

## 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

# CIÊNCIA DE ALIMENTOS

### VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE UM MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE ASPARTAME EM ALIMENTOS DIET

<sup>1</sup> Deborah Barbosa Vahia de Abreu (IC-UNIRIO); <sup>1</sup> Orlando M. G. de Moraes (orientador).

1 – Departamento de Tecnologia de Alimentos; Escola de Nutrição; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Apoio Financeiro: UNIRIO

Palavras-chave: Aspartame; Método Espectrofotométrico; Validação.

#### INTRODUÇÃO

O aspartame ou éster metílico da N – L –  $\alpha$  – aspartil – L – fenilalanina foi sintetizado acidentalmente em 1965, quando J. M. Schlatter, tentando encontrar um inibidor para a gastrina, com o objetivo de utilizá-lo no tratamento de úlcera, aqueceu o tetrapeptídeo terminal da gastrina (Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>) com metanol (MAZUR; SCHLATTER; GOLDKAMP, 1969). Sua liberação pelo Food and Drug Administration (FDA) só ocorreu em 1981, após a realização de diversos estudos toxicológicos. Este dipeptídeo de baixa caloria é branco, cristalino e inodoro, com uma doçura de 180 a 200 vezes a da sacarose e apresenta valor calórico idêntico ao da sacarose (4 kcal/g) (O'BRIEN; GELARDI, 1981). É atualmente o edulcorante artificial de maior comercialização no mundo e no Brasil. Vem sendo empregado em diversos produtos dietéticos tais como adoçantes de mesa, refrigerantes, iogurtes, refrescos em pó, gelatinas, pudins, chás e sorvetes. Atualmente, seu consumo nos produtos diet e light tem alcançado grande êxito devido suas características semelhantes às da sacarose e por contribuir para a redução do valor energético dos alimentos (SAMUNDSEN, 1985; CARDELLO; SILVA; DAMÁSIO, 2001).

O aspartame não pode ser consumido por portadores de fenilcetonúria (PKU), tanto doentes (homozigóticos) como portadores assintomáticos (heterozigóticos). Indivíduos com forma homo-zigótica da PKU têm uma deficiência da enzima hepática fenilalanina-hidroxilase e são incapazes de converter a fenilalanina (aminoácido essencial) em tirosina (aminoácido não essencial), o que resulta no acúmulo de fenilalanina, potencialmente tóxica para o tecido cerebral. Sem tratamento, esses indivíduos apresentam atraso mental, microcefalia, mielinização deficiente dos nervos, reflexos hiperativos e menor expectativa de vida. Com o diagnóstico precoce e abstenção da fenilalanina, esses indivíduos terão vida normal (TORLONI et al, 2007).

Em 20 anos, mais de 200 estudos foram realizados em animais e seres humanos e nenhuma conclusão colocou em dúvida a segurança do produto para uso alimentar. Apesar disso, existem dúvidas quanto aos possíveis danos com relação à saúde humana pela ingestão do aspartame. A existência de controvérsias sobre os efeitos causados pelo consumo do aspartame requer uma reflexão crítica e coerente, que tome como base os estudos constantes da literatura nacional e internacional, que tenha por objetivo ampliar os conhecimentos toxicológicos sobre o aspartame.

Baseados nos estudos toxicológicos realizados nos Estados Unidos, obtidos com animais (geralmente realizados com roedores durante toda a vida dos mesmos), o Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização Mundial da Saúde<sup>7</sup>, estabeleceu que a IDA (Ingestão Diária Aceitável) de aspartame seria de até 40 mg/kg/dia, valor que também corresponde a IDA do aspartame em nosso país. Agências de regulamentação em mais de 100 países aprovaram o aspartame para o seu uso como edulcorante.

No Brasil o uso do aspartame está regulamentado através da RDC Nº 18, de 24 de março de 2008, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, onde encontra-se descrito os respectivos limites máximos de uso de aditivos edulcorantes para alimentos (g/100g ou g/100ml), sendo eles para aspartame: alimentos e bebidas para controle de peso 0,075; alimentos e bebidas para dietas com ingestão controlada de açúcares 0,075; alimentos e bebidas para dietas com restrição de açúcares 0,075; alimentos e bebidas com informação nutricional complementar com substituição total de açúcares 0,075 e alimentos e bebidas com informação nutricional complementar com substituição parcial de açúcares 0,056. (BRASIL, 2008)

As dúvidas sobre os efeitos, para a saúde humana, causados pelo consumo do aspartame, bem como o fato de existir no Brasil uma legislação que estabelece limites máximos para o emprego deste edulcorante em alimentos, faz com que seja importante a existência de métodos exatos, precisos, simples, rápidos e de baixo custo para determinar quantitativamente este edulcorante em alimentos. Existem diversas técnicas cromatográficas para a determinação de aspartame em diferentes produtos dietéticos (TYLER, T. A., 1984; WEBB, N. G.; BECKMAN D. D., 1984; TSANG, W. S.; CLARKE M. A.; PARRISH F. W, 1985; VERZELLA, G.; BAGNASCO, G.; MANGIA, A., 1985; ISSAQ, H. J, 1986; DI PIETRA, A. M. et al, 1990), mas são, em geral, trabalhosos e de alto custo.

#### OBJETIVO

Em vista dos problemas relacionados ao uso do aspartame e devido a existir no Brasil uma legislação que limita a quantidade dessa substância permitida por tipo de alimento, pretende-se, com a execução desse projeto, validar o método espectrofotométrico proposto por Vieira e Fatibello Filho, ou seja, avaliar a exatidão e a precisão do mesmo, assim como seu desempenho quando aplicado a alimentos diet.

#### METODOLOGIA

A pesquisa baseou-se na metodologia descrita por Vieira e Fatibello Filho e será constituída das seguintes etapas: confirmação do comprimento de onda onde ocorre a absorção máxima, verificação se a relação entre a absorbância e a concentração é linear, estudo da repetibilidade e exatidão do método, das quais, até o momento, foram realizadas as duas primeiras etapas.

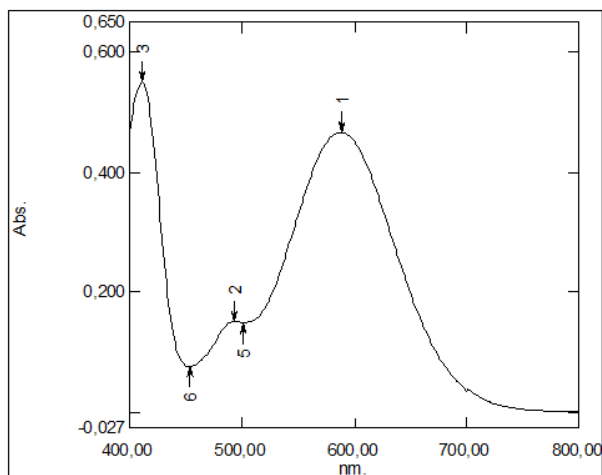
### 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Instrumentos e equipamentos: Espectrofotômetro Shimadzu UV-VIS 2700, Banho Maria Digital WARMNEST, Balões Volumétricos Pyrex® de 25, 50 e de 100 ml, Pipetas Volumétricas Pyrex® e Becheres.

Reagentes e soluções: Aspartame SUPELCO Cód. 4-7135, Ninidrina FLUKA Cód. 33437-10G, Álcool Metílico PA VETEC Cód. 102, Álcool Isopropílico PA VETEC Cód. 139 e Hidróxido de Potássio PA BHerzog ref. BH 6579, Mistura de Solventes metanol/isopropanol 1:1 (v/v), Solução 0,10 M de ninidrina, Soluções de 1000 e 100 ppm de aspartame, Solução 0,15 M de hidróxido de potássio (todas as soluções foram preparadas com a mistura de solventes).

Para confirmar o comprimento de onda no qual ocorre a absorbância máxima, foi feita uma varredura entre 400 e 800 nanômetros, usando o espectrofotômetro Shimadzu, tendo sido observado que ocorrem dois picos de absorbância máxima, um a 400 nm e outro a 604 nm (gráfico 1). Apesar da absorbância a 400 nm ser maior que aquela a 604 nm, nesta pesquisa as leituras de absorbância serão feitas à 604 nm uma vez que a maioria dos corantes empregados nos produtos dietéticos (amarelo crepúsculo, tartrazina, amaranço, eritrosina, vermelho 40 e ponceau 4R) absorvem significativamente na região de 410 a 520 nm e também pela ausência de absorção do aspartame e da ninidrina neste comprimento de onda.

Gráfico 1 – Comprimento de onda x absorbância



Em seguida, foi verificada a existência de linearidade entre a concentração de aspartame e a absorbância. Nessa etapa seguiu-se exatamente a marcha analítica constante do trabalho publicado por Vieira e Fatibello Filho descrita a seguir: diferentes volumes da solução padrão de 100 ppm de aspartame (2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 ml) são transferidos para balões volumétricos de 25 ml e completados para 10 ml com a mistura de solventes. Em seguida adiciona-se à cada balão volumétrico 5ml da solução de ninidrina, 5 ml da solução de KOH e após homogeneização completa-se o volume com a mistura de solventes. Posteriormente coloca-se os balões em banho maria mantido a  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. Após o conteúdo do balão ter alcançado a temperatura ambiente efetua-se a leitura de absorbância a 604 nm. Foram feitas três leituras de absorbância para cada ponto da curva analítica sendo a média apresentada no Quadro 1.

Quadro 1 – Absorbâncias médias calculadas a partir de três determinações executadas em paralelo para cada concentração de aspartame usada para a construção da curva analítica.

[ASPARTAME]	A média
8	0,324
10	0,409
12	0,53
14	0,588
16	0,672

## 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

### RESULTADOS

O comprimento de onda onde ocorre a absorbância máxima determinado nessa pesquisa esta de acordo com aquele apresentado no trabalho de Vieira e Fatibello Filho. Na verificação da linearidade entre a concentração de aspartame e a absorbância obteve-se a equação  $A = 0,04375 [\text{aspartame}] - 0,0204$  e um  $r = 0,995$  que demonstra uma boa correlação entre a concentração e absorbância e também que a mesma é linear.

### CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o momento permitem afirmar que a metodologia apresentada no trabalho publicado por Vieira e Fatibello Filho é eficaz, porém para considerar o método validado ainda serão avaliadas a repetibilidade e a exatidão do mesmo.

### REFERÊNCIAS

- MAZUR, R. H.; SCHLATTER, J. M.; GOLDKAMP, A. H. Structure-Taste Relationships of Some Dipeptides. *Journal of the American Chemical Society*, Washington, v. 91, n. 10, p. 2684-2691, 1969
- O'BRIEN, L.; GELARDI, R. C. Alternative Sweeteners. *Chemtech*, v. 11, p. 274-278, 1981
- CARDELLO, H. M. A. B.; SILVA, M. A. A. P.; DAMÁSIO, M. H. Avaliação tempo-intensidade de doçura e amargor de aspartame e ciclamato/sacarina em equivalência a sacarose em altas concentrações. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos-CEPPA*, Curitiba, v.19, n. 2, p. 391-410, jul./dez., 2001.
- SAMUNDSEN, J.A. Has aspartame an aftertaste?. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 50, p. 1510-1502, 1985.
- TORLONI, M. R.; NAKAMURA, M. U.; MEGALE, A.; SANCHEZ, V. H. S.; MANO, C.; FUSARO, A.S.; MATTAR, R. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. *Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia*, São Paulo, 2007; v. 29, n. 5, p. 267-75, 2007
- Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância. RDC nº. 18, 24 março 2008. Dispõe sobre o Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos. 2008.
- TYLER, T. A. Liquid Chromatographic Determination of Sodium Saccharin, Caffeine, Aspartame and Sodium Benzoate in Cola Beverages. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, Gaithersburg, v. 67, n. 4, p. 745-747, 1984.
- WEBB, N. G.; BECKMAN D. D. Reverse phase liquid chromatographic determination of aspartame in beverages and beverage mixes. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, Gaithersburg, v. 67, n. 3, p. 510-513, 1984.
- TSANG, W. S.; CLARKE M. A.; PARRISH F. W. Determination of aspartame and its breakdown products in soft drinks by reverse-phase chromatography with UV detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 33, n. 4, p. 734-738, 1985.
- DI PIETRA, A. M.; CAVRINI, V.; BONAZZI, D.; BENFENATI, L. HPLC analysis of aspartame and saccharin in pharmaceutical and dietary formulations. *Chromatographia*, v. 30, n. 3-4, p. 215-219, 1990.
- ISSAQ, H. J.; WEISS, D.; RIDLON, C.; FOX, S. D.; MUSCHIK, G. M. The determination of aspartame in diet soft drinks by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, v. 9, n. 8, p. 1791-1801, 1986.
- VERZELLA, G.; BAGNASCO, G.; MANGIA, A. Ion-pair high-performance liquid chromatographic analysis of aspartame and related products. *Journal of Chromatography*, v. 349, n. 1, p. 83-89, 1985.