍDEO E
REBAUDIOSÍDEO A EM VINHOS**

Camila Lazzari

Caxias do Sul

2021

Camila Lazzari

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ESTEVIOSÍDEO E
REBAUDIOSÍDEO A EM VINHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Vanderlinde

Caxias do Sul

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

L432d Lazzari, Camila

Determinação simultânea de esteviosídeo e rebaudiosídeo A em vinhos
[recurso eletrônico] / Camila Lazzari. – 2021.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021.

Orientação: Regina Vanderlinde.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Vinho e vinificação. 2. Biotecnologia. 3. Cromatografia a líquido. 4.
Espectrometria de massa. I. Vanderlinde, Regina, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 663.25

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

Camila Lazzari

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ESTEVIOSÍDEO E
REBAUDIOSÍDEO A EM VINHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Vanderlinde

DISSERTAÇÃO APROVADA EM DE DE 2021.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Vanderlinde

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

Profa. Dra. Cláudia Alcaraz Zini

Dra. Fernanda Rodrigues Spinelli

Caxias do Sul

2021

AGRADECIMENTOS

Certa vez, Antoine de Saint-Exupéry escreveu em seu livro mais famoso: “aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.” Ninguém vive só, e com isso somos influenciados e estamos sempre em constante aprendizado. As pessoas com as quais convivemos durante as várias etapas de nossas vidas exercem sobre nós o poder da mudança interna e externa, participando do nosso desenvolvimento, alterando nosso modo de enxergar as coisas e até mesmo de viver. Sendo assim eu gostaria de agradecer:

Aos meus pais, Tarsízio e Terezinha, que mesmo sem ter tido a oportunidade de estudar quando eram jovens, sempre incentivaram a mim e a meu irmão, Eduardo, a seguirmos com nossos estudos, não medindo esforços para nos auxiliarem. Eles são os principais responsáveis por eu estar concluindo esta etapa e sempre serei grata por toda a paciência, carinho e atenção que eles dedicam a mim e ao meu irmão.

Ao Eduardo, que me mostra todos os dias que irmãos podem ser verdadeiros amigos, e sua namorada Larissa, obrigado por sempre estarem presente.

Ao meu eterno namorado, Daniel (*In memoriam*), que sempre acreditou em mim e que me mostrou como o amor é leve, quero agradecer imensamente todo o carinho, admiração e companheirismo que sempre demonstramos um pelo outro. “*May we meet again – Jamie Brown*”.

À minha orientadora, professora Doutora Regina Vanderlinde por toda orientação e atenção fornecidas a mim durante a formulação deste trabalho. Obrigada pelas oportunidades proporcionadas e por todo conhecimento e todas experiências compartilhadas comigo.

À Doutora Fernanda Rodrigues Spinelli pelo auxílio prestado nas análises realizadas neste estudo e pela disponibilidade de tempo que dedicou revisando minha dissertação.

Ao Laboratório de Análises Enológicas (Laren) pela disponibilidade dos equipamentos, materiais e instalações para a realização deste trabalho.

À Universidade de Caxias do Sul (UCS), ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBio) e ao Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (Prosup) pela oportunidade de ingressar no mestrado e pela concessão da taxa escolar.

Aos professores Doutor Sidnei Moura e Silva e Doutor Sergio Laguna Echeverrigaray por terem aceito compor a banca de qualificação, disponibilizando seu tempo para a avaliação

da dissertação e contribuindo com correções e sugestões para a melhoria do trabalho.

Aos professores da banca examinadora, Profa. Dra. Cláudia Alcaraz Zini, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e novamente ao Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva, da Universidade de Caxias do Sul e à Dra. Fernanda Rodrigues Spinelli por terem atendido ao convite para desempenhar este papel, dispondo seu tempo e conhecimento para avaliar este trabalho.

A todos os colegas e amigos que de forma direta ou indireta contribuíram para que a realização deste trabalho se tornasse possível.

O meu sincero muito obrigada.

“Às vezes ainda acho que a “outra vida” é algo que inventamos para apaziguar a dor da perda, para tornar nosso tempo no labirinto suportável. Talvez ela fosse apenas matéria, e matéria se recicla. Mas, para ser sincero, não acredito que ela fosse apenas matéria. O resto dela também precisa ser reciclado.

Hoje acredito que somos mais do que a soma das nossas partes. Se pegássemos seu código genético, suas experiências de vida, seus relacionamentos com outras pessoas e enxertássemos num corpo do mesmo tamanho e com as mesmas proporções, ainda assim não teríamos outra Alasca. Existe algo mais. Uma parte que é maior do que a soma das suas partes cognoscíveis. E essa parte tem de ir para algum lugar, pois não pode ser destruída.

... Eu não sei onde fica o outro lado, mas acredito que seja em algum lugar e espero que seja bonito.”

(Quem é você, Alasca?

John Green)

RESUMO

Segundo a legislação do Brasil, a edulcoração de vinhos, a fim de se obter vinhos doces e demi-sec, pode ser realizada adicionando-se somente sacarose na bebida antes do engarrafamento. A adição de qualquer outra substância edulcorante, seja ela sintética ou natural, é considerada adulteração do vinho e para garantir que esses produtos estejam de acordo com a lei são necessários métodos analíticos confiáveis capazes de detectar o uso dessas substâncias. Os edulcorantes naturais esteviosídeo e rebaudiosídeo A, encontrados principalmente nas folhas da *Stevia rebaudiana* (Bertoni), têm sido bastante utilizados pela indústria de alimentos e bebidas nos últimos anos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM), com fonte de ionização Eletrospray (ESI), para a determinação dos edulcorantes esteviosídeo e rebaudiosídeo A em vinhos. Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 com gradiente de eluição das fases móveis compostas por ácido fórmico 0,1% (v/v) em água e ácido fórmico 0,1% (v/v) em acetonitrila. A fonte de ionização operou em modo negativo e a aquisição de dados ocorreu no modo de monitoramento de reações múltipla (MRM). Para confirmar a adequação do método analítico, parâmetros de validação como linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), recuperação (exatidão) e repetibilidade (precisão) foram avaliados, na matriz. As curvas de calibração mostraram-se lineares com coeficientes de correlação (R^2) de 0,9981 para o esteviosídeo e 0,9979 para o rebaudiosídeo A. Os LDs e LQs do esteviosídeo foram de 4,56 mg.L⁻¹ e 4,80 mg.L⁻¹ enquanto do rebaudiosídeo A foram de 4,46 mg.L⁻¹ e 4,70 mg.L⁻¹, respectivamente. Os dois edulcorantes apresentaram valores de recuperação dentro da faixa de 83,70 e 106,58% e os valores de coeficientes de variação obtidos foram $\leq 3,48\%$. Foram analisadas 24 amostras de vinhos e espumantes nacionais e não foram detectadas a presença dos edulcorantes analisados (os valores obtidos foram menores que o LQ), sugerindo que as bebidas analisadas não apresentam adulterações, estando de acordo com a legislação vigente no país. O método proposto apresentou-se eficaz para a determinação dos edulcorantes esteviosídeo e rebaudiosídeo A em vinhos, demonstrando a importância do desenvolvimento deste trabalho visto que atualmente não existe um método oficial de detecção desses edulcorantes naturais em vinhos.

Palavras-chave: vinho, edulcorante, cromatografia líquida, espectrometria de massas.

ABSTRACT

According to the Brazilian legislation, in order to obtain medium dry and sweet wines, there is just allowed to add sucrose to the wine before bottling. The addition of any other natural or synthetic sweetener in wine is considered an adulteration and to ensure that these products are in accordance to the law, reliable analytical methods capable of detecting the use of these substances are needed. The natural stevioside and rebaudioside A sweeteners, mainly found in the leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), have been widely used by the food and beverage industry in recent years. Therefore, the objective of this work was to develop a method by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) using electrospray ionization (ESI) source, for the determination of stevioside and rebaudioside A sweeteners in wines. The HPLC separation was carried out on a C18 column with gradient elution of 0.1% formic acid (v/v) in water and 0.1% formic acid (v/v) in acetonitrile as mobile phase. The ionization source worked in negative ion mode and data acquisition under MS/MS was achieved by applying multiple reaction monitoring (MRM). To confirm that analytical method is suitable for its intended use, several validation parameters, such as linearity, limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), recovery (accuracy) and repeatability (precision) were evaluated. The correlation coefficients (R^2) of the calibration curve were 0.9981 for stevioside and 0.9979 for rebaudioside A, revealed a good linearity in the concentration range for each sweetener. LOD and LOQ were 4.56 mg.L⁻¹ and 4.80 mg.L⁻¹ for stevioside, respectively. For rebaudioside A, the LOD and LOQ were 4.46 mg.L⁻¹ and 4.70 mg.L⁻¹, respectively. The recovery ranged were between 83.70% and 106.58% and the coefficient of variation were $\leq 3.48\%$, for both of the sweeteners studied. There were analyzed 24 national commercial wine and sparkling wine samples and the sweeteners were not detected in any of the them, implying that all the samples were conforming to the law. The proposed method has been successfully applied to the determination of stevioside and rebaudioside A in wines, demonstrating the importance of developing this work since there is no official method for detecting these natural sweeteners in wines.

Keywords: wine, sweetener, liquid chromatography, mass spectrometry

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Associação de Analistas Químicos Oficiais, do inglês *Association of Official Analytical Chemists*

IQPA – Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)*

APPI – Fotoionização por Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*

C₁₈ – Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano

CAS – do inglês *Chemical Abstracts Service*

CGCRE – Coordenação Geral de Acreditação

CID – Dissociação Induzida por Colisão, do inglês *Collisionally Activated Dissociation*

CL – Cromatografia Líquida

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE – EM/EM - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas Sequencial

CV – Coeficiente de Variação

DAD – Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detection*

DPR – Desvio Padrão Relativo

EM – Espectrometria de Massas

EM/EM – Espectrometria de Massas Sequencial

ESI – Ionização por Eletrospray, do inglês *Electrospray Ionization*

EFS – Extração em Fase Sólida

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FN – Fase Normal

FR – Fase Reversa

IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho

IDA – Ingestão Diária Aceitável

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISO – Organização Internacional de Padronização, do inglês *International Standard*

Organization

IEC – Comissão Eletrotécnica Internacional, do inglês *International Electrotechnical Commission*

JECFA – Comitê Conjunto de Especialistas FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares, do inglês *Join FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*

LAREN – Laboratório de Referência Enológica

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MERCOSUL – Mercado Comum do Sul

MIS – Monitoramento de íon selecionado

MRM – Monitoramento de reações múltiplas

MRS – Monitoramento de reação selecionada

NBR – Norma Brasileira

OIV – Organização Internacional da Vinha e do Vinho, do inglês *International Organisation of Vine and Wine*

OMS – Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization (WHO)*

PVDF – Fluoreto de Polivinilideno, do inglês *Polyvinylidene Fluoride*

QTRAP – do inglês *Quadrupole Ion Trap*

R² – coeficiente de determinação

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

SEAPDR – Secretaria Estadual da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural

SIM – Monitoramento do íon selecionado, do inglês *Single Ion Monitoring*

SRM – Monitoramento de reação selecionada, do inglês *selected reaction monitoring*

ToF – tempo de voo, do inglês *Time of Flight*

UV – Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações químicas dos compostos esteviosídeo e rebaudiosídeo A.....	23
Tabela 2. Utilização de técnicas para análise de edulcorantes naturais e sintéticos em vinhos e outras matrizes.....	30
Tabela 3. Critério de aceitação para recuperação atrelados ao nível de concentração do analito	39
Tabela 4. Critério de aceitação para repetibilidade atrelados ao nível de concentração do analito	40
Tabela 5. Gradiente de eluição da fase móvel para separação dos edulcorantes no presente estudo.....	45
Tabela 6. Parâmetros de ionização e espectrométricos do esteviosídeo e do rebaudiosídeo A.....	49
Tabela 7. Resultados da validação do método para determinação de esteviosídeo e rebaudiosídeo A em vinhos.....	50
Tabela 8. Recuperação média do esteviosídeo	53
Tabela 9. Recuperação média do rebaudiosídeo A	53
Tabela 10. Precisão, expressa em CV ou DPR do esteviosídeo	54
Tabela 11. Precisão, expressa em CV ou DPR do rebaudiosídeo A	54
Tabela 12. Detecção dos edulcorantes esteviosídeo e rebaudiosídeo A em amostras comerciais	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das etapas do processo de elaboração de vinhos tintos e brancos.	19
Figura 2. Estrutura química do esteviol, esteviosídeo e rebaudiosídeo A	23
Figura 3. Aplicação de diferentes tecnologias de ionização de compostos de acordo com a polaridade e o peso molecular.	27
Figura 4. Esquema de um analisador do tipo quadrupolo	27
Figura 5. Esquema de um analisador do tipo triplo quadrupolo.....	28
Figura 6. Exemplo de uma curva analítica com a identificação de alguns parâmetros que devem ser levados em consideração em uma validação: faixa de trabalho; faixa linear de trabalho; sensibilidade; LD e LQ.....	37
Figura 7. Esquema do gradiente de eluição das fases móveis A e B do método utilizado.	48
Figura 8. Curva analítica do esteviosídeo.....	51
Figura 9. Curva analítica do rebaudiosídeo A	52
Figura 10. Distribuição dos resíduos de acordo com a concentração de esteviosídeo	52
Figura 11. Distribuição dos resíduos de acordo com a concentração de rebaudiosídeo A	52

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	A Viticultura	17
2.2	Produção e legislação do vinho	18
2.3	Edulcorantes.....	21
2.3.1	Edulcorantes naturais esteviosídeo e rebaudiosídeo A.....	22
2.4	Métodos de análise.....	24
2.4.1	Métodos de separação e análise por CLAE	24
2.4.2	Espectrometria de Massas	25
2.5	Determinação de edulcorantes em alimentos e bebidas.....	28
2.6	Validação de Metodologia	35
2.6.1	Linearidade / Faixa de Trabalho / Faixa Linear de Trabalho / Sensibilidade.....	36
2.6.2	Limites de detecção (LD)	37
2.6.3	Limites de quantificação (LQ).....	38
2.6.4	Tendência / Recuperação.....	38
2.6.5	Precisão.....	40
3	OBJETIVOS.....	42
3.1	Objetivo Geral.....	42
3.2	Objetivos Específicos	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	Amostras, reagentes e padrões	43
4.2	Preparo das soluções padrão e de amostras	43
4.3	Instrumentação utilizada	44
4.4	Condições cromatográficas e espectrometria de massas	44
4.5	Validação do método para determinação de esteviosídeo e rebaudiosídeo A	45
4.5.1	Linearidade / Faixa de Trabalho.....	45
4.5.2	Limites de detecção (LD)	45
4.5.3	Limites de quantificação (LQ).....	46
4.5.4	Tendência / Recuperação (Exatidão).....	46
4.5.5	Precisão.....	46

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Otimização da metodologia de cromatografia por espectrometria de massas	47
5.2	Validação do método para determinação de esteviosídeo e rebaudiosídeo A	49
5.3	Amostras comerciais.....	55
6	CONCLUSÕES.....	57
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	58
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	59

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A prática enológica no Brasil é historiada desde o começo de sua colonização e a Serra Gaúcha, assim como as demais regiões vitivinícolas brasileiras, apresentam algumas características, como diversidade climática, tipo de solo e cultivares de videiras bem adaptadas, que propiciam a produção de vinhos com boa qualidade sensorial, em se tratando de cor, aroma e sabor. Estas características do vinho brasileiro fazem com que ele ganhe espaço em outros países e coloca o Brasil como o quarto maior produtor vitivinícola da América.

A elaboração de vinhos compreende várias etapas distintas, iniciando pela colheita da uva até o engarrafamento final, sendo que em determinados tipos de vinhos, pode-se prolongar ao envelhecimento dos mesmos em garrafas. Durante a elaboração, quando a uva não apresenta um grau de maturação satisfatório para atingir a graduação alcoólica prevista em lei, a legislação brasileira permite o uso de sacarose para aumentar esse teor alcoólico dos vinhos em fermentação (processo conhecido como chaptalização). A utilização da sacarose é ainda permitida na etapa que antecede o engarrafamento dos vinhos, com o propósito de adoçar o produto final. Outra prática permitida, porém, menos utilizada no Brasil, é a adição de mosto simples, concentrado ou concentrado retificado de uvas.

A adição de qualquer outro edulcorante natural ou sintético em vinhos não é permitida pela legislação brasileira, porém tem sido reportado que essa prática vem sendo utilizada para o “amaciamento” do vinho por algumas empresas nacionais e estrangeiras. Esse amaciamento do vinho é entendido como a diminuição da adstringência perceptível em boca e do amargor sentido pelas papilas gustativas que alguns vinhos ricos em taninos são capazes de provocar.

Além disso a utilização de edulcorantes pode ser vantajosa para a indústria pelo fato de não ser um produto fermentável dentro do vinho. Os edulcorantes derivados de esteviol, como o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A, têm ganho bastante destaque nos últimos anos, sendo cada vez mais pesquisados e utilizados pela indústria de alimentos e bebidas. São edulcorantes naturais, extraídos principalmente das folhas da *Stevia rebaudiana* (Bertoni), uma planta nativa da América do Sul.

Dentre os métodos analíticos utilizados para determinação de edulcorantes naturais e sintéticos em bebidas se encontra a Cromatografia Líquida, com especial destaque para a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (CL-EM/EM). Porém, atualmente ainda não existe um método de análise oficial para a determinação de

edulcorantes naturais específico para vinhos. Desde modo, o desenvolvimento de um método rápido, exato e preciso na determinação desses glicosídeos de esteviol em vinhos é de extrema importância para determinar a qualidade dos mesmos e para a proteção dos consumidores.

Por essa razão, este trabalho teve como objetivo a otimização de um método analítico para a determinação dos edulcorantes naturais esteviosídeo e rebaudiosídeo A em vinhos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Viticultura

A produção mundial de uvas ocupa uma área de aproximadamente 7,3 milhões de hectares, segundo dados da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (em inglês, International Organisation of Vine and Wine - OIV). A área destinada ao cultivo de uvas no Brasil é de 80 mil hectares, o que faz com que o país ocupe o 21º em área cultivada por videira no mundo (OIV, 2020a). A produção mundial de vinhos no ano de 2020 foi de 260 milhões de hectolitros, sendo o Brasil responsável pela elaboração de 1,9 milhões de hectolitros, o 18º maior produtor de vinhos do mundo (OIV, 2020a).

O cultivo de videiras e a produção de vinhos no Brasil iniciou-se com a chegada dos imigrantes italianos no Rio Grande do Sul, por volta de 1875, e era tido como agricultura de subsistência para consumo familiar. Com o passar dos anos, por volta de 1910, a incrementação do cultivo da uva e da produção de vinhos se tornou mais expressiva, favorecendo assim a comercialização desse produto numa escala maior. Nos anos seguintes, deu-se início a um mercado interno de vinhos, com a instalação de cooperativas e empresas de industrialização (MOURE, 1980).

Atualmente, o Rio Grande do Sul (RS) é o estado brasileiro responsável pela maior produção de uvas e vinhos no país, sendo que a extensão do território destinado a plantação de vinhedos é de aproximadamente 47 mil hectares, o que representa cerca de 62% da área vitícola nacional destinada ao cultivo de vinhas no Brasil (MELLO; MACHADO, 2020). O RS destina quase a totalidade de sua produção de uva ao processamento de vinhos de mesa (comuns), vinhos finos, espumantes e sucos. As espécies de videiras de maior importância no Brasil são as *Vitis labrusca*, e outras cultivares híbridas, originárias da América do Norte, e as *Vitis vinifera*, originárias da Ásia-Europa (MANDELLI; ALBERTO; TONIETTO, 2009).

Dentre as cultivares *Vitis labrusca* e híbridas, destacam-se as variedades Isabel, Niágara, Concorde e Bordô. Essas videiras são mais fáceis de cultivar por apresentarem maior resistência a doenças e pragas e por tolerarem melhor as condições do clima temperado úmido do RS. As cultivares de *Vitis vinifera* que ganham destaque no Brasil são Cabernet Sauvignon, Merlot e Chardonnay. Essas videiras são mais exigentes quanto ao clima, preferindo locais com baixa umidade relativa do ar e bastante insolação (KUHN et al., 1996; MANDELLI; ALBERTO; TONIETTO, 2009). Segundo dados do Instituto Brasileiro do

Vinho (IBRAVIN), no RS a produção de vinhos de mesa, provenientes de uvas do tipo *Vitis labrusca* e de outros cultivares híbridos, é de cerca de 205 milhões de litros, um valor mais expressivo em comparação ao da elaboração de vinhos finos (com uvas do tipo *Vitis vinifera*), que é de aproximadamente 43,21 milhões de litros (IBRAVIN; MAPA; SEAPI-RS, 2019a).

Apesar de o Brasil estar entre os maiores produtores de vinhos do mundo, o consumo desta bebida no país é considerado baixo quando comparado ao de países europeus e ao de alguns países da América, representando apenas 2% do consumo mundial. Porém, observa-se um crescimento no consumo da bebida e no ano de 2020 esse aumento foi 18,4% em relação a 2019, o que representou o maior acréscimo entre os países associados da OIV (OIV, 2020a).

A importação de vinhos é bastante expressiva no Brasil, apresentando uma média de 121,25 milhões de litros, o que diminui o consumo do produto local em substituição do importado. A maior importação provém do Chile (51,4% das importações), seguido por Portugal (17,8%), Argentina (15,9%), Itália (12,3%) e França (8,3%) (IBRAVIN; MAPA; SEAPI-RS, 2019b). Os vinhos importados são apreciados pelos brasileiros e preenchem boa parte do mercado interno, sendo muitas vezes mais competitivos em termos de preço do que os vinhos nacionais (MOLINARI; NETO, 2015).

2.2 Produção e legislação do vinho

O vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uvas sãs, frescas e maduras (Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988), e o seu processo de elaboração engloba várias etapas, que vão desde o recebimento de uva na vinícola até o engarrafamento final do vinho, podendo ou não passar por envelhecimento em garrafa (RIZZON; DALL'AGNOL, 2007). O esquema a seguir sumariza as etapas do processo de elaboração de vinhos tintos e brancos:

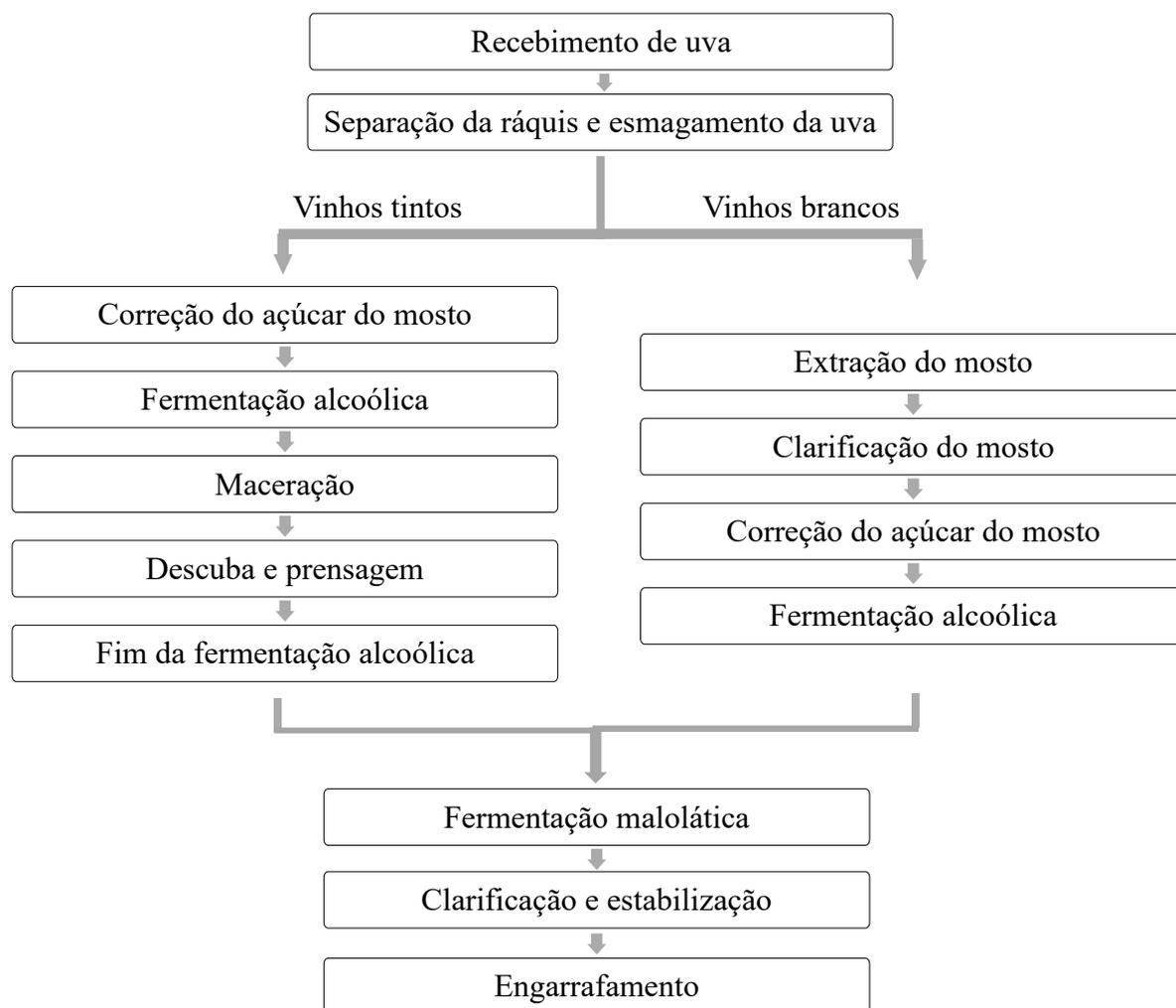


Figura 1. Esquema das etapas do processo de elaboração de vinhos tintos e brancos. Fonte: adaptado de RIZZON; DALL’AGNOL, 2007

A legislação brasileira permite aos vinicultores empregar o processo de chaptalização, uma prática de correção do açúcar no mosto, utilizada para aumentar a graduação alcoólica final dos vinhos. Essa prática enológica é empregada em países onde as condições naturais de cultivo da videira não permitem uma maturação satisfatória da uva (RIZZON; DALL’AGNOL, 2007). As correções podem ser feitas utilizando-se mosto concentrado ou sacarose dissolvida com o mosto, levando-se em consideração que a elevação máxima deve ser de um por cento em álcool, volume por volume (1%, v/v) em vinhos elaborados a partir de uvas da variedade *Vitis vinifera*, e dois por cento em álcool, volume por volume (2%, v/v) para vinhos elaborados a partir de uvas da variedade híbrida ou americana (BRASIL, 2014).

Ao final da fermentação alcoólica, o teor de açúcar no vinho deve ser menor que 4 g/L a fim de se obter uma melhor conservação e qualidade do vinho. Antes do engarrafamento

é permitido o adoçamento do vinho, o que faz com que ele seja classificado de acordo com o teor de açúcares totais final, geralmente expresso em gramas de glicose por litro. A classificação é a seguinte (BRASIL, 2014):

- Seco: o que contiver até quatro gramas de glicose por litro;
- Demi-sec ou meio-seco: o que contiver um valor superior a quatro e até vinte e cinco gramas de glicose por litro; ou
- Suave ou doce: o que contiver superior a vinte e cinco gramas de glicose por litro, sendo o limite máximo de oitenta gramas de glicose por litro estipulado para os vinhos de *Vitis vinifera*.

Para esse adoçamento (ou edulcoração), a fim de se obter vinhos meio-secos e doces, a legislação brasileira permite a adição de sacarose na forma sólida. Além desse ingrediente, a adição de mosto de uva também é uma prática autorizada pela lei brasileira (BRASIL; MAPA, 2018). Dentre os mostos de uva que podem ser adicionados no vinho estão o mosto simples, que é o produto obtido pelo esmagamento ou prensagem de uvas, podendo conter suas partes sólidas; o mosto concentrado, que é o produto da desidratação parcial do mosto simples não fermentado; e o mosto concentrado retificado, também conhecido como “açúcar de uva”, que é o mosto concentrado submetido a processos tecnológicos adequados para a eliminação dos componentes não-açucarados, tornando o mosto semelhante a um melado (BRASIL, 1988).

Os processos de importação e exportação de vinhos à nível mundial fizeram com que algumas normas e práticas enológicas fossem reconhecidas internacionalmente, a fim de garantir um controle de qualidade dos vinhos. Com a necessidade de possuir uma norma regional que favorecesse a circulação de vinhos pelos países que fazem parte do Mercado Comum do Sul (Mercosul), foi criado o “Regulamento Vitivinícola do MERCOSUL”. Em se tratando de edulcoração de vinhos, o documento cita as mesmas adições realizadas no Brasil, sendo somente a Argentina proibida de adicionar sacarose ao vinho (*Ley General de Vinos*, nº 14.878, 1959). A adição de xarope de alta concentração de frutose também é citada, não sendo permitida no Brasil e na Argentina (MERCOSUL/GMC/RES, 1996). No Chile, a legislação também proíbe a adição de sacarose e de qualquer outro edulcorante sintético ou natural, sendo somente permitida a adição de açúcar proveniente da uva (*Ley do Chile*, nº 18.455, 1985).

Os países membros da União Europeia somente podem edulcorar seus vinhos com os seguintes produtos: mosto de uvas, mosto de uvas concentrado e mosto de uvas concentrado retificado, não sendo permitida a adição de sacarose. Da mesma forma, os vinhos importados

por estes países também devem seguir às condições de edulcoração aplicáveis aos vinhos produzidos pela Comunidade Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 2009).

Sendo assim, além dos produtos citados acima que são permitidos em alguns países, a adição de qualquer outro edulcorante natural (como os extratos da estévia) ou sintético, não são permitidos e desta forma sua utilização é considerada adulteração do vinho (BRASIL, 2014).

2.3 Edulcorantes

Edulcorantes, também chamados de adoçantes, são aditivos alimentares utilizados na fabricação de alguns produtos em substituição da sacarose, designados a conferir sabor doce aos alimentos e bebidas. Essas substâncias podem ser classificadas em dois grupos: edulcorantes naturais e edulcorantes sintéticos (BRASIL, 1997). Os edulcorantes naturais geralmente são hipocalóricos, ou seja, apresentam quantidades reduzidas de calorias quando comparados à sacarose; já os edulcorantes sintéticos, por não serem metabolizados pelo organismo, não fornecem calorias ao corpo humano, ou as fornecem em quantidades muito baixas. Além disso, os edulcorantes apresentam o diferencial de ter um poder adoçante maior do que a sacarose (SHANKAR et al., 2013).

De acordo com a legislação vigente no Brasil (RDC nº 18, de 24 de março de 2008), os edulcorantes sintéticos autorizados para uso em alimentos são: sacarina, ciclamato, aspartame, acesulfame de potássio, sucralose, neotame e taumatina. Já os edulcorantes naturais permitidos para utilização em produtos são: sorbitol, manitol, isomaltitol, maltitol, lactitol, xilitol, eritritol e glicosídeos de esteviol (estévia) (ANVISA, 2008). Uma atenção especial tem-se dado aos extratos das folhas da estévia, que passou a ser conhecida pelos seus glicosídeos de esteviol (LEMUS-MONDACA et al., 2012).

Esses glicosídeos de esteviol extraídos da *Stevia rebaudiana* (Bertoni) tem atraído interesse econômico e científico, sendo amplamente pesquisados nos últimos anos, principalmente devido a sua capacidade de adoçamento, apresentando um poder adoçante 250 vezes maior do que o da sacarose, e as supostas propriedades terapêuticas dos seus extratos (LEMUS-MONDACA et al., 2012). Eles foram considerados seguros para o consumo humano em 2008, pelo Comitê Conjunto de Especialistas FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares (do inglês *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA*), que então estabeleceu uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 4 mg/kg de peso corporal por dia

(JECFA, 2016). Vários são os compostos possíveis de extração dessa planta, mas os maiores representantes desses edulcorantes naturais são o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A.

2.3.1 Edulcorantes naturais esteviosídeo e rebaudiosídeo A

Stevia rebaudiana (Bertoni) é uma planta herbácea pertencente à família Asteraceae, nativa do Paraguai, estendendo-se também pelo Brasil e Argentina (na América do Sul) (YADAV et al., 2011). Suas folhas apresentam um sabor doce e no passado já eram utilizadas pelos índios nativos da região como adoçante, principalmente em bebidas (RAMESH; SINGH; MEGEJI, 2006). A planta, classificada botanicamente em 1899 por Moisés Santiago Bertoni, recebeu o nome atual em 1905. Os registros apontam que o princípio doce presente nas folhas da planta foi isolado pela primeira vez em 1909, sendo somente purificado a fim de se obter extratos de glicosídeos de esteviol, em 1931. Na década de 1970 iniciou-se o uso comercial dos glicosídeos de esteviol e então ampliou-se o cultivo dessa planta, que hoje é encontrada principalmente na América Latina e na Ásia, sendo cultivada também na América do Norte e na Europa (LEMUS-MONDACA et al., 2012).

As folhas da planta de *Stevia rebaudiana* contém naturalmente os glicosídeos de esteviol, uma mistura complexa de aproximadamente 9 compostos (SHAH; DE JAGER; BEGLEY, 2012). Os glicosídeos são compostos que contém um grupamento não glicídico, também chamado de aglicona, ligado a moléculas de carboidrato, grupamento glicídico. A parte aglicona dos compostos presentes na planta de *S. rebaudiana* é o esteviol (Figura 2) e cada composto se diferencia principalmente na porção glicídica da molécula (LEMUS-MONDACA et al., 2012). Deste modo, os constituintes edulcorantes dessa planta são conhecidos como glicosídeos de esteviol, sendo caracterizados como diterpenos tetracíclicos por apresentarem na sua estrutura 4 unidades de isoprênicas (metil-buta-1,3-dieno, com 5 átomos de carbono).

Dentre os principais constituintes edulcorantes isolados da planta, o esteviosídeo é o que aparece em maior quantidade nas extrações (entre 5 à 10% do peso seco da planta), seguido pelo rebaudiosídeo A (2 à 4% do peso seco da planta) (GOYAL; SAMSHER; GOYAL, 2010), cujas estruturas químicas podem ser observadas na Figura 2. Outros glicosídeos de esteviol, como esteviolbiosídeo, rebaudiosídeo B, C, D e F, dulcosídeo A e rubososídeo, também são encontrados nas folhas das plantas, porém em menores quantidades (SHAH; DE JAGER; BEGLEY, 2012).

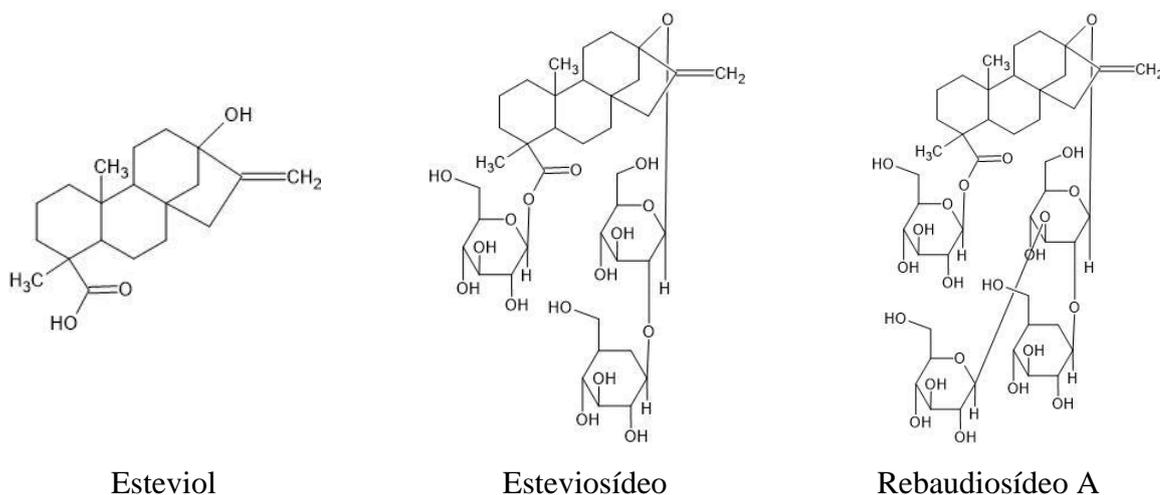


Figura 2. Estrutura química do esteviol, esteviosídeo e rebaudiosídeo A

Como o esteviosídeo é extraído em maior quantidade das folhas da planta de estévia, ele é o composto mais estudado; porém, ao ser utilizado como edulcorante, ele deixa um sabor residual na boca, ligeiramente amargo, que é sentido em menor quantidade no rebaudiosídeo A (HANSON, 2016). Quando esses edulcorantes são ingeridos, eles são hidrolisados pela microflora do intestino entre 10 e 24 h. A aglicona de esteviol é então excretada pela urina na forma de glucuronídeo de esteviol (HANSON, 2016).

As moléculas de esteviosídeo são estáveis em uma larga faixa de pH, não sofrendo degradação entre os valores de 2 a 10, em temperaturas de até 60 °C; além disso, apresentam estabilidade quando estão interagindo com ácidos orgânicos, como o ácido tartárico (KROYER, 2010). O rebaudiosídeo A é ainda mais estável que o esteviosídeo (Tabela 1), por ser uma molécula maior (MARCINEK; KREJPCIO, 2015).

Tabela 1. Informações químicas dos compostos esteviosídeo e rebaudiosídeo A.

Edulcorante	Fórmula Química	Peso Molecular (g/mol)	CAS
Esteviosídeo	$C_{38}H_{60}O_{18}$	804,88	57817-89-7
Rebaudiosídeo A	$C_{44}H_{70}O_{23}$	967,03	58543-16-1

Esses compostos edulcorantes extraídos da estévia não são fermentáveis, o que permite sua utilização em diferentes alimentos e bebidas. Tem sido reportado o seu uso ilegal em vinhos nacionais e importados, para o adoçamento dos mesmos. Deste modo, é necessário que se desenvolva métodos capazes de identificar possíveis compostos edulcorantes adicionados nos vinhos, garantindo assim os padrões de identificação desta bebida e a qualidade da mesma. No Brasil, o órgão responsável por inspecionar e fiscalizar a produção do vinho é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo encarregado por disciplinar as práticas enológicas e a utilização de aditivos e coadjuvantes de tecnologia na elaboração de vinhos e de seus derivados (ANVISA, 2016; MAPA, 2011).

2.4 Métodos de análise

Os métodos de detecção analítica devem ser capazes de assegurar o controle da qualidade dos produtos, garantindo assim a correta fiscalização por parte dos órgãos regulamentadores. Em se tratando da determinação de edulcorantes naturais em vinhos, um método que permita avaliar simultaneamente mais que um composto é importante para que essas análises de rotina sejam mais rápidas e econômicas e para determinar qual substância está sendo utilizada no adoçamento.

A técnica que tem se mostrado bastante eficiente é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial, que é capaz de determinar vários compostos diferentes em uma única análise (CHANG; YEH, 2014; LORENZO et al., 2015). Além disso, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) propicia separações e análises quantitativas em concentrações baixas, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Essa técnica utiliza pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados (fase estacionária) e uma fase móvel que é eluída sobre altas pressões (LANÇAS, 2009).

2.4.1 Métodos de separação e análise por CLAE

A separação dos diferentes analitos presentes na amostra ocorre devido aos distintos mecanismos de interação entre esses com a fase estacionária e a fase móvel. Essa interação pode ser por partição, adsorção ou troca iônica, sendo a separação por partição uma das mais frequentemente utilizadas. Essa técnica depende da polaridade dos analitos da amostra e da polaridade das fases estacionária e móvel. Geralmente essas fases apresentam polaridades

diferentes e deste modo ocorre interação dos analitos da amostra para com alguma das duas fases (estacionária ou móvel), devido a sua afinidade. Essa diferença na interação do analito com as fases determina o tempo de retenção dos diferentes compostos que passam pela coluna (SKOOG et al., 2006).

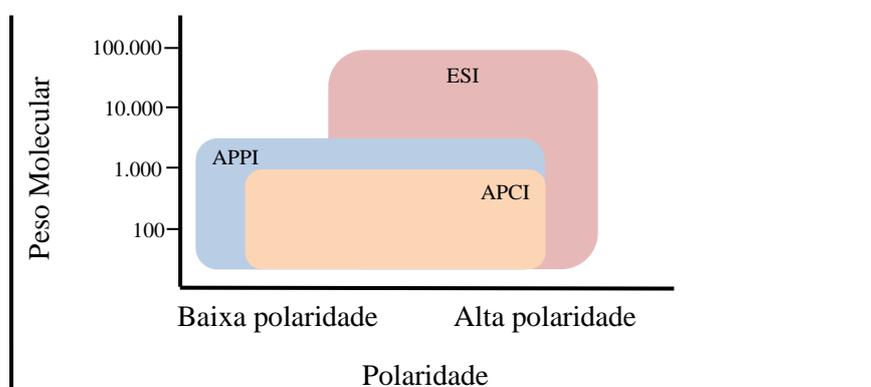
A separação por partição pode ser dividida em dois tipos distintos: a de fase normal (FN) e a de fase reversa (FR). Quando a fase estacionária é polar e a fase móvel é menos polar tem-se a FN, onde os componentes mais polares interagem preferencialmente com a fase estacionária e os com menos polaridade são os primeiros a serem eluídos da coluna, pois tem mais afinidade com a fase móvel. Contrariamente, quando a fase estacionária é menos polar (mais apolar) e a fase móvel é mais polar tem-se a FR. No modo de FR, os compostos não polares possuem uma afinidade maior com a fase estacionária, interagindo assim por um período maior de tempo com esta fase. Sendo assim, os compostos mais polares são então eluídos primeiramente por apresentarem maior afinidade com a fase móvel, que apresenta características também mais polares (SKOOG et al., 2006).

As técnicas de FR em CLAE permitem, atualmente, realizar a separação de uma grande variedade de compostos, dentre eles os edulcorantes sintéticos e naturais. Após a separação dos analitos no aparelho de cromatografia, os mesmos precisam passar por um detector que fica acoplado ao cromatógrafo e que tem a função de monitorar os solutos conforme eles são eluídos da coluna (SKOOG et al., 2006). Vários são os detectores que podem ser utilizados acoplados à CLAE. Os detectores Ultravioleta-Visíveis (UV-VIS) medem a absorção de luz dos compostos, em comprimento de onda pré-programado, compreendido entre as regiões visível e ultravioleta; esses detectores apresentam a desvantagem de serem pouco sensíveis. Os detectores por Fluorescência têm a vantagem de apresentarem alta seletividade e sensibilidade. Os detectores por Índice de Refração (IR) são conhecidos como detectores universais por apresentarem respostas para todos os analitos de uma amostra (desde que eles apresentem índices de refração diferentes da fase móvel); eles apresentam a desvantagem de serem menos sensíveis que outros detectores. Os detectores por Espectrometria de Massas (EM) são capazes de gerar informações sobre a estrutura e o peso molecular das analitos eluídos da coluna cromatográfica; ao serem acoplados à CLAE, eles têm ganhado bastante destaque por apresentarem a vantagem de permitir a separação e identificação dos compostos em uma só corrida (SETTLE, 1998).

2.4.2 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas (EM) propicia a determinação de massas dos vários elementos e moléculas, bem como auxilia na identificação dos mesmos e de suas estruturas. A combinação da EM com uma técnica de separação, como a CLAE, que recebe o nome de CLAE-EM, tornou-se uma ferramenta importante em análises mais complexas e que apresentam maior número de componentes a serem identificados e quantificados (LANÇAS, 2009). Neste sistema, os analitos que foram separados por CLAE são inseridos numa fonte de ionização, que é responsável por convertê-los em íons, podendo ocorrer tanto no modo positivo quanto no negativo, dependendo das características dos mesmos. As formas de ionização mais utilizadas no acoplamento CLAE-EM são: Ionização por Eletrospray (ESI, do inglês *Eletrospray Ionization*), seguido por Ionização Química à Pressão Atmosférica (IQPA, em inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization – APCI*) (ARDREY, 2003) e Fotoionização à Pressão Atmosférica (em inglês *Atmospheric Pressure Photo Ionization – APPI*) (WANG, 2015).

De um modo geral, quando as fontes de ionização são comparadas, a ESI é preferível para a análise de compostos bastante polares ou iônicos, com massa molecular elevada e baixa estabilidade térmica; já a IQPA apresenta melhores resultados quando os analitos apresentam pouca polaridade ou polaridade intermediária e quando não são termolábeis (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LANÇAS, 2009). A técnica de fotoionização apresenta um grande potencial para ionizar compostos que não são ionizados por ESI ou IQPA, em particular, compostos apolares (WANG, 2015). A Figura 3 mostra a aplicação das diferentes tecnologias de ionização de acordo com a polaridade e o peso molecular dos compostos alvos.



APCI: Ionização Química à Pressão Atmosférica; APPI: Fotoionização à Pressão Atmosférica; ESI: Ionização por Eletrospray

Figura 3. Aplicação de diferentes tecnologias de ionização de compostos de acordo com a polaridade e o peso molecular. Fonte: adaptado de LANÇAS, 2009

Após a ionização, os analisadores de massas separam os íons de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas, ou seja, a razão m/z . O emprego da espectrometria de massas acoplado a espectrometria de massas (EM-EM) ou espectrometria de massas sequencial (em *tandem*), implica em dois estágios: o primeiro é usado para isolar um íon de interesse e o outro é usado para estabelecer uma relação entre este íon de interesse isolado e outros íons que serão gerados a partir da sua decomposição induzida (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O analisador de massas mais comumente utilizado é o quadrupolo (Figura 4), constituído por quatro (4) hastes, geralmente de metal. Um par de barras é mantido em um potencial elétrico positivo e o outro par no negativo. Em determinada amplitude para as voltagens de corrente contínua (DC) e radiofrequência (Rf), somente os íons que apresentam determinada razão m/z atravessam o quadrupolo em uma trajetória estável; os demais íons apresentam uma trajetória instável e são eliminados pelo sistema de alto vácuo. Abaixo uma representação esquemática de um quadrupolo:

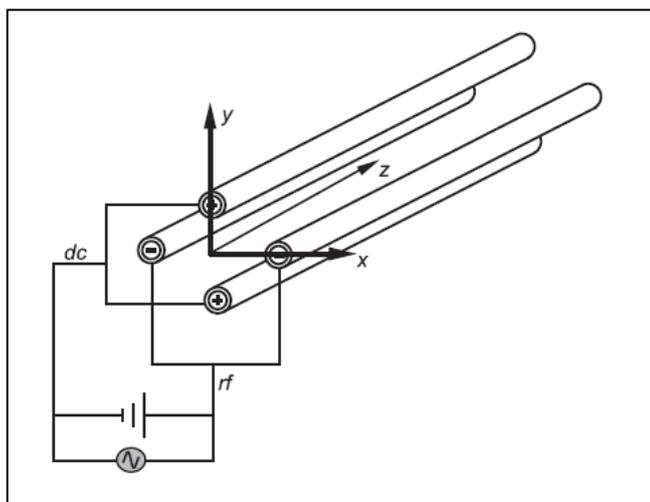


Figura 4. Esquema de um analisador do tipo quadrupolo. Fonte: CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008

Em EM-EM o analisador de massa mais utilizado é o triplo quadrupolo (Figura 5), também conhecido como QqQ, um equipamento que possui três quadrupolos em sequência. O primeiro é responsável por separar os íons de mesma razão m/z , atuando como um seletor de

íon de interesse, ou íon precursor; o segundo quadrupolo é na verdade uma cela de colisão onde o íon precursor passa por repetidas colisões com um gás inerte (como o N₂ e o Ar) sofrendo fragmentações, em um processo conhecido como dissociação induzida por colisão (em inglês, *collision-induced dissociation – CID*) e deste modo, formando os íons produto; o terceiro e último quadrupolo seleciona os íons produto de interesse e os conduz até o detector (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LOPES et al., 2011).

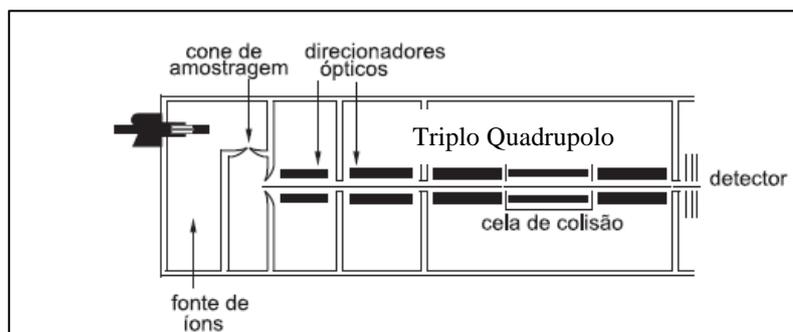


Figura 5. Esquema de um analisador do tipo triplo quadrupolo. Fonte: CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008

Esse analisador pode operar em diferentes modos de aquisição de dados: o monitoramento de íon selecionado (MIS, do inglês *selected ion monitoring – SIM*) é uma operação que seleciona e grava somente íons que apresentem valores específicos de m/z . Já no monitoramento de reação selecionada (MRS, do inglês *selected reaction monitoring – SRM*) os dados adquiridos são de um ou mais íons produto específicos produzidos por íons precursores de m/z selecionados previamente. O monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *multiple reaction monitoring – MRM*) nada mais é que a execução do MRS para múltiplos íons produto provenientes de um ou mais íons precursores (LOPES et al., 2011).

O detector indica a carga induzida ou a corrente produzida quando um íon atravessa ou atinge sua superfície. Um espectro de massas é um registro dos íons detectados em função da razão m/z (KOPPENAAL et al., 2005).

2.5 Determinação de edulcorantes em alimentos e bebidas

O crescente uso de edulcorantes em alimentos e bebidas fez com que os órgãos regulatórios necessitassem desses métodos de detecção analítica. Vários estudos já foram realizados em vinhos e em diferentes matrizes, para a determinação de edulcorantes sintéticos

e naturais, como o esteviosídeo. A Tabela 2 traz um resumo de alguns artigos que desenvolveram métodos de análise para a detecção de diferentes edulcorantes sintéticos e naturais, vários deles utilizando a CLAE-EM/EM.

Em relação a análise simultânea de esteviosídeo e rebaudiosídeo A, em matrizes de alimentos e/ou bebidas, poucos estudos foram publicados até o momento. Na maioria dos estudos em que esses edulcorantes foram analisados concomitantemente, o objetivo era avaliar a composição química da estévia, sendo geralmente utilizado os extratos das folhas dessa planta como matriz (ESPINOZA et al., 2014; MOLINA-CALLE et al., 2016).

Deste modo, realizar testes que auxiliem na validação de uma metodologia que seja capaz de identificar e quantificar esses edulcorantes simultaneamente em bebidas é de extrema importância, já que nenhum estudo foi conduzido neste âmbito.

Tabela 2. Utilização de técnicas de cromatografia líquida para análise de edulcorantes naturais e sintéticos em vinhos e outras matrizes

Substância analisada	Amostra	Método utilizado	Recuperação (%)	CV (%)	LD e LQ	Referência
Acessulfame-K, alitame, aspartame, ciclamato, neotame, neo-hesperidina di-hidrochalcona, sacarina, sucralose e dulcina	Bebidas, laticínios e produtos de peixe	CLAE-DAD - ESI-EM	84,2 a 106,7	< 10	LD: < 0,25 mg. L ⁻¹ LQ: < 2,5 mg. L ⁻¹	(ZYGLER et al., 2011)
Acessulfame-K, ciclamato, sacarina sódica, aspartame, alitame, neotame, sucralose, dulcina e Neo-hesperidina di-hidrochalcona	Alimentos industrializados como doces, iogurtes e bebidas	CLAE-ESI-EM/EM (triplo quadrupolo)	90,0 a 107,5	1,8 a 7,6	LD: 0,001 a 0,375 mg. L ⁻¹ LQ: 0,003 a 1,125 mg. L ⁻¹	(LIM et al., 2013)
Acessulfame-K, aspartame e sacarina	Vinhos com possível fraude (vinhos de mesa, engarrafados em PET, suave e demi-sec)	CLAE - DAD	92,6 a 103,3	1,9 a 2,1	LD: 1 a 9 mg. L ⁻¹ LQ: 3 a 27 mg. L ⁻¹	(GEANA; IORDACHE; IONETE, 2012)
Aspartame, acessulfame-K, sacarina	Refrigerantes (com cafeína e outros), isotônicos, energéticos; suplementos dietéticos; edulcorante de mesa	CLAE - UV/DAD – CAD ESI - EM - TOF	98,1 a 101	0,11 a 1,73	LD: 0,06 a 0,28 mg. L ⁻¹ LQ: 0,19 a 0,84 mg. L ⁻¹	(GREMBECKA et al., 2014)

<p>Edulcorantes: Acessulfame-k, ciclamato de sódio, sacarina sódica; Corante: tartrazina, amaranto vermelho, Ponceau 4R, amarelo crepúsculo e azul brilhante</p>	Vinhos tintos	CLAE-ESI-EM/EM (triplo quadrupolo)	90,6 a 104,5	2,4 a 8,3	LD: 0,01 a 0,5 $\mu\text{g. L}^{-1}$ LQ: 0,1 a 1,5 $\mu\text{g. L}^{-1}$	(MA et al., 2014)
<p>Aspartame, neo-hesperidina di-hidrochalcona, neotame, acessulfame-K, sacarina, ciclamato de sódio e sucralose</p>	Bebidas comercializadas como "sem açúcar" ou "diet", incluindo bebidas com gás (como refrigerante) e bebidas em pó.	Dois métodos: 1. CLAE - DAD 2. CL-ESI-EM/EM (triplo quadrupolo)	1. 95,0 a 108 2. 90,0 a 114,6	1. < 3,2 2. < 9,8	LQ: 1. 0,01 a 0,1 mg. L^{-1} 2. 0,05 a 5,0 $\mu\text{g. L}^{-1}$	(LORENZO et al., 2015)
<p>Advantame e neotame</p>	Alimentos industrializados	CLAE-ESI-QTRAP	76,1 a 102,7	2,6 a 12,5	LQ: < 0,01 mg. L^{-1}	(IWAKOSHI et al., 2019)
<p>Aspartame, sacarina, acessulfame-K, neotame, sucralose, ciclamato, alitame e esteviosídeo</p>	Alimentos e bebidas	CLAE-ESI-EM (quadrupolo simples)	95,4-104,3	1,45 s 7,23	LD: < 0,10 mg. L^{-1} LQ: < 0,30 mg. L^{-1}	(YANG; CHEN, 2009)
<p>Acessulfame, sacarina, ciclamato de sódio, aspartame, ácido benzóico, ácido sórbico, esteviosídeo, ácido dihidroacético e neotame</p>	Vinhos tintos: tinto seco; tinto demi-sec e tinto suave	CLAE – ESI - EM/EM (triplo quadrupolo)	78,5 a 99,2	0,46 a 6,3	LD: 0,03 a 15 $\mu\text{g. L}^{-1}$ LQ: 0,1 a 50,0 $\mu\text{g. L}^{-1}$	(CHEN et al., 2012)

Acessulfame, sacarina, cafeína, aspartame, ácido benzóico, ácido sórbico, esteviosídeo, ácido dihidroacético e neotame	Vinhos tintos	CLAE - UV	80,1 a 97,1	1,7 a 8,5	LD: 0,06 a 0,31 mg. L ⁻¹ LQ: 0,17 a 0,92 mg. L ⁻¹	(ZHAO et al., 2013)
Acessulfame-K, aspartame, ciclamato, dulcina, ácido glicirizínico, neotame, neo-hesperidina di-hidrochalcona, sacarina, sucralose, e esteviosídeo	Bebidas (vinhos, cervejas, sucos, refrigerantes, entre outras) e comidas (pimenta em conserva, doces de frutas)	CL-ESI-EM/EM (triplo quadrupolo)	75 a 120	1,7 a 15,1	LQ: 0,1 a 0,5 µg. L ⁻¹	(CHANG; YEH, 2014)
Acessulfame, alitame, aspartame, ciclamato, neotame, Neo-hesperidina di-hidrochalcona, sacarina, sucralose e esteviosídeo.	Bebidas: refrigerantes de diferentes sabores, com e sem gás, néctar e bebidas misturadas, contendo cerveja e leite.	CLAE – ESI EM/EM (triplo quadrupolo)	86 a 110	< 12	LD: 0,05 a 10 mg. L ⁻¹ LQ: 0,17 a 33 mg. L ⁻¹	(ORDOÑEZ et al., 2015)
Rebaudiosídeo A, B, C, D e F, dulcosídeo A, esteviosídeo, esteviolbiosídeo, esteviol e rubosósídeo	Bebidas com sabor de frutas e bebidas carbonatadas; produtos adoçantes em pó; chá não preparado, folhas de estêvia seca e pó de bebida sabor chocolate	CL – ESI - EM/EM (triplo quadrupolo)	--	2 a 15	LD: 0,01–0,34 mg. L ⁻¹	(SHAH; DE JAGER; BEGLEY, 2012)

Acessulfame-K, sacarina, ciclamato, aspartame, sucralose, alitame, neo-hesperidina di-hidrochalcona, neotame e cinco glicosídeos de esteviol (rebaudiosídeo A e C, esteviol, esteviolbiosídeo e esteviosídeo)	Bebidas alcoólicas e não alcoólicas	CL - ESI - EM/EM (triplo quadrupolo)	97,0 a 105,7	< 4,1	LD: 1,08 a 4,52 $\mu\text{g. L}^{-1}$ LQ: 3,23 a 13,56 $\mu\text{g. L}^{-1}$	(KUBICA; NAMIEŠNIK; WASIK, 2014)
Esteviosídeo e rebaudiosídeo A	Geleia de frutas mista, água gaseificada, goma de mascar, leite e iogurte aromatizados	CLAE - UV	99,51 a 102	0,21 a 2,58	LQ: Esteviosídeo.: 5,59 a 9,71 mg. L^{-1} Rebaudiosídeo A 3,56 a 6,11 mg. L^{-1}	(FAYAZ et al., 2018)
Acessulfame-K, sacarina, ciclamato, neotame, aspartame, alitame, esteviosídeo e sucralose	Bebidas alcoólicas	CLAE - ESI-EM/EM (triplo quadrupolo)	83,5-100,42%	< 2,33%	LOD: 0,0020 e 0,0035 mg.L^{-1}	(ZOU et al., 2018)
Aspartame, sacarina, acessulfame-K, neotame, sucralose, ciclamato, alitame e esteviosídeo	Alimentos e bebidas	CLAE-ESI-EM (quadrupolo simples)	95,4-104,3	1,45 s 7,23	LD: < 0,10 mg. L^{-1} LQ: < 0,30 mg. L^{-1}	(YANG; CHEN, 2009)

Acessulfame, sacarina, ciclamato de sódio, aspartame, ácido benzóico, ácido sórbico, esteviosídeo, ácido dihidroacético e neotame	Vinhos tintos: tinto seco; tinto demi-sec e tinto suave	CLAE – ESI - EM/EM (triplo quadropolo)	78,5 a 99,2	0,46 a 6,3	LD: 0,03 a 15 µg. L ⁻¹ LQ: 0,1 a 50,0 µg. L ⁻¹	(CHEN et al., 2012)
---	---	--	-------------	------------	---	------------------------

CAD: Detector de aerossol carregado; CLAE: Cromatografia de Alta Eficiência; DAD: Detecção por Arranjo de Diodos; EM: Espectrometria de Massas; EM/EM: Espectrometria de Massas sequencial; ESI: Ionização por Eletrospray; QTRAP: *Quadrupole Ion Trap*; TOF: Tempo de voo; UV: Ultravioleta

2.6 Validação de Metodologia

Muitos testes analíticos são realizados mundialmente para diversas finalidades e, como exemplo, pode-se citar a análise de componentes em alguma amostra, seja de um alimento ou bebida. Deste modo, mostra-se a importância do desenvolvimento e validação de uma metodologia que atenda as exigências de padronização internacional e que apresente resultados confiáveis e de correta interpretação (BRITO et al., 2003) (EURACHEM GUIDE, 2014), bem como a confirmação de que será apropriado para o uso pretendido através de evidências objetivas (Norma ABNT ISO/IEC 17025:2017).

Os parâmetros para a validação de uma metodologia têm sido definidos e descritos em diferentes organizações, nacionais e internacionais. A Organização Internacional de Padronização (ISO, do inglês *International Organization of Standardization*), em conjunto com a Comissão Eletrotécnica Internacional (IEC, do inglês *International Electrotechnical Commission*) publicaram uma norma internacional referente à padronização de métodos em laboratórios de ensaio e calibração, a norma ISO/IEC 17025. No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) traduziu esta norma para o português, ficando conhecido sob a sigla de ABNT NBR ISO/IEC 17025.

Tendo como base essa norma, a Eurachem, uma organização da Europa que tem como objetivo estabelecer um padrão de medições químicas e boas práticas de qualidade, elaborou um guia que tem a finalidade de discutir algumas questões relacionadas às melhores práticas de validação de métodos analíticos. A segunda edição do guia, intitulado “*The Fitness for Purpose of Analytical Methods – a Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*” foi publicado em 2014 e tem como objetivo ressaltar os aspectos técnicos da validação.

No Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) é o responsável pela acreditação, contando com o auxílio de uma unidade organizacional principal, a Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro (CGCRE). A CGCRE, baseada na ABNT NBR ISO/IEC 17025, reuniu todas as informações no documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, que passa por frequentes revisões para se manter atualizado, onde cita alguns parâmetros que devem ser testados na validação de um método, sendo eles: linearidade / faixa de trabalho / faixa linear de trabalho / sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, tendência/recuperação, precisão e robustez (INMETRO, 2020).

2.6.1 Linearidade / Faixa de Trabalho / Faixa Linear de Trabalho / Sensibilidade

A linearidade do método corresponde à capacidade do mesmo em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Ela pode ser determinada a partir da relação matemática entre a resposta medida e a concentração do analito, geralmente obtida por uma equação de reta, chamada de curva analítica:

$$y = a + bx \tag{1}$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico);

x = concentração;

a = coeficiente linear (interseção com o eixo y, quando x = 0);

b = coeficiente angular (inclinação da curva analítica = sensibilidade)

Os coeficientes a e b da curva analítica podem ser estimados a partir da regressão linear; já o cálculo do coeficiente de correlação “r” ou do coeficiente de determinação “r²” permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1,0 maior a certeza dos coeficientes de regressão estimados. O INMETRO recomenda valores acima de 0,90. Ainda, para verificar a eficiência da equação de regressão linear, pode ser construído e analisado o gráfico de resíduos (resíduo é a diferença que existe entre o valor calculado pela equação da reta e o valor observado para cada valor de x), que deve apresentar uma distribuição aleatória, confirmando a linearidade do método (INMETRO, 2020).

A faixa de trabalho é definida como o intervalo entre a menor e a maior concentração do analito em análise na amostra, sendo a extremidade inferior delimitada pelo limite de quantificação (LQ) e a extremidade superior por concentrações que ainda possam ser determinadas com exatidão e precisão. Já a faixa linear de trabalho é determinada como a faixa de concentração do analito que corresponde proporcionalmente à concentração verdadeira do analito (EURACHEM GUIDE, 2014; INMETRO, 2020).

A sensibilidade analítica é a mudança na resposta do instrumento em função da mudança da quantidade medida, fazendo assim com que seja possível criar a curva analítica. Deste modo, em um método sensível uma pequena variação na concentração do analito pode

causar uma grande variação no valor do sinal analítico obtido (BRITO et al., 2003; EURACHEM GUIDE, 2014).

Na Figura 6 estão representados alguns parâmetros que devem ser levados em consideração em uma validação.

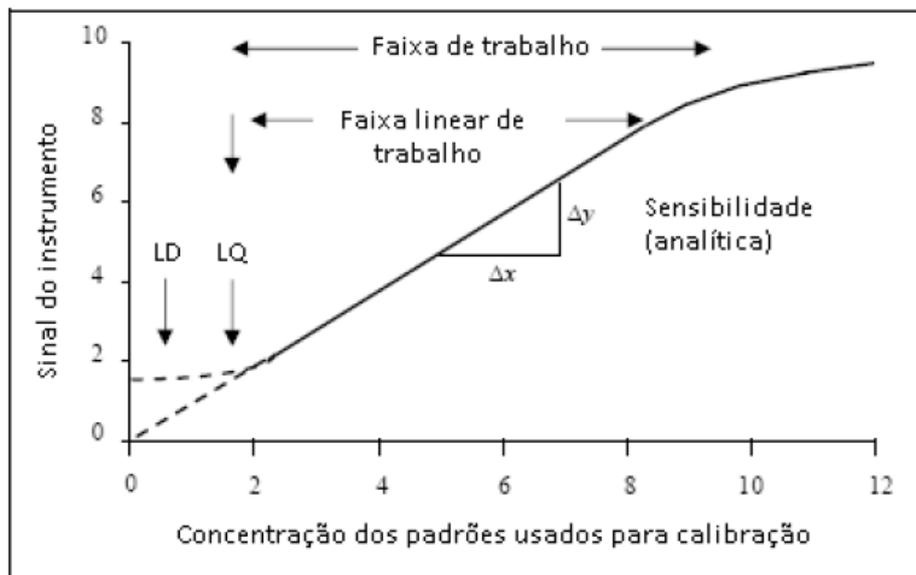


Figura 6. Exemplo de uma curva analítica com a identificação de alguns parâmetros que devem ser levados em consideração em uma validação: faixa de trabalho; faixa linear de trabalho; sensibilidade; LD e LQ. Fonte: *Eurachem Guide* 2014; tradução: INMETRO 2020

2.6.2 Limites de detecção (LD)

O Limite de Detecção (LD) é a menor concentração que pode ser detectada de um analito em questão, mas não obrigatoriamente quantificada (BRITO et al., 2003). Sua determinação é importante principalmente em faixas de concentração em nível de traços de analitos. O LD apresenta várias formas diferentes de ser verificado, como o método visual, o método da relação sinal/ruído, aquele baseado em parâmetros da curva analítica e aquele estimado por meio da curva de desvios padrão (INMETRO, 2020).

O método simplificado da estimativa do LD a partir de uma curva analítica utiliza a seguinte fórmula:

$$LD = 3,3 s / b \tag{2}$$

Onde:

s = desvio padrão da resposta do branco

b = inclinação da curva analítica

2.6.3 Limites de quantificação (LQ)

O Limite de Quantificação (LQ) é a menor concentração de um analito que pode ser quantificada em uma amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, ou seja, valores abaixo deste parâmetro não apresentam confiabilidade suficiente para serem quantificados (BRITO et al., 2003). Bem como o LD, vários são os modos de se calcular o LQ: método visual, método da relação sinal/ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica e aquele estimado por meio da curva de desvios padrão (INMETRO, 2020).

A estimativa do LQ a partir de uma curva analítica necessita da seguinte fórmula para ser aplicada:

$$LD = 10 s / b \quad (3)$$

onde:

s = desvio padrão da resposta do branco

b = inclinação da curva analítica

2.6.4 Tendência / Recuperação

A tendência em um método de análises químicas pode ser entendida como a combinação de erros sistemáticos de medição com componentes de erros aleatórios. Diversos são os meios de se avaliar a tendência em uma metodologia, sendo elas: uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais, comparação com método de referência (ou método validado) e realização de ensaios de recuperação analítica (INMETRO, 2020). A tendência pode ser calculada da seguinte maneira:

$$Tendência = \frac{\text{média dos valores observados}}{\text{valor real (esperado)}} \times 100 \quad (4)$$

A recuperação analítica está relacionada com a exatidão, sendo estabelecida como a concordância entre o resultado obtido em um ensaio experimental e o valor de referência. Deste modo, a recuperação reflete a quantidade de determinado analito, recuperado durante o

processo de análise, em relação à quantidade real presente na amostra (BRITO et al., 2003), representada pela fórmula abaixo:

$$Recuperação (\%) = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

C1: concentração do analito na amostra fortificada;

C2: concentração do analito na amostra não fortificada (0);

C3: concentração do analito adicionado à amostra fortificada

Para tal, é necessário realizar uma análise de amostras fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações (baixa, média e alta), conhecendo-se exatamente as quantidades do analito em questão.

Na Tabela 3 pode-se observar alguns critérios de aceitação para recuperação, atrelados à concentração do analito, sugerido no manual de procedimentos da *Codex Alimentarius Commission*, elaborado pelo Programa Conjunto da FAO/OMS sobre Normas Alimentares (do inglês, *Join FAO/WHO Food Standards Programme*).

Tabela 3. Critério de aceitação para recuperação atrelados ao nível de concentração do analito

Analito, %	Unidade	Recuperação média, %
100	100% (100g/100g)	98 – 102
≥ 10	≥ 10% (10g/100g)	98 – 102
≥ 1	≥ 1% (1g/100g)	97 – 103
≥ 0,1	≥ 0,1% (1mg/g)	95 – 105
0,01	100 ppm (mg/kg)	90 – 107
0,001	10 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,0001	1 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,00001	100 ppb (µg/kg)	80 – 110
0,000001	10 ppb (µg/kg)	60 – 115
0,0000001	1 ppb (µg/kg)	40 – 120

Fonte: JOIN FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME, 2019

2.6.5 Precisão

A precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra; quanto menor for a amplitude entre as medidas, maior será a precisão das mesmas (BRITO et al., 2003). Existem três formas de expressá-la: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação (CV) também conhecido como desvio padrão relativo (DPR) (BRITO et al., 2003). O CV (ou DPR) pode ser calculado da seguinte maneira (INMETRO, 2020):

$$CV = DPR = (DP / CMD) \times 100 \quad (6)$$

Onde:

DP - desvio padrão;

CMD - concentração média determinada

A repetibilidade é entendida como a condição de medições nas mesmas condições, como: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmas condições e aparelhos, em um curto espaço de tempo. O manual da Associação de Analistas Químicos Oficiais (AOAC, do inglês *Association of Official Analytical Chemists*) estabelece critérios de aceitação de CV, que geralmente estão atrelados ao nível de concentração do analito, como mostrado na Tabela 4:

Tabela 4. Critério de aceitação para repetibilidade atrelados ao nível de concentração do analito

Analito, %	Unidade	CV, %
100	100%	1,3
10	10%	1,9
1	1%	2,7
0,1	0,1%	3,7
0,01	100 ppm (mg/kg)	5,3
0,001	10 ppm (mg/kg)	7,3
0,0001	1 ppm (mg/kg)	11
0,00001	100 ppb (µg/kg)	15
0,000001	10 ppb (µg/kg)	21
0,0000001	1 ppb (µg/kg)	30

Fonte: AOAC INTERNATIONAL, 2016

Na precisão intermediária, as condições de medição dentro do laboratório são alteradas, seja por tempos ou analistas diferentes, um outro equipamento ou mesmo a combinação de fatores. A importância deste procedimento é testar se o método analítico apresentará os mesmos resultados no laboratório em questão, ainda que sofra algumas mudanças na sua execução. Na reprodutibilidade, o laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial (INMETRO, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a presença dos edulcorantes naturais esteviosídeo e rebaudiosídeo A em vinhos através do desenvolvimento e validação de um método de análise por CLAE-EM/EM.

3.2 Objetivos Específicos

Desenvolver, validar e aplicar um método analítico para a determinação de edulcorantes naturais em vinhos.

Verificar a possível presença de edulcorantes naturais esteviosídeo e rebaudiosídeo A em vinhos comerciais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A validação do método e as análises dos vinhos comerciais foram realizadas no Laboratório de Referência Enológica – Laren, da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do Estado do Rio Grande do Sul (SEAPDR), localizado na cidade de Caxias do Sul, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

4.1 Amostras, reagentes e padrões

As amostras dos vinhos utilizadas para a validação da metodologia foram elaboradas a partir de um vinho tinto genuíno experimental do banco de dados do Laren, elaborados por microvinificação, sem adição de edulcorantes ou açúcares, da variedade Merlot, da safra de 2019. Desta forma, o branco da amostra utilizado na validação da metodologia foi o vinho descrito acima.

As amostras de vinhos comerciais foram adquiridas no comércio local. Foram analisadas 24 amostras de vinhos e espumantes nacionais. As amostras incluíram vinhos de mesa tinto suave (amostras nº 1 à 4), vinho de mesa branco suave (amostra nº 5), vinho fino tinto suave (amostra nº 6), vinho fino tinto demi-sec (amostra nº 7), vinho fino branco demi-sec (amostra nº 8), vinho moscatel espumante branco (amostra nº 9), espumante natural branco demi-sec (amostra nº 10) e espumante natural branco brut (amostras nº 11 à 24).

O padrão de esteviosídeo (CAS 57817-89-7) utilizado possuía pureza $\geq 98\%$, enquanto que a pureza do padrão de rebaudiosídeo A (CAS 58543-16-1) era de $\geq 96\%$; ambos apresentaram grau HPLC e eram da marca Sigma-Aldrich. Os solventes empregados foram ácido fórmico e acetonitrila, grau HPLC, da marca Merck®.

4.2 Preparo das soluções padrão e de amostras

Todas as amostras de vinho tinto genuíno experimental, fabricadas por microvinificação, utilizadas na validação foram filtradas em membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno), com 0,8 μm de diâmetro de poro antes da injeção. As amostras de vinhos comerciais também foram filtradas em membranas de PVDF com 0,8 μm de poro e após analisadas no aparelho de CLAE-ESI-MS/MS, seguindo a metodologia validada neste trabalho.

As soluções padrão foram preparadas diluindo-se 100 mg de cada um dos edulcorantes puros no vinho tinto genuíno experimental, descrito anteriormente, até completar um volume de 100 mL, obtendo uma concentração de 1000 mg.L⁻¹ (ou 1 g.L⁻¹). Uma série de soluções de trabalho foram então preparadas através da diluição da solução padrão em no vinho tinto genuíno experimental, obtendo-se soluções com concentrações que variaram entre 5 à 150 mg.L⁻¹.

4.3 Instrumentação utilizada

As análises dos edulcorantes esteviosídeo e rebaudiosídeo A foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com um injetor automático (modelo 1260 *Infinity II Vialsampler*, serial number G7129A, da marca Agilent Technologies®) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (6470 *Triple Quadrupole LC/MS*, da marca Agilent Technologies®), com modo de ionização por *Eletrospray* (ESI). A aquisição e quantificação de dados foi feita através do software *Mass Hunter Workstation Data Acquisition* e *Mass Hunter Workstation Quantitative Analysis*, respectivamente, sendo ambos da versão B.08.00. A coluna utilizada foi uma Zorbax SB-C18 RRHT (*Rapid Resolution High T*), 1,8 µm, 2,1 x 50 mm, da marca Agilent Technologies® (ref. 827700-902).

4.4 Condições cromatográficas e espectrometria de massas

Os edulcorantes esteviosídeo e rebaudiosídeo A foram determinados através da adaptação do método CLAE-EM/EM desenvolvido por Zou e colaboradores (2018).

Foi utilizada uma coluna Zorbax SB-C18 RRHT (*Rapid Resolution High T*), 1,8 µm, 2,1 x 50 mm, da marca Agilent Technologies®. A fase móvel foi constituída de ácido fórmico 0,1 % (v/v) em água desionizada, na fase A e ácido fórmico 0,1 % (v/v) em acetonitrila, na fase B. A temperatura da coluna foi de 30 °C. O fluxo da fase móvel variou entre 0,2 e 0,4 ml.min⁻¹ e o volume de injeção da amostra foi de 2 µl. O gradiente de eluição da fase móvel consta na Tabela 5. A fonte de ionização foi empregada em polaridade negativa e os íons foram monitorados empregando o modo de escaneamento de varredura (*full scan*), usando-se o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM).

Tabela 5. Gradiente de eluição da fase móvel para separação dos edulcorantes no presente estudo.

Tempo (min.)	Fase móvel		Taxa de fluxo (mL/min)
	A (%)	B (%)	
0,00	99,0	1,0	0,2
0,10	99,0	1,0	0,2
6,00	60,0	40,0	0,2
6,10	0,1	99,9	0,4
8,00	0,1	99,9	0,4
8,10	99,0	1,0	0,2
10,00	99,0	1,0	0,2

A: água + ácido fórmico 0,1%

B: acetonitrila + ácido fórmico 0,1%

4.5 Validação do método para determinação de esteviosídeo e rebaudiosídeo A

O método para análise de edulcorantes foi validado conforme o procedimento da ISO/IEC 17025, (2017), INMETRO, (2020), AOAC INTERNATIONAL (2016), EURACHEM GUIDE (2014) e JOIN FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME (2019). Os parâmetros de validação foram realizados na seguinte ordem: linearidade / faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, tendência / recuperação (exatidão) e precisão.

4.5.1 Linearidade / Faixa de Trabalho

Para avaliar a linearidade foi construída uma curva analítica para cada edulcorante, com cinco concentrações crescentes do analito: 5,0; 10,0; 50,0; 100,0; 150,0 mg.L⁻¹. As soluções de trabalho dos edulcorantes foram adicionadas à matriz (branco da amostra). Todas as análises foram feitas em triplica. Foi estabelecido como parâmetro de avaliação $r^2 > 0,99$ (de acordo com o que consta na página 36) e foi utilizada a fórmula (1) descrita no item 2.6.1 deste trabalho (INMETRO, 2020). Através da análise das curvas analíticas construídas também foi possível determinar a faixa de trabalho linear para cada um dos edulcorantes em estudo. O cálculo dos resíduos de cada curva foi realizado através da diferença entre o valor observado e o valor calculado pela equação da reta de regressão para cada valor de x.

4.5.2 Limites de detecção (LD)

O cálculo do LD de cada um dos edulcorantes foi realizado através de sete repetições da análise da matriz (branco da amostra) com a menor concentração detectável do analito; após, foi aplicada a fórmula (2), descrita no item 2.6.2 deste trabalho.

4.5.3 Limites de quantificação (LQ)

O cálculo do LQ de cada um dos edulcorantes foi realizado através de sete repetições da análise da matriz (branco da amostra) com a menor concentração quantificável do analito; após, foi aplicada a fórmula (3), descrita no item 2.6.3

4.5.4 Tendência / Recuperação (Exatidão)

A exatidão do método para cada um dos edulcorantes foi avaliada através da tendência, expressa como recuperação analítica. Foram realizados ensaios fortificando uma matriz branco com 5 concentrações crescentes dos analitos (5,0; 10,0; 50,0; 100,0; 150,0 mg.L⁻¹), sendo que cada concentração foi analisada em triplica. Foi então calculada a tendência de cada um dos compostos analisados através da fórmula (4), descrita no item 2.6.4. Após, utilizando-se a fórmula (5), também descrita no item 2.6.4, foi calculada a taxa de recuperação de cada edulcorante. O critério de aceitação para a recuperação está baseado no manual de procedimentos da *Codex Alimentarius Commission* (2019) e constada na Tabela 3 deste trabalho.

4.5.5 Precisão

O cálculo da precisão do método para cada edulcorante foi realizado através da repetibilidade, expresso pelo desvio padrão e pelo coeficiente de variação. Foram realizados ensaios, fortificando uma matriz branco com cinco (5) concentrações crescentes dos analitos (5,0; 10,0; 50,0; 100,0; 150,0 mg.L⁻¹), sendo que cada concentração foi analisada em triplica. Após, foi calculada a repetibilidade das quantidades conhecidas de cada analito através da fórmula (6), descrita no item 2.6.5. O critério de aceitação para a repetibilidade foi baseado na AOAC (2016), descrita na Tabela 4 deste trabalho.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados a seguir estão divididos em três partes, a primeira se refere à otimização do método, a segunda à validação propriamente dita e a terceira corresponde a aplicação da metodologia desenvolvida neste trabalho através de análises de vinhos comerciais brasileiros.

5.1 Otimização da metodologia de cromatografia por espectrometria de massas

Utilizamos a metodologia analítica de Zou e colaboradores (2018), a qual foi desenvolvida para oito edulcorantes, sendo sete sintéticos e um natural, o esteviosídeo. Os autores obtiveram resultados satisfatórios empregando uma fase móvel composta de água deionizada contendo 0,1% de ácido fórmico na fase A e acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico na fase B. A mesma fase móvel também se mostrou adequada neste trabalho. Porém, algumas adaptações foram realizadas para a otimização dos resultados. O gradiente de eluição da fase móvel do método de Zou e colaboradores (2018) foi composto por 95% de fase A do tempo 0 minutos até atingir 1 minutos, quando então passou a ser de somente 10%; esta proporção se manteve até o minuto 2,50 quando então a proporção da fase A voltou a ser 95% e se manteve assim até o final da análise cromatográfica, aos 4 minutos. A taxa de eluição foi otimizada, conforme pode ser observado no esquema da figura 7, garantindo uma melhor separação dos edulcorantes.

Além disso, o fluxo da fase móvel utilizada no estudo de Zou e colaboradores (2018) foi $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ e o volume de injeção da amostra foi de $5 \mu\text{l}$. Em nosso estudo, o fluxo da fase móvel foi alterado e variou entre $0,2$ e $0,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ e o volume de injeção da amostra foi de $2 \mu\text{l}$. Essa variação foi utilizada para diminuir o tempo de corrida analítica e melhorar a resolução dos picos. Ainda, a temperatura do forno da coluna (30°C) também foi ajustada para garantir uma melhor separação dos analitos durante a corrida.

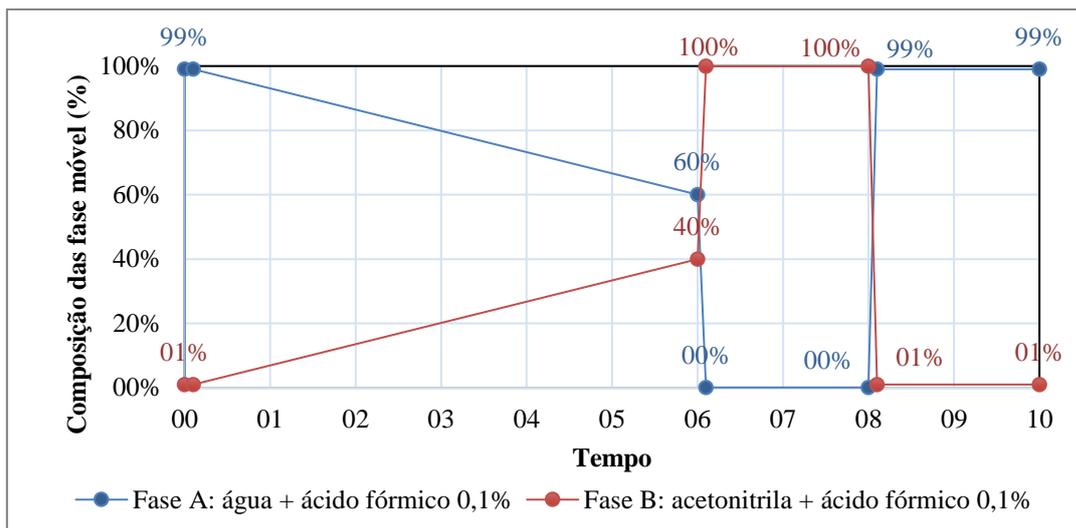


Figura 7. Esquema do gradiente de eluição das fases móveis A e B do método utilizado.

A fonte de ionização por ESI foi operada em modo negativo, seguindo relatos de outros estudos que já analisaram o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A (KUBICA; NAMIEŠNIK; WASIK, 2014; SHAH; DE JAGER; BEGLEY, 2012). Deste modo, a detecção dos íons precursores se deu a partir de íons $[M - H]^-$.

Em 2009, Yang e Chen determinaram a presença simultânea de sete edulcorantes sintéticos e um natural, o esteviosídeo, em matrizes de alimentos e bebidas (YANG; CHEN, 2009). No estudo, a ionização por ESI também foi realizada em modo negativo e eles observaram um pico espectral de massas correspondente ao íon $[M - H]^-$ do esteviosídeo ($m/z = 803$). Além disso, eles conseguiram identificar um íon fragmento correspondente ao íon $[M - \text{Glc} - H]^-$ de m/z igual a 641 e outro correspondente ao íon fragmento $[M - \text{Glc} - \text{Glc} - H]^-$ com m/z igual a 479. Da mesma forma, para a determinação do esteviosídeo em nosso estudo, o $m/z = 803$ foi escolhido como íon precursor e os $m/z = 641$ e $m/z = 479$ como íons produtos.

Kubica e colaboradores, em 2014, desenvolveram um método para análise de edulcorantes sintéticos e naturais, dentre eles os glicosídeos de esteviol (esteviosídeo e rebaudiosídeo A) (KUBICA; NAMIEŠNIK; WASIK, 2014). No estudo, somente um íon produto foi utilizado para cada íon precursor e no caso do esteviosídeo, o $m/z = 803,30$ e o $m/z = 641,15$ foram utilizados, respectivamente, como íon precursor e íon produto. Para o rebaudiosídeo A, o íon escolhido como precursor apresentava $m/z = 966,20$ e o íon produto apresentava $m/z = 804,25$. Desta forma, em nosso estudo um dos íons precursores ($m/z = 966,20$) e um dos íons produtos ($m/z = 804,25$) utilizados na detecção do rebaudiosídeo A

foram os mesmos que os escolhidos por Kubica et. al. (2014).

Porém, como os outros íons fragmentos resultantes do íon precursor $m/z = 966,20$ são iguais aos dos íons fragmentos do esteviosídeo ($m/z = 641$ e $m/z = 479$), utilizou-se mais um íon precursor para este edulcorante, o íon com $m/z = 965,4$. Desta forma escolheu-se o íon fragmento $m/z = 317,2$ como íon produto. Shah e colaboradores, em 2015, também utilizaram estes valores de m/z como íons precursores e íons produtos, obtendo resultados satisfatórios (SHAH et al., 2015).

A diferença na estrutura dos edulcorantes é importante pois resulta em diferença no tempo de retenção e na amplitude do pico, possibilitando assim a identificação de cada um dos glicosídeos de esteviol. Isso ocorre devido a utilização da espectrometria de massas sequencial que possibilita a fragmentação dos diferentes íons precursores selecionados em íons produtos distintos, que fez com que seja possível a identificação de cada composto (FAYAZ et al., 2018).

Os parâmetros de ionização, fragmentação e espectrométricos foram otimizados automaticamente pelo programa *MassHunter Optimizer*, versão B.08.00. Os resultados da otimização e dos parâmetros analisados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros de ionização e espectrométricos do esteviosídeo e do rebaudiosídeo A

Composto	Íon Precursor	Íon produto	Fragmentação	Energia de
	(m/z)	(m/z)		Colisão
Esteviosídeo	803,3	641,3	188	20
Esteviosídeo	803,3	479,3	188	60
Rebaudiosídeo A	966,2	804,2	208	60
Rebaudiosídeo A	965,4	317,2	208	60

Para a confirmação de cada íon precursor são necessários somente 2 íons produto; sendo assim, foram selecionados os íons fragmentos de maior intensidade de cada um dos compostos químicos analisados neste estudo e o modo de detecção se deu em MRM. Esse modo de monitoramento foi relatado em estudos que analisaram edulcorante naturais e/ou sintéticos em matrizes de alimentos e bebidas e os autores comprovam uma melhor sensibilidade dos resultados (CHANG; YEH, 2014; KUBICA; NAMIEŠNIK; WASIK, 2014).

5.2 Validação do método para determinação de esteviosídeo e rebaudiosídeo A

Os resultados referentes à validação do método para determinação de esteviosídeo e rebaudiosídeo A em vinhos são apresentados na Tabela 7 a seguir:

Tabela 7. Resultados da validação do método para determinação de esteviosídeo e rebaudiosídeo A em vinhos

Parâmetro	Esteviosídeo	Rebaudiosídeo A
Equação da curva de calibração	$y = 0,9936x + 0,7318$	$y = 0,9935x + 0,7422$
Linearidade (r^2)	0,9981	0,9979
LD (mg.L^{-1})	4,56	4,46
LQ (mg.L^{-1})	4,80	4,70
Recuperação (%)	97,9	97,6
Repetibilidade (CV médio) (%)	1,548	1,444

LD (Limite de Detecção); LQ (Limite de Quantificação); CV (Coeficiente de Variação)

Foi realizada uma curva analítica para cada edulcorante, com cinco concentrações crescentes de cada analito. Como o vinho é uma matriz complexa, com diversos elementos interferentes, a curva de calibração foi realizada na matriz; sendo assim, os edulcorantes foram adicionados a um vinho tinto genuíno experimental, elaborado por microvinificação, como descrito anteriormente, e outros parâmetros, como linearidade, recuperação (exatidão) e precisão também foram estudadas na matriz (INMETRO, 2020).

O método mostrou-se linear nas seguintes faixas: no intervalo de concentração de 4,80 a 150,0 mg.L^{-1} para o esteviosídeo e no intervalo de concentração de 4,70 a 150,0 mg.L^{-1} para o rebaudiosídeo A.

A equivalência do poder adoçante de cada edulcorante é feita em relação à sacarose e os edulcorantes sintéticos aspartame, acessulfame de potássio e sacarina possuem, respectivamente, um poder de adoçamento de 220, 200 e 300 vezes maior que a sacarose. Os glicosídeos de esteviol são 250 vezes mais doces que a sacarose, valor que se aproxima dos edulcorantes sintéticos citados (FITCH; KEIM, 2012).

Deste modo, Amer e colaboradores, em 2017, determinaram a presença dos edulcorantes sintéticos aspartame e acessulfame de potássio em diferentes categorias de alimentos e bebidas. As amostras de refrigerantes analisadas que continham aspartame apresentaram uma média de 237,4 mg.kg^{-1} deste edulcorante; já a média do acessulfame de potássio encontrado nessas amostras de refrigerante foi de 76,8 mg.kg^{-1} (AMER et al., 2017).

Grembecka e colaboradores, em 2014, desenvolveram um método para análise simultânea de alguns aditivos alimentares, entre eles a sacarina, em matrizes de bebidas não alcoólicas. Nas amostras de refrigerante analisadas, a média encontrada de sacarina foi de 67,4 mg/L⁻¹ (GREMBECKA et al., 2014). Sendo assim, as faixas de trabalho utilizadas no nosso estudo contemplam os valores de concentração média desses edulcorantes sintéticos utilizados no adoçamento de bebidas e que apresentam um poder adoçante semelhante aos glicosídeos de esteviol.

No estudo de Kubica e colaboradores (2014), eles analisaram a presença de alguns edulcorantes sintéticos e dos glicosídeos de esteviol em bebidas não alcoólicas carbonatadas e não carbonatadas e em bebidas alcoólicas carbonatadas. Nas amostras em que os glicosídeos de esteviol foram detectadas, a sua concentração variou de 11,12 à 76,44 mg.L⁻¹ (KUBICA; NAMIEŠNIK; WASIK, 2014). Portanto, o intervalo de concentração adotado como faixa de trabalho no nosso estudo compreende os valores de adição, encontrados na literatura, dos glicosídeos de esteviol em amostras de bebidas.

Ao analisar a linearidade, pode-se perceber que o r² apresentou valores de 0,9981 para o esteviosídeo e de 0,9979 para o rebaudiosídeo A, respectivamente (Figuras 8 e 9). Os valores encontrados foram superiores ao critério de aceitação estabelecido pela ANVISA, no qual r² deve ser maior que 0,99, indicando que o método se confirmou linear (ANVISA, 2003).

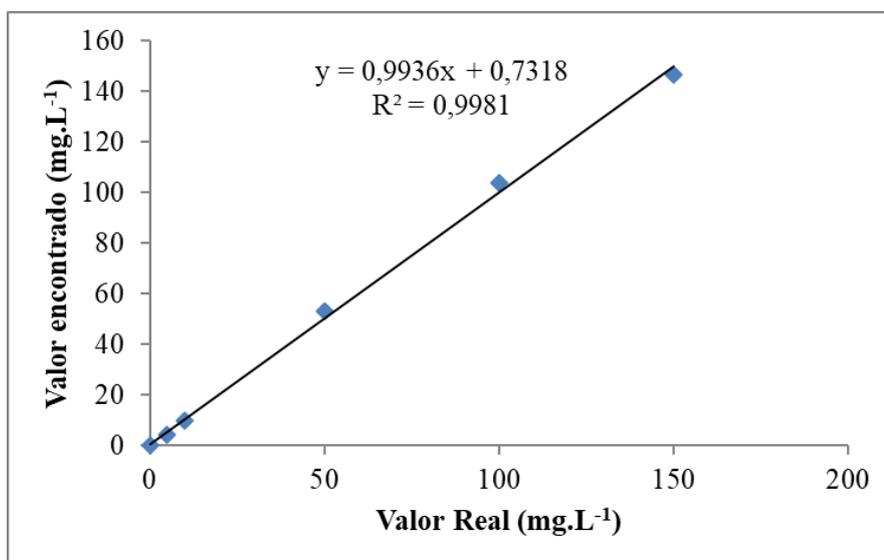


Figura 8. Curva analítica do esteviosídeo

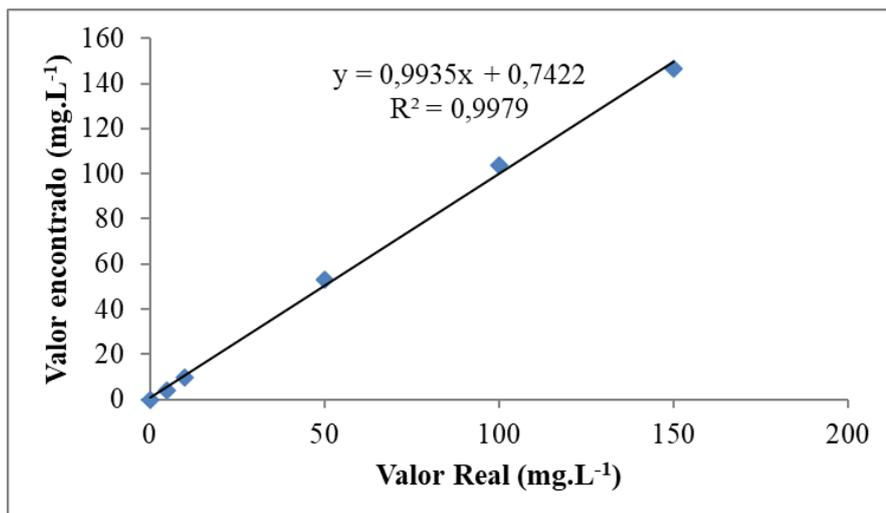


Figura 9. Curva analítica do rebaudiosídeo A

Na análise dos resíduos das regressões lineares (Figuras 10 e 11) observa-se que o perfil dos resíduos, tanto para o esteviosídeo quanto para o rebaudiosídeo A se mostraram aleatórios, o que significa ausência de erros sistemáticos.



Figura 10. Distribuição dos resíduos de acordo com a concentração de esteviosídeo

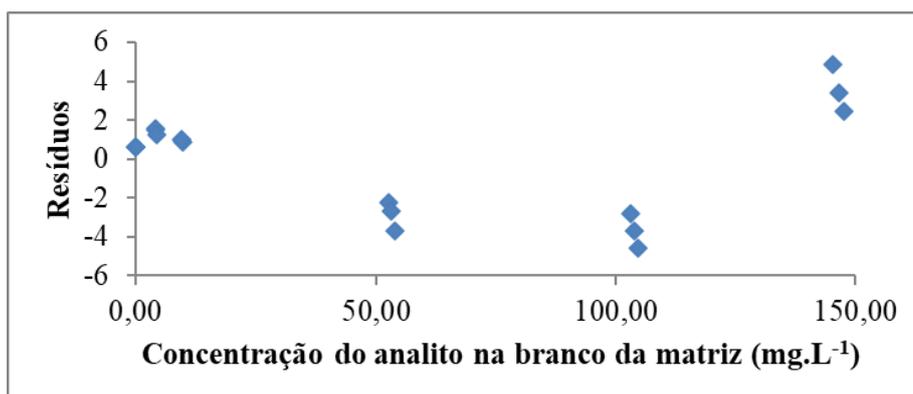


Figura 11. Distribuição dos resíduos de acordo com a concentração de rebaudiosídeo A

Para o esteviosídeo, o LD calculado foi de 4,56 mg.L⁻¹ e o LQ foi de 4,80 mg.L⁻¹. O rebaudiosídeo A apresentou valores de 4,46 mg.L⁻¹ para LD e 4,70 mg.L⁻¹ para o LQ. FAYAZ e colaboradores, em 2018 analisaram o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A em diferentes matrizes de alimento, como geleia de frutas mista, água gaseificada, goma de mascar, leite e iogurte aromatizados. Os valores de LD nessas matrizes, para o esteviosídeo, variaram de 1,68 a 2,91 mg.L⁻¹ e os valores de LQ foram de 5,60 a 9,71 mg.L⁻¹. Para o rebaudiosídeo A os valores de LD variaram entre 1,06 a 1,83 mg.L⁻¹ e os valores de LQ ficaram entre 3,53 a 6,11 mg.L⁻¹ (FAYAZ et al., 2018). Apesar de o LD ser mais baixo no estudo de FAYAZ e colaboradores (2018), os valores de LQ se aproximam aos encontrados em nosso trabalho.

Os resultados da recuperação obtidos a partir da fortificação da matriz com cada edulcorante em soluções de cinco diferentes concentrações, analisadas em triplicata, encontram-se nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Recuperações médias obtidas para as soluções de diferentes concentrações do esteviosídeo

Valor real (mg.L⁻¹)	Média dos valores encontrados (mg.L⁻¹)	Recuperação (%)
0	0,00	-
5	4,23	84,6
10	9,74	97,4
50	53,12	106,2
100	103,72	103,7
150	146,56	97,7
	Média (%)	97,9

Tabela 9. Recuperações médias obtidas para as soluções de diferentes concentrações do rebaudiosídeo A

Valor real (mg.L⁻¹)	Média dos valores encontrados (mg.L⁻¹)	Recuperação (%)
0	0,00	-
5	4,19	83,7
10	9,65	96,5
50	53,29	106,5
100	103,88	103,8

150	146,41	97,6
	Média (%)	97,6

Os resultados estão expressos em porcentagem e mostram que a recuperação média dos valores ficou entre 84,6 e 106,2%, no caso do esteviosídeo, e entre 83,7 e 106,5 no rebaudiosídeo A. De acordo com o critério de aceitação da FAO/OMS, descrito na Tabela 3, no item 2.6.4, na concentração de 5,0 mg.L⁻¹ a recuperação média deve ser de 80 a 110%, para as concentrações de 10 e 50 mg.L⁻¹ este valor deve permanecer entre 90 e 107% e nas concentrações de 100 e 150 mg.L⁻¹ a recuperação deve apresentar valores entre 95 e 105%. Deste modo, pode-se observar que os valores encontrados na recuperação dos edulcorantes em estudo apresentaram valores congruentes com a referência (JOIN FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME, 2019).

Os resultados da precisão, obtidos através do teste de repetibilidade, onde a matriz foi fortificada com cada edulcorante com cinco diferentes concentrações e analisadas cada uma três vezes, encontram-se nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Precisão, expressa em CV ou DPR do esteviosídeo

Valor real (mg.L ⁻¹)	Média dos valores encontrados (mg.L ⁻¹)	CV ou DPR (%)
0	0,00	-
5	4,23	3,08
10	9,74	1,45
50	53,12	1,42
100	103,72	1,06
150	146,56	0,71
	Média (%)	1,54

CV (Coeficiente de Variação); DPR (Desvio Padrão Relativo)

Tabela 11. Precisão, expressa em CV ou DPR do rebaudiosídeo A

Valor real (mg.L ⁻¹)	Média dos valores encontrados (mg.L ⁻¹)	CV ou DPR (%)
0	0,00	-
5	4,19	3,48
10	9,65	0,65
50	53,29	1,39

100	103,88	0,85
150	146,41	0,82
Média (%)		1,44

CV (Coeficiente de Variação); DPR (Desvio Padrão Relativo)

Os resultados de precisão estão expressos em porcentagem de coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR) e para ambos os edulcorantes os valores de CV foram menores que os estabelecidos pela AOAC, em todas as concentrações analisadas. Nessa referência, descrita na tabela 4 do item 2.6.5 para as concentrações de 5 mg.L⁻¹, o CV máximo deve ser de até 7,3%; para as concentrações entre 10 e 50 mg.L⁻¹, o valor de CV máximo deve ser de 5,3% ; e para as concentrações de 100 e 150 mg.L⁻¹, o valor máximo de CV sugerido é de 3,7%. Desta forma, os valores médios de CV do esteviosídeo (1,54%) e do rebaudiosídeo A (1,44%) demonstram a precisão do método.

5.3 Amostras comerciais

Os resultados da análise dos edulcorantes esteviosídeo e rebaudiosídeo A, em amostras comerciais de vinhos nacionais, estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12. Detecção dos edulcorantes esteviosídeo e rebaudiosídeo A em amostras comerciais

Cidade do Produto	Nº da amostra	Produto	Rebaudiosídeo A (mg/L)	Esteviosídeo (mg/L)
FC	1	Vinho de Mesa Tinto Suave	< LQ	< LQ
CS	2	Vinho de Mesa Tinto Suave	< LQ	< LQ
FC	3	Vinho de Mesa Tinto Suave	< LQ	< LQ
FC	4	Vinho de Mesa Tinto Suave	< LQ	< LQ
FC	5	Vinho de Mesa Branco Suave	< LQ	< LQ
BG	6	Vinho Fino Tinto Suave	< LQ	< LQ
BG	7	Vinho Fino Tinto Demi-sec	< LQ	< LQ
BG	8	Vinho Fino Branco Demi-sec	< LQ	< LQ
BG	9	Vinho Moscatel Espumante Branco	< LQ	< LQ
BG	10	Espumante Natural Branco Demi-sec	< LQ	< LQ
BG	11	Espumante Natural Branco Brut	< LQ	< LQ
BG	12	Espumante Natural Branco Brut	< LQ	< LQ
BG	13	Espumante Natural Branco Brut	< LQ	< LQ
BG	14	Espumante Natural Branco Brut	< LQ	< LQ

BG	15	Espumante Natural Branco Brut	< LQ	< LQ
BG	16	Espumante Natural Branco Brut	< LQ	< LQ
BG	17	Espumante Natural Branco Brut	< LQ	< LQ
BG	18	Espumante Natural Branco Brut	< LQ	< LQ
BG	19	Espumante Natural Branco Brut	< LQ	< LQ
BG	20	Espumante Natural Branco Brut	< LQ	< LQ
BG	21	Espumante Natural Branco Brut	< LQ	< LQ
AF	22	Espumante Natural Branco Brut	< LQ	< LQ
BG	23	Espumante Natural Branco Brut	< LQ	< LQ
BG	24	Espumante Natural Branco Brut	< LQ	< LQ

AF (Alto Feliz); BG (Bento Gonçalves); CS (Campestre da Serra); FC (Flores da Cunha); LQ (Limite de Qualificação);

Nas amostras analisadas não foram detectados os edulcorantes esteviosídeo e rebaudiosídeo A em nenhum vinho ou espumante, todos apresentando valores menores que os limites de quantificação descritos neste trabalho. No Código Internacional de Práticas Enológicas (publicado pela OIV), o processo de edulcoração de vinhos com adoçantes naturais ou sintéticos não é uma prática descrita (OIV, 2020b), o que torna o seu uso proibido na maioria dos países produtores de vinhos, incluindo o Brasil. Os resultados encontrados demonstram que os vinhos nacionais analisados estão de acordo com a legislação vigente no país.

6 CONCLUSÕES

Um método simples e rápido foi desenvolvido pela primeira vez para a determinação simultânea dos edulcorantes esteviosídeo e rebaudiosídeo A, em matrizes de vinhos, utilizando a CLAE-EM/EM.

Os resultados obtidos foram satisfatórios para os parâmetros da linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e repetibilidade, para ambos analitos em análise.

A presença dos edulcorantes naturais esteviosídeo e rebaudiosídeo A não foi detectada em nenhum dos vinhos comerciais brasileiros avaliados neste trabalho.

O método proposto mostrou-se eficaz para detectar a adição dos edulcorante esteviosídeo e rebaudiosídeo A e pode ser proposto ao MAPA e a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) como método oficial de análise para detecção desses edulcorantes adicionados de forma ilegal ao vinho.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras propõe-se analisar um maior número de amostras comerciais de vinhos nacionais e importados.

Propõe-se desenvolver uma metodologia para a determinação de outros edulcorantes naturais em matriz de vinho.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AMER, R. T. et al. Determination of Synthetic Sweeteners in Some Food Commodities using Reversed Phase HPLC. **New York Science Journal**, v. 10, n. November, p. 121–129, 2017.

ANVISA. Resolução **RDC nº 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. . 2003.

ANVISA. Resolução **RDC nº 18, de 24 de março de 2008**. Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos. Diário Oficial da União. 2008.

ANVISA. Resolução **RDC Nº 123 DE 04 DE NOVEMBRO de 2016**. Dispõe sobre os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em vinhos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2016.

AOAC INTERNATIONAL. Official methods of analysis of AOAC International, in **Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F)**. 2016.

ARDREY, R. E. Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction. **Analytical Techniques in the Sciences**. 2003.

ARGENTINA. **Ley nº 14.878 Ley General de Vinos**. 1959, p. 1689–1699.

BRASIL. **Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988**. Dispões sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Diário Oficial da União. 1988.

BRASIL. **Decreto nº 8.198, de 20 de fevereiro de 2014** - Regulamenta a Lei no 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. Presidência da República. 2014.

BRASIL; MAPA. **Instrução normativa nº 14, de 8 de fevereiro de 2018**. Estabelece a complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho e derivados da uva e do vinho comercializados em todo o território nacional, produzidos no Brasil e importados. 2018.

BRASIL. SVS/MS. **Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997**. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. Diário Oficial da União, 28 de Out. 1997.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

CHANG, C. S.; YEH, T. S. Detection of 10 sweeteners in various foods by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 3, p. 318–328, 2014.

CHEN, X. H. et al. Application of dispersive solid-phase extraction and ultra-fast liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry in food additive residue analysis of red wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1263, p. 34–42, 2012.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

CHILE; MINISTERIO DE AGRICULTURA. **Ley 18.455**. Fija normas sobre produccion, elaboracion y comercializacion de alcoholes etilicos, bebidas alcoholicas y vinagres, y degora libro I de la Ley N° 17.105. 1985.

ESPINOZA, M. I. et al. Identification, quantification, and sensory characterization of steviol glycosides from differently processed stevia rebaudiana commercial extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 49, p. 11797–11804, 2014.

EURACHEM GUIDE. The Fitness for Purpose of Analytical Methods - a Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. **European Journal of Pharmacology**, 2014.

FAYAZ, S. et al. Estimation of steviol glycosides in food matrices by high performance liquid chromatography. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 8, p. 3325–3334, 2018.

FITCH, C.; KEIM, K. S. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 5, p. 739–758, 2012.

GEANA, E.-I.; IORDACHE, A.-M.; IONETE, R. E. Simultaneous determination of artificial sweeteners in possible counterfeited wines, using high performance liquid chromatography with DAD detection. **Ovidius University Annals of Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 77–81, 2012.

GOYAL, S. K.; SAMSHER; GOYAL, R. K. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: A review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, n. 1, p. 1–10, 2010.

GREMBECKA, M. et al. Simultaneous determination of aspartame, acesulfame-K, saccharin, citric acid and sodium benzoate in various food products using HPLC-CAD-UV/DAD. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 3, p. 357–365, 2014.

HANSON, J. R. From Caá-ehé to a commercial sweetener - the diterpenoid glycosides of *Stevia rebaudiana*. **Science Progress**, v. 99, n. 4, p. 413–419, 2016.

IBRAVIN; MAPA; SEAPI-RS. **Cadastro vinícola: elaboração de vinhos e derivados no RS**. 2019a.

IBRAVIN; MAPA; SEAPI-RS. **Cadastro vinícola: importações brasileiras de vinhos e espumantes**. 2019b.

INMETRO. Doq-Cgcre-008 - Orientação Sobre Validação De Métodos Analíticos. **Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia**, 2020.

ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. **International Organization for Standardization/International Electrotechnical Commission**, v. 3, 2017.

IWAKOSHI, K. et al. Development of a highly sensitive liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the qualitative and quantitative analysis of high-intensity sweeteners in processed foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1592, p. 64–70, 2019.

JECFA. **Compendium of Food Additive Specifications. Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives**. 2016.

KOPPENAAL, D. W. et al. MS detectors. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 21, 2005.

KROYER, G. Stevioside and Stevia-sweetener in food: Application, stability and interaction with food ingredients. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 5, n. 2, p. 225–229, 2010.

KUBICA, P.; NAMIEŚNIK, J.; WASIK, A. 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**, v. 407, n. 5, p. 1505–1512, 2014.

KUHN, G. B. et al. **O cultivo da videira - informações básicas**. EMBRAPA. Bento Gonçalves: 1996.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2009.

LEMUS-MONDACA, R. et al. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1121–1132, 2012.

LIM, H. S. et al. HPLC-MS/MS analysis of 9 artificial sweeteners in imported foods. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, p. 233–240, 2013.

LOPES, N. P. et al. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875–1887, 2011.

LORENZO, R. A. et al. Artificial sweeteners in beverages by ultra performance liquid chromatography with photodiode array and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Control**, v. 47, p. 43–52, 2015.

MA, K. et al. Rapid and Sensitive Method for the Determination of Eight Food Additives in Red Wine by Ultra-performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 1, p. 203–212, 2014.

MANDELLI, F.; ALBERTO, M.; TONIETTO, J. Uva em clima temperado. In: **Agrometeorologia dos cultivos: o fator meteorológico na produção agrícola**. 1^a ed. Brasília: 2009. p. 503–515.

MAPA. **Instrução Normativa Nº 49, de 1º de novembro de 2011**. Estabelecer as PRÁTICAS ENOLÓGICAS LÍCITAS para a elaboração de vinho e mosto de uva e para a uva destinada à industrialização. 2011.

MARCINEK, K.; KREJPCIO, Z. Stevia Rebaudiana bertonii - chemical composition and functional properties. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 14, n. 2, p. 145–152, 2015.

MELLO, L. M. R. DE; MACHADO, C. A. E. Vitivinicultura brasileira: panorama 2019. **Embrapa Uva e Vinho-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, v. 214, p. 1–21, 2020.

MERCOSUL/GMC/RES. **Regulamento vitivinícola do Mercosul**. 1996.

MOLINA-CALLE, M. et al. Development and application of a quantitative method based on LC-QqQ MS/MS for determination of steviol glycosides in Stevia leaves. **Talanta**, v. 154, p. 263–269, 2016.

MOLINARI, G.; NETO, J. P. J. Perspectivas do mercado da vitivinicultura e desafios para os vinhos brasileiros. **Anais do Salão de Pós-Graduação da UNIPAMPA**, v. 7, n. 4, 2015.

MOURE, Telmo. A inserção da economia imigrante na economia gaúcha. In: Dacanal, José

H. e Gonzaga, Sérgio (org.). RS: Imigração e Colonização. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1980.

OIV. State of the world vitivincultural sector in 2020. **International Organisation of Vine and Wine**, n. April, p. 1–15, 2020a.

OIV. **International Code of Oenological Practices**. Paris, França: 2020b.

ORDOÑEZ, E. Y. et al. Determination of artificial sweeteners in beverages with green mobile phases and high temperature liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 169, p. 162–168, 2015.

RAMESH, K.; SINGH, V.; MEGEJI, N. W. Cultivation of Stevia [Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni]: A Comprehensive Review. **Advances in Agronomy**, v. 89, n. 05, p. 137–177, 2006.

RIZZON, L. A.; DALL'AGNOL, I. Vinho Tinto - Coleção Agroindústria Familiar. **Embrapa Uva e Vinho**. 2007.

SETTLE, F. **Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry**. 1998.

SHAH, R. et al. A novel method for the simultaneous determination of 14 sweeteners of regulatory interest using UHPLC-MS/MS. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 32, n. 2, p. 141–151, 2015.

SHAH, R.; DE JAGER, L. S.; BEGLEY, T. H. Simultaneous determination of steviol and steviol glycosides by liquid chromatography-mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 29, n. 12, p. 1861–1871, 2012.

SHANKAR, P. et al. Non-nutritive sweeteners : Review and update. **Nutrition**, p. 1–7, 2013.

SKOOG et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª ed. 2006.

UNIÃO EUROPEIA. **Regulamento (CE) N° 606/2009 da Comissão de 10 de Julho de 2009**

que estabelece regras de execução do Regulamento (CE) n.º. 479/2008 do Conselho no que respeita às categorias de produtos vitivinícolas, às práticas enológicas e às restrições que lhes são aplicáveis. 2009.

WANG, C. The Ionization Technology of LC-MS, Advantages of APPI on Detection of PPCPs and Hormones. **Austin Chromatography**, v. 2, n. 2, p. 1–3, 2015.

YADAV, A. K. et al. A review on the improvement of Stevia [Stevia rebaudiana (Bertoni)]. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 91, n. 2067, p. 1–27, 2011.

YANG, D. J.; CHEN, B. Simultaneous determination of nonnutritive sweeteners in foods by HPLC/ESI-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 8, p. 3022–3027, 2009.

ZHAO, Y.-G. et al. Analysis of nine food additives in wine by dispersive solid-phase extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 350–358, 2013.

ZOU, X. et al. Determination of eight high-intensity sweeteners in alcohol beverages by HPLC-MS/MS. **American Institute of Physics**, v. 030011, p. 1–6, 2018.

ZYGLER, A. et al. Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 7, p. 2159–2172, 2011.