

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA
Departamento de Ciência de Alimentos - DCA

METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE ASPARTAME E SEUS PRODUTOS DE DECOMPO- SIÇÃO EM REFRIGERANTES POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Márcio Alves de Mello, aprovada pela Comissão Julgadora em 17 de dezembro de 1999.

Márcio Alves de Mello
Químico

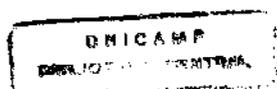
Campinas, 17 de dezembro de 1999.

Heloisa M. Cecchi
Profa. Dra. Heloisa Máscia Cecchi
Presidente da Banca

Profa. Dra. Heloisa Máscia Cecchi
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas - SP
1999



2000/10/16

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex
TOMBO	BC/40074
PROC.	278/00
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	27/01/00
N.º CPD	

CM-00135997-3

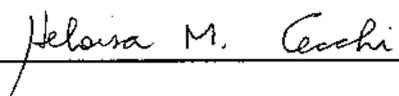
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

M489m Mello, Márcio Alves de
Metodologia analítica para a determinação de aspartame e seus produtos de decomposição em refrigerantes por cromatografia líquida de alta eficiência / Márcio Alves de Mello. – Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Heloisa Máscia Cecchi
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Edulcorantes. 2.Aspartame. 3.Cromatografia líquida de alta eficiência. 4.Refrigerantes. I.Cecchi, Heloisa Máscia. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

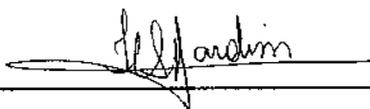
Membros da Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada junto à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.



Profa. Dra. Heloisa Máscia Cecchi

FEA / UNICAMP

Presidente



Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

IQ / UNICAMP

Membro



Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy

FEA / UNICAMP

Membro

Profa. Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo

FEA / UNICAMP

Membro

Dedico este trabalho a meus pais,
Victal (in memoriam) e Hilda,
pelo amor e carinho.

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua tôda
Brilha, porque alta vive.

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza (CEETEPS), através da Coordenadoria de Ensino Técnico (CETEC), pelos afastamentos concedidos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos e auxílios concedidos.

A Monsanto do Brasil Ltda. (São José dos Campos - SP), pela visita técnica.

A Profa. Dra. Heloisa Máscia Cecchi, pela orientação e amizade.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições e sugestões apresentadas para a redação final desta tese.

A todas as pessoas do Laboratório de Análise de Alimentos, do Departamento de Ciência de Alimentos e da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pelo apoio e amizade.

E para todos que colaboraram direta ou indiretamente durante a elaboração deste trabalho.

CONTEÚDO

RESUMO GERAL.....	1
GENERAL SUMMARY.....	3
INTRODUÇÃO GERAL.....	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7

CAPÍTULO 1

DETERMINAÇÃO DE ASPARTAME E SEUS PRODUTOS DE DECOMPOSIÇÃO EM ALIMENTOS: REVISÃO.....	9
1.1 INTRODUÇÃO.....	11
1.2 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO.....	15
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE ASPARTAME E SEUS PRODUTOS DE DECOMPOSIÇÃO EM REFRIGERANTES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	25
--	-----------

2.1 RESUMO.....	27
2.2 SUMMARY.....	28
2.3 INTRODUÇÃO.....	29
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.4.1 MATERIAL.....	32
2.4.2 PADRÕES.....	32
2.4.3 REAGENTES E SOLVENTES.....	33
2.4.4 EQUIPAMENTOS.....	33
2.4.5 MÉTODOS.....	34
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
2.6 CONCLUSÕES.....	49
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO DE ASPARTAME E SEUS PRODUTOS DE DECOMPOSIÇÃO EM REFRIGERANTES POR CROMATO- GRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	55
3.1 RESUMO.....	57
3.2 SUMMARY.....	58
3.3 INTRODUÇÃO.....	59
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	63

2.4.1 MATERIAL.....	63
2.4.2 PADRÕES.....	63
2.4.3 REAGENTES E SOLVENTES.....	64
2.4.4 EQUIPAMENTOS.....	64
2.4.5 MÉTODOS.....	65
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
2.6 CONCLUSÕES.....	85
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
CONCLUSÕES GERAIS.....	89
SUGESTÕES.....	91
ANEXOS.....	93

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão de acesulfame-K.....	95
Anexo 2: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão de aspartame.....	95
Anexo 3: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão de aspartilfenilalanina.....	96
Anexo 4: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão de cafeína.....	96
Anexo 5: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão dicetopiperazina.....	97
Anexo 6: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão de fenilalanina.....	97
Anexo 7: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão de sacarina.....	98
Anexo 8: Curva analítica do padrão de aspartame.....	99
Anexo 9: Curva analítica do padrão de aspartilfenilalanina.....	100
Anexo 10: Curva analítica do padrão da dicetopiperazina.....	101
Anexo 11: Curva analítica do padrão da fenilalanina.....	102
Anexo 12: Cromatograma do refrigerante guaraná normal.....	103

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Fórmula estrutural do aspartame.....	12
Figura 1.2: Esquema das reações de conversão do aspartame.....	14
Figura 2.1: Estrutura química do aspartame.....	29
Figura 2.2: Efeito da concentração de acetonitrila na fase móvel nos fatores de retenção dos padrões diluídos em água.....	39
Figura 2.3: Efeito do pH da fase móvel nos fatores de retenção dos padrões diluídos em água.....	41
Figura 2.4: Cromatograma da solução dos padrões, dissolvidos em água.....	45
Figura 2.5: Cromatograma do guaraná normal com adição de padrões (a) e do guaraná normal (b).....	46
Figura 3.1: Esquema das reações de decomposição do aspartame.....	62
Figura 3.2: Cromatograma da solução dos padrões analisados.....	67
Figura 3.3: Cromatograma do refrigerante sabor cola A.....	68
Figura 3.4: Cromatograma do refrigerante sabor cola B.....	69
Figura 3.5: Cromatograma do refrigerante sabor laranja A.....	70
Figura 3.6: Cromatograma do refrigerante sabor laranja B.....	71
Figura 3.7: Cromatograma do refrigerante sabor guaraná.....	72
Figura 3.8: Cromatograma do refrigerante sabor limão.....	73

Figura 3.8: Proporções encontradas ($\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$) de aspartame e seus produtos de decomposição nos refrigerantes sabores cola A (a), cola B (b) e guaraná (c).....79

Figura 3.9: Proporções encontradas ($\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$) de aspartame e seus produtos de decomposição nos refrigerantes sabores laranja A (a), laranja B (b) e limão (c).....81

INDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Produtos de decomposição conhecidos do aspartame.....	30
Tabela 2.2: Recuperação do aspartame e produtos de decomposição adicionados a guaraná normal.....	47
Tabela 2.3: Limites de detecção e quantificação para os padrões de aspartame e seus produtos de decomposição, segundo as condições de trabalho deste estudo.....	48
Tabela 3.1: Parâmetros de pureza dos picos dos padrões de aspartame, seus produtos de decomposição e de outros compostos da matriz.....	74
Tabela 3.2: Parâmetros de pureza dos picos dos compostos identificados nos refrigerantes analisados.....	75
Tabela 3.3: Análise de aspartame e seus produtos de decomposição em diferentes marcas de refrigerantes.....	78

GLOSSÁRIO

ABIAD	Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos
ACK	acesulfame-K
AP	aspartilfenilalanina
APM	aspartame
ASP	ácido aspártico
CAF	cafeína
CGL	Cromatografia gás-líquido
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DAD	Detector por arranjo de diodos
DKP	dicetopiperazina
EC	Eletroforese capilar
EM	Espectrometria de massas
FAO	“Food and Agriculture Organization”
IDA	Ingestão Diária Aceitável
JECFA	“Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives”
<i>k</i>	fator de retenção
MeCN	acetonitrila
MeOH	metanol
MS	Ministério da Saúde

OMS (WHO)	Organização Mundial da Saúde
PA	ácido fenilalanina aspártico
PHE	fenilalanina
PM	éster metil-fenilalanina
SAC	sacarina
t_M	tempo de retenção da fase móvel ou de um composto não retido pela fase estacionária
t_R	tempo de retenção
WHO	“World Health Organization”

RESUMO GERAL

Os métodos de cromatografia líquida empregados em estudos anteriores para a determinação de aspartame e seus produtos de decomposição foram avaliados para utilização em análises de refrigerantes nacionais. O método aqui otimizado permitiu a determinação de aspartame e seus principais produtos de decomposição, aspartilfenilalanina, dicetopiperazina e fenilalanina, através de uma única corrida cromatográfica, utilizando eluição por gradiente. As amostras (sabores cola, guaraná e limão) foram desgaseificadas e filtradas em filtros de celulose de 0,45 μm antes da análise, enquanto que as amostras sabores laranja foram centrifugadas por 15 minutos a 10 000 g e filtradas antes da análise. A separação foi realizada em coluna de fase reversa C₁₈ Spherisorb™ ODS-2 e fase móvel composta por KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,50): acetonitrila (95:5, v/v). A concentração de acetonitrila foi aumentada linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica, com uma vazão de 0,80 mL min⁻¹. A detecção foi feita por detector por arranjo de diodos a 210 nm. Foram necessários 20 minutos de condicionamento da coluna com a fase móvel inicial antes da próxima injeção. A recuperação variou de 99,0 a 100,0%. Os coeficientes de variação foram de 0,13% para aspartame, de 0,53% para dicetopiperazina, de 0,17% para fenilalanina e, de 0,85% para aspartilfenilalanina. O limite de detecção foi de 0,04 mg 100 mL⁻¹ para o aspartame e de 0,02 mg 100 mL⁻¹ para os produtos de decomposição. O limite de quantificação foi de 0,08 mg 100 mL⁻¹ para o aspartame, e de 0,04 mg 100 mL⁻¹ para os produtos de decomposição. Todas as marcas de refrigerantes analisadas apresentaram níveis de decomposição do aspartame que variaram de 22,22 a 51,75% das quantidades de aspartame apresentadas nos rótulos. Os níveis de dicetopiperazina variaram de 0,55 a 6,70 mg 100 mL⁻¹, representando 4,57 a 20,91% da quantidade de aspartame. Os níveis de aspartilfenilalanina variaram de 0,95 a 4,74 mg 100 mL⁻¹, representando 7,93 a 21,85% da quantidade de aspartame. Os níveis de fenilalanina

foram baixos em todas as amostras analisadas, variando de 0,13 a 0,51 mg 100 mL⁻¹, representando 0,60 a 2,54% da quantidade de aspartame. A técnica é exata, precisa, sensível e é capaz de separar outros edulcorantes (acesulfame-K e sacarina), e também a cafeína em refrigerantes, numa mesma corrida cromatográfica sem interferir com o aspartame e seus produtos de decomposição. O método é conseqüentemente adequado para controle de qualidade ou monitoramento de refrigerantes.

GENERAL SUMMARY

Liquid chromatographic methods for the determination of aspartame and its decomposition products in soft drinks were evaluated, to apply in national soft drinks analysis. The method here defined was able to determine aspartame and its decomposition products, dicetopiperazine, aspartilphenylalanine and phenylalanine, with only one chromatographic injection, using gradient elution. The samples (cola, guaraná and lemon) were homogenized, degassed and filtered in filters of cellulose of 0.45 μm , before the injection in the chromatograph. The samples of orange soft drinks were centrifuged at 10,000 g for 15 min before analysis using a reversed phase C_{18} Spherisorb™ ODS-2 column, and a mobile phase of 0.0125 mol L^{-1} KH_2PO_4 buffer (pH=3.50): acetonitrile (95:5, v/v). The acetonitrile concentration was linearly increased up to a concentration of 25% in 40 min of chromatographic run, with flow rate of 0.80 mL min^{-1} . Detection was effected using a diode array detector at 210 nm. Twenty minutes were necessary to condition the column to the initial mobile phase, before the next injection. Recovery using this method was between 99.0 and 100.00%. The variability coefficients for repeatability were 0.13% for aspartame, 0.53% for dicetopiperazine, 0.17% for phenylalanine and 0.85% for aspartilphenylalanine. The minimum detection level was 0.04 mg 100 mL $^{-1}$ for aspartame and 0.02 mg 100 mL $^{-1}$ for the decomposition products. The minimum quantification level was 0.08 mg 100 mL $^{-1}$ for aspartame and 0.04 mg 100 mL $^{-1}$ for the decomposition products. The aspartame decomposition level found in cola A, cola B, orange A, orange B, guaraná and lemon soft drinks, had been 22.22%, 34.96%, 41.46%, 51.74%, 36.03% e 37.54%, after 66, 44, 64, 148, 37 e 53 days of manufacture, respectively. The dicetopiperazine levels found were from 0.55 to 6.70 mg 100 mL $^{-1}$, representing from 4.57 to 20.91% of the aspartame added to the soft drinks. Aspartilphenylalanine levels were from 0.95 to 4.74 mg 100 mL $^{-1}$, representing from 7.93 to 21.85% of the aspartame added.

Phenylalanine levels were low in all the samples analyzed, being between 0.13 and 0.51 mg 100 mL⁻¹, representing from 0.60 to 2.54% of the added aspartame. This technique is precise, accurate and sensitive; it enables to separate other intense sweeteners (acesulfam-K and saccharin), and also caffeine in soft drinks, during the same chromatographic run without interfering with the aspartame and its decomposition products. Thus the method is suitable for the quality control and monitoring of soft drinks.

INTRODUÇÃO GERAL

Os aspectos relacionados ao estilo de vida, impulsionados pelo culto ao corpo e à saúde, atraíram um número cada vez maior de consumidores para o mercado dos edulcorantes. Antigamente, apenas os diabéticos, as pessoas com problemas de cardiopatias e tendência à obesidade utilizavam os edulcorantes. Com esses produtos, é possível adoçar os alimentos sem provocar no organismo efeitos indesejáveis como a obesidade, as cáries dentárias e, no caso dos diabéticos, a elevação da taxa de glicose no sangue.

O uso de adoçantes começou a se popularizar na década de 60, principalmente nos Estados Unidos. No Brasil, porém, até meados dos anos 80, o consumo de produtos dietéticos estava apenas associado a portadores de distúrbios orgânicos – a diabetes, em especial. Nessa época, alguns desses produtos eram considerados fármacos pela legislação brasileira e, teoricamente, comercializados sob orientação médica. Porém, mudanças na legislação, ocorridas ainda no final da década de 80, reformularam a classificação dos adoçantes, permitindo que invadissem as prateleiras dos supermercados.

A indústria da alimentação vem apostando no mercado promissor dos edulcorantes. Para se ter uma idéia, 250 dos 300 produtos com edulcorantes (refrigerantes, sobremesas, iogurtes) existentes no mercado hoje surgiram nos dois últimos anos. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos (ABIAD), em 1998 o faturamento no setor foi de US\$ 224 milhões (em 1990, essa cifra era de US\$ 55 milhões). E o aspartame é o edulcorante mais consumido no mundo (em segundo lugar vem o ciclamato de sódio) – preferido por cerca de 100 milhões de pessoas (Pereira & Stringueto, 1999).

O aspartame tem seu uso permitido pela Legislação Brasileira com a função de edulcorante artificial (Brasil, 1988), no limite de 75 mg 100 mL⁻¹ para

bebidas dietéticas (Resolução CNS/MS nº 4/88 de 21/06/88), e foi avaliado pelo Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização Mundial da Saúde (JECFA/WHO) em 1980, recebendo uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) numérica de 40 mg kg⁻¹ de peso corpóreo (JECFA/WHO, 1980). Comprovando o princípio básico da toxicologia, segundo o qual “tudo é tóxico, dependendo da dose”, o aspartame pode ser consumido diariamente, de forma segura por uma pessoa, durante toda a vida até o valor da IDA.

O aspartame é o éster dimetílico de dois aminoácidos, a fenilalanina e o ácido aspártico, ou seja, éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina. A estabilidade do aspartame em solução é uma função do tempo, temperatura, pH e umidade livre. Em solução, o aspartame se hidrolisa ao seu dipeptídeo aspartil-fenilalanina e/ou à dicetopiperazina. A dicetopiperazina pode continuar sua conversão até aspartilfenilalanina, e finalmente, hidrolisar-se até seus compostos aminoácidos. Como nenhum dos produtos de decomposição é doce, somente a perda da doçura é percebida – não há sabor residual.

Os objetivos deste trabalho foram; a otimização de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação de aspartame e seus principais produtos de decomposição em uma mesma corrida cromatográfica; a validação intralaboratorial da metodologia otimizada e sua aplicação em refrigerantes; a determinação de aspartame e seus produtos de decomposição em refrigerantes disponíveis no comércio de Campinas e, comparar os resultados com o conteúdo de aspartame declarado nos rótulos das bebidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Leis, decretos, etc. – Resolução nº 04/88 do Conselho Nacional de Saúde. Aprova a revisão das tabelas I, III, IV e V referente a aditivos intencionais em alimentos. Diário Oficial, Brasília, 19 de dezembro de 1988. Seção I, pt. I, p. 24716.
2. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES; WORLD HEALTH ORGANIZATION, JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. *WHO Food Additives Series*, n. 15, 1980, 151 p.
3. PEREIRA, C., STRINGUETO, K. Adoçantes na rede. *ISTOÉ*, São Paulo, n. 1564, p. 54-55, Set. 1999.

CAPÍTULO 1

DETERMINAÇÃO DE ASPARTAME E SEUS PRODUTOS DE DECOMPOSIÇÃO EM ALIMENTOS: REVISÃO

1.1 INTRODUÇÃO

A indústria da alimentação vem apostando no mercado promissor dos edulcorantes. Para se ter uma idéia, 250 dos 300 produtos com edulcorantes (refrigerantes, sobremesas, iogurtes) existentes no mercado hoje surgiram nos dois últimos anos. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos (ABIAD), em 1998 o faturamento no setor foi de US\$ 224 milhões (em 1990, essa cifra era de US\$ 55 milhões). E o aspartame (APM) é o edulcorante mais consumido no mundo (em segundo lugar vem o ciclamato de sódio) – preferido por cerca de 100 milhões de pessoas (Pereira & Stringueto, 1999).

O APM, ($C_{14}H_{18}N_2O_5$) ou N-L- α -aspartil-L-fenilalanina-1-metil éster (Figura 1.1), foi descoberto acidentalmente em dezembro de 1965 nos Estados Unidos, pelo químico James M. Schlatter da companhia G. D. Searle & Co., durante a síntese de moléculas de polipeptídios capazes de bloquear a secreção de ácidos gástricos, para tratamento da úlcera gastrintestinal. O tetrapeptídio C-terminal da gastrina (TRP-MET-ASP-PHE-NH₂) foi empregado como padrão para o ensaio biológico e o APM (ASP-PHE-O-Met) foi o intermediário na síntese (Mazur et al., 1969). Durante o aquecimento do APM em um frasco contendo metanol, a mistura espirrou para fora do frasco e caiu-lhe nos dedos, após alguns minutos ao levar o dedo à boca para folhear um livro sentiu um sabor extremamente doce (Mazur, 1984).

O APM é um dipeptídio branco, cristalino, inodoro, de baixa caloria e com uma doçura de 180-200 vezes a da sacarose (Homler, 1984). Possui ponto de fusão de 246-247°C, solúvel em água (10,2 g L⁻¹ a 25°C) sendo insolúvel em óleos e gorduras. A solubilidade do APM em água a 25°C é mínima em pH 5,2 (ponto isoelétrico) e máxima em pH 2,2 (Fatibello-Filho et al., 1996).

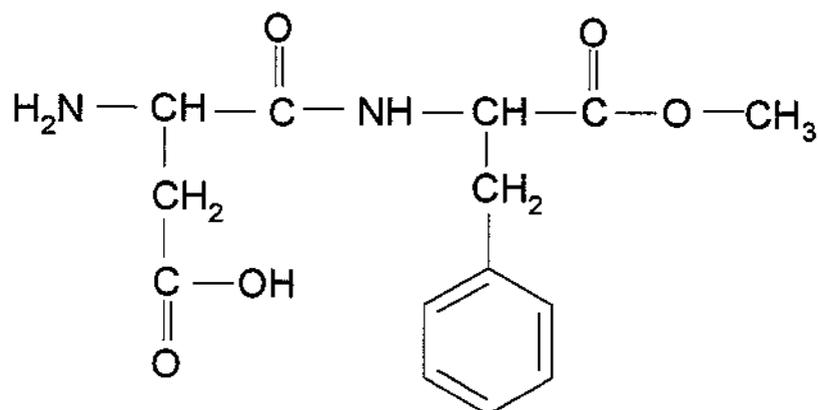


Figura 1.1: Fórmula estrutural do aspartame.

A estabilidade do APM está associada à sua identidade química como um éster dimetílico do dipeptídeo aspartilfenilalanina. Sua estrutura contém duas ligações – ligação éster e ligação peptídica – cuja estabilidade dependerá em qual sistema o aspartame será usado (Figura 1.1). A mais sensível destas ligações é a ligação éster, que sob certas condições de umidade, temperatura e pH, pode ser hidrolisada para produzir aspartilfenilalanina (AP), ou ciclohidrolisar para produzir a dicetopiperazina (DKP). O anel da DKP pode, por sua vez, abrir para formar a AP, e finalmente a AP pode hidrolisar-se aos seus aminoácidos individuais. Como nenhum dos produtos de decomposição é doce, somente a perda da doçura é percebida – não há sabor residual. Como muitas reações químicas, a hidrólise e a ciclização do APM é rápida em altas temperaturas. A estabilidade a seco do APM (com 4,0 a 4,5% de umidade) é excelente. A estabilidade do APM em solução é uma função de três fatores: tempo, temperatura e pH. Com o tempo a uma dada temperatura, a decomposição aumenta, e similarmente com o aumento da temperatura para um dado tempo, a decomposição aumenta. A decomposição obedece a uma cinética simples de 1ª ordem. Em termos de pH, a maior estabilidade é verificada no intervalo entre pH=3 e pH=5, onde se encontra parcela significativa dos alimentos. A 25°C a estabilidade máxima observada é no pH 4,3 (Homler, 1984).

Furda et al. (1975) foram os primeiros que identificaram os produtos de decomposição do APM. Amostras de APM e cloridrato de APM (8 vezes mais solúvel) foram armazenadas em solução aquosa, e seus produtos de decomposição, após trimetilsililação com BSA-N,O-bis (trimetilsilil) acetamida, foram analisados por cromatografia gás-líquido (CGL) e espectrometria de massas (EM). A AP é produzida pela desmetoxilação do APM, e a DKP é produzida pela ciclização do APM com eliminação de metanol (MeOH). O ácido aspártico (ASP) e o éster metil-fenilalanina (PM) são produtos de decomposições resultantes da quebra da ligação peptídica do APM. A fenilalanina (PHE) é produzida pela desmetoxilação do PM. Concluíram que a decomposição do cloridrato foi maior que a do APM, quando armazenados por dois meses nas mesmas condições, e que ambos apresentaram os mesmos produtos de decomposição.

Gaines & Bada (1988) concluíram que os produtos de decomposição majoritários do APM são a DKP em pH neutro, e os dipeptídios tornando-se mais importantes com o aumento do pH. A formação de DKP do ácido fenilalanina aspártico (PA) é acelerada pela repulsão eletrostática entre os dois grupos carboxílicos que forçam o dipeptídio para a configuração cis.

Stamp & Labuza (1989b) identificaram pela primeira vez o β -aspartame (β -APM) e a β -aspartilfenilalanina (β -AP). Os produtos de decomposição do APM foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e identificados por EM. Os autores concluíram que o APM e a AP, podem existir em duas formas isoméricas α -APM e β -APM, α -AP e β -AP, respectivamente.

Um esquema das reações de conversão do APM, e seus respectivos isômeros estão representados na Figura 1.2 (Prodolliet & Bruehlhart, 1993b).

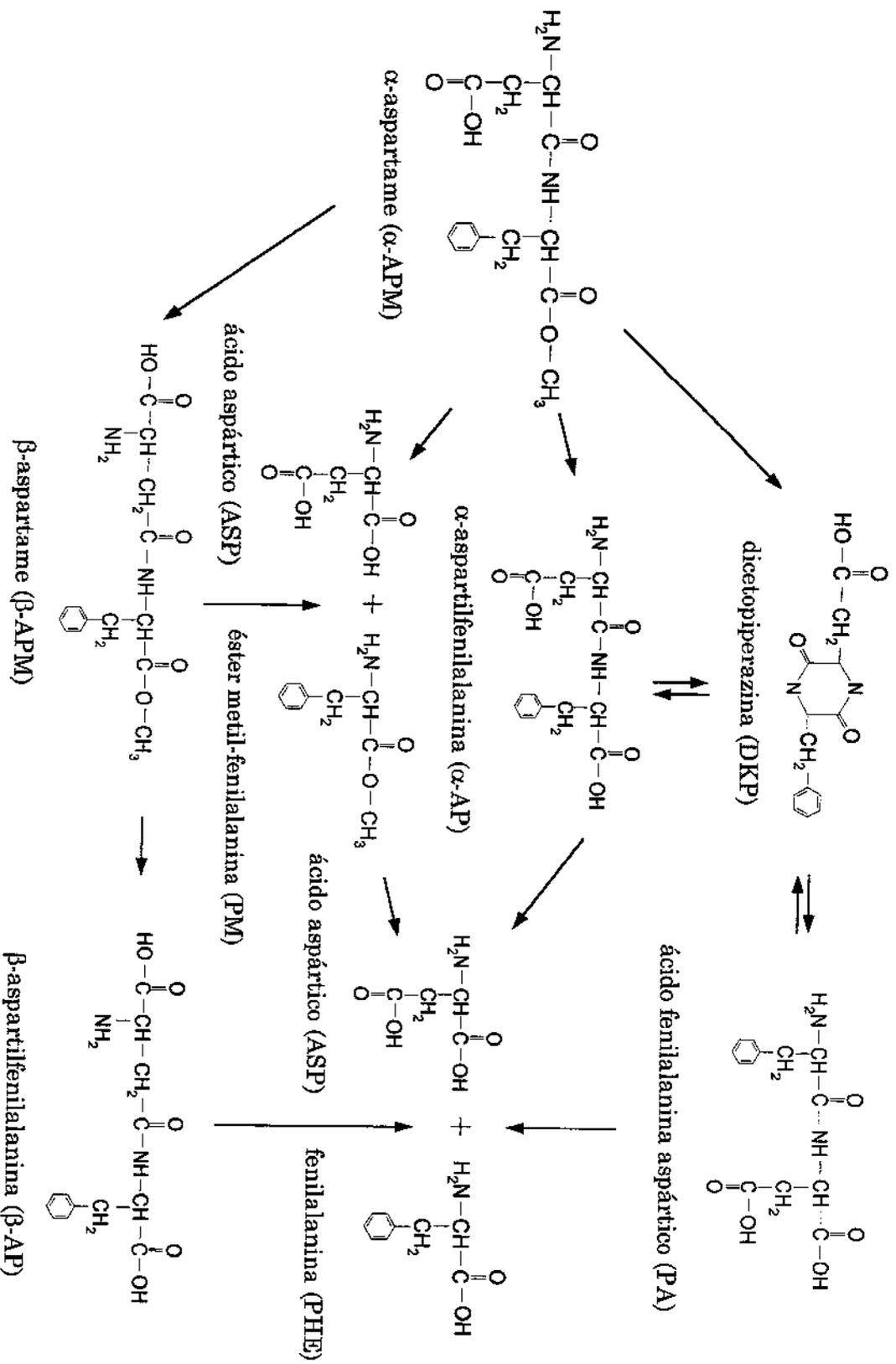


Figura 1.2: Esquema das reações de conversão do aspartame (Prodoliet & Bruelhart, 1993b).

1.2 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO

Os métodos analíticos usados para a determinação do APM e seus produtos de decomposição do em alimentos são a eletroforese capilar (EC) (Aboul-Enein & Bakar, 1997; Kvasnička, 1987) e principalmente a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Abreu et al., 1993; Cross & Cunico, 1984; Di Pietra et al., 1990; Gibbs et al., 1996; Grosse-Waechter & Dirk, 1991; Hagiwara et al., 1990; Hayakawa et al., 1990; Ladisch et al., 1991; Lawrence & Iyengar, 1987; Motellier & Wainer, 1990; Neiryneck & Nollet, 1988; Prodoliet & Bruehlhart, 1993b; Prudel & Davidková, 1985; Saito et al., 1989; Scherz et al., 1983; Stamp & Labuza, 1989a; Tsang et al., 1985; Verzella & Mangia, 1985; Verzella et al., 1985; Wróbel & Wróbel, 1997).

Aboul-Enein & Bakr (1997) compararam a eficiência dos dois métodos (EC e CLAE) para a determinação de APM e seus produtos de decomposição em APM a granel e refrigerantes. A separação de LL- α -aspartame (LL- α -APM) e quatro produtos de decomposição, LL- β -aspartame (LL- β -APM), L- α -aspartilfenilalanina (α -AP), L- β -aspartilfenilalanina (β -AP) e DKP em uma única corrida cromatográfica utilizando-se uma coluna Chirobiotic T (Teicoplanin) foi realizada em menos de 10 minutos. A separação destes mesmos compostos por EC ocorreu em menos de 18 minutos. As curvas analíticas para a determinação quantitativa de cada um destes compostos foram construídas individualmente usando ambos os métodos. A análise de regressão das curvas analíticas indicou uma relação linear entre a área do pico e a concentração numa faixa que foi de 5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para todos os compostos, exceto para a DKP, que foi de 100 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ devido ao menor limite de detecção da CLAE. Uma maior faixa de linearidade foi obtida com EC, de 250 a 4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estes métodos foram aplicados para análise de LL- α -APM e os produtos de decomposição em Seven-Up Diet[®]. Os resultados das análises em ambos os

métodos indicaram a presença de 4 a 5% de DKP do conteúdo total de LL- α -APM presente nas amostras de refrigerantes analisadas. As amostras de refrigerantes analisadas não apresentaram nenhum outro produto de decomposição. O método por CLAE mostrou-se ser mais vantajoso quando comparado com a EC.

Tsang et al. (1985) apresentaram um método simples e rápido para determinação de APM e seus produtos de decomposição em refrigerantes, através de CLAE. Empregaram coluna C_{18} μ Bondapak (10 μ m, 300 \times 3,9 mm), tendo como fase móvel KH_2PO_4 0,0125 mol L^{-1} (pH 3,5): MeCN (90:10, v/v), vazão de 0,80 mL min^{-1} e detecção a 214 nm. APM e quatro produtos de decomposição (AP, DKP, PHE e PM) foram identificados e as suas proporções relativas determinadas. A recuperação do APM foi de 99,5% e o coeficiente de variação foi menor que 0,3%. Os dados mostraram que o APM é relativamente instável em refrigerantes por períodos longos de estocagem, e que principalmente os produtos de decomposição da hidrólise e ciclização AP e DKP, contribuíram para a diminuição da quantidade de APM original. Os refrigerantes apresentaram 94%, 28 a 57% e 4 a 14% do teor de APM original após 1, 6 e 36 meses de estocagem a 22°C, respectivamente.

Saito et al. (1989) desenvolveram um método para determinação de DKP em refrigerantes. Utilizaram uma coluna C_{18} Nucleosil 5 (5 μ m, 250 \times 4,6 mm,) com uma fase móvel composta por tampão KH_2PO_4 0,01 mol L^{-1} (pH 4,0): MeCN (85:15, v/v). A vazão foi de 0,70 mL min^{-1} e a detecção a 210 nm. A curva analítica para a DKP indicou uma relação linear entre a área do pico e a concentração numa faixa de 0,50 a 10,0 μ g mL^{-1} . A recuperação para a DKP variou de 96,0% a 99,8%, para o refrigerante ao nível adicionado de 2,5 μ g mL^{-1} e 10 μ g mL^{-1} , respectivamente. O limite de detecção para a DKP foi de 0,5 μ g mL^{-1} . A DKP foi encontrada em seis amostras comerciais em níveis que variaram de 9,5 a 26,0 μ g mL^{-1} .

Stamp & Labuza (1989a) desenvolveram um método para a determinação de APM e seus produtos de decomposição, através de CLAE. O α -APM e seus produtos de decomposição β -APM, α -AP, β -AP, DKP, PHE e PM foram dissolvidos em ácido 1-heptanosulfônico 0,005 mol L⁻¹ e NaH₂PO₄ 0,005 mol L⁻¹, em 1 litro de água destilada (solução A). Uma alíquota da solução foi analisada usando uma coluna C₁₈ Novapack (4 μ m, 150 \times 3,9 mm), com uma coluna de guarda Aquapore ODS (7 μ m), tendo como fase móvel solução A: MeCN (1:4, v/v), pH 3, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detecção a 214 nm. A linearidade da curva analítica foi de 3 a 100 μ g L⁻¹ para α -APM e 3 a 25 μ g L⁻¹ para os seis produtos de decomposição analisados. O método foi aplicado na análise de refrigerantes.

Abreu et al. (1993) analisaram APM e DKP em pós para o preparo de sobremesas, por CLAE. As amostras após extração com MeOH, foram injetadas em uma coluna C₁₈ μ Bondapak (10 μ m, 300 \times 3,9 mm), usando NaH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,5): MeCN (90:10, v/v), como fase móvel. A vazão foi de 2,0 mL min⁻¹ e a detecção a 200 nm. A recuperação do método foi de 96 a 97%, demonstrando sua adequação para a determinação deste edulcorante em alimentos. Todos os produtos analisados apresentaram quantidade de APM de acordo com a legislação em vigor, e em nenhuma das amostras analisadas, foi detectada a presença de DKP, demonstrando que a tecnologia de fabricação e conservação dos produtos analisados foi adequada.

Prodoliet & Bruehlhart (1993b) utilizando uma metodologia desenvolvida para determinação de acesulfame-K (Prodoliet & Bruehlhart, 1993a), analisaram APM em vários alimentos. O método também permitiu a determinação dos principais produtos de decomposição do APM, AP, DKP e PHE. As amostras foram extraídas ou diluídas com água e filtradas. Matrizes complexas foram centrifugadas ou clarificadas com solução de Carrez (K₄[Fe(CN)₆].H₂O 3,6 g 100 mL⁻¹ e ZnSO₄.H₂O 7,2 g 100 mL⁻¹). Uma alíquota de 10 μ L do extrato foi analisada em uma coluna C₁₈ μ Bondapak (10 μ m, 300 \times 3,9 mm), com coluna de guarda C₁₈ μ Bondapak (10 μ m), usando KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,5): MeCN

(85:15 ou 98:2, v/v), como fase móvel. A vazão foi de $0,80 \text{ mL min}^{-1}$ e a detecção a 214 nm. A recuperação para o APM variou de 96,1 a 105,0%. A decomposição do APM foi observada em várias amostras de alimentos. Os valores totais do APM (APM + produtos de decomposição) ficaram entre -10% e +5% do valor declarado. Os coeficientes de variação foram 1,34% e 0,91% para produtos contendo $45 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de APM e para os outros produtos, respectivamente. A linearidade da curva analítica foi de 0,5 a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, o limite de detecção para o APM foi de 1 ng. A técnica é precisa e sensível, permitindo a detecção de outros edulcorantes, ácidos orgânicos e alcalóides na mesma corrida cromatográfica sem interferir com o APM ou seus produtos de decomposição.

Gibbs et al. (1996) descreveram um método para a determinação de APM e seus metabólitos ASP, PHE, DKP e AP em refrigerantes e alimentos por CLAE. As amostras líquidas foram injetadas diretamente em uma mini-coluna C_8 Aquapore OD-300 ($5 \mu\text{m}$, $30 \times 4,6 \text{ mm}$), tendo como fase móvel água: MeCN (90:10, v/v), contendo 0,1% de ácido trifluoroacético, enquanto as amostras sólidas foram extraídas com água. A vazão foi de $0,30 \text{ mL min}^{-1}$ e a detecção a 210 nm. O limite de detecção foi de 400 ng. A recuperação sempre foi superior a 88%. O resultado encontrado para o APM estava de acordo com o declarado no rótulo dos fabricantes. Uma amostra de bebida dietética após um ano de armazenamento a 25°C apresentou a presença de APM, AP e PHE.

Wróbel & Wróbel (1997) descreveram um método para a determinação de APM e seu principal produto de hidrólise PHE em refrigerantes por CLAE. Após desgaseificação, 1 mL do refrigerante foi misturado com duas porções de 1 mL de soluções de Carrez (solução aquosa de ferrocianeto de potássio 15% e acetato de zinco 30%, respectivamente), e diluída com 25 mL de água. As amostras após precipitação e centrifugação, foram diluídas (1:1, v/v) com tampão

NaH_2PO_4 0,0200 mol L^{-1} (pH 4,3): MeCN: MeOH (62:34:4; v/v/v). Uma alíquota de 20 μL da solução foi analisada em uma coluna C_{18} LiChsorb RP18 (10 μm , 200 \times 4,6 mm) com tampão NaH_2PO_4 0,0200 mol L^{-1} (pH 4,3): MeOH: MeCN (81:2:17; v/v/v) usando eluição por gradiente: 0-1 min, 0,70 mL min^{-1} , 1-2 min, 1,0 mL min^{-1} , 2-8 min, 1,0 mL min^{-1} e detecção a 214 nm (referência 580nm) e detecção fluorimétrica a 284 nm (excitação a 205 nm) em seqüência. Os limites de detecção para o APM e DKP foram 0,06 mg L^{-1} e 0,01 mg L^{-1} , e as curvas analíticas apresentaram linearidade na faixa de 0,5 a 40 mg L^{-1} e 0,1 a 10 mg L^{-1} , respectivamente. A recuperação usando a detecção espectrofluorimétrica foi de 95 a 98%. O método foi aplicado a Diet Pepsi[®], Diet Coke[®] e Diet Sprite[®]. A detecção espectrofluorimétrica apresentou melhor sensibilidade e foi mais específica, permitindo a detecção simultânea de APM e PHE em refrigerantes.

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOUL-ENEIN, H., BAKR, S. A. Comparative study of the separation and determination of aspartame and its decomposition products in bulk material and diet soft drinks by HPLC and CE. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 20, n. 9, p. 1437-1444, May 1997.
2. ABREU, R. W., OLIVEIRA, I. R., ZENEBON, O. Quantificação do aspartame por cromatografia líquida de alta resolução (CLAR) em pós para o preparo de sobremesas. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 53, n. 1/2, p. 77-80, 1993.
3. CROSS, R., CUNICO, B. Reversed-phase liquid chromatography analysis of aspartame and its degradation products using UV and fluorescence detection. *Liquid Chromatography Magazine*, Cleveland, n. 2, v. 9, p. 678-683, 1984.
4. DI PIETRA, A. M., CAVRINI, V., BONAZZI, D., BENFENATI, L. HPLC analysis of aspartame and saccharin in pharmaceutical and dietary formulations. *Chromatographia*, Wiesbaden, v. 30, n.3/4, p. 215-219, Aug. 1990.
5. FATIBELLO-FILHO, O., VIEIRA, I. C., GOUVEIA, S. T. G., CALAFATTI, S. A., GUARITÁ-SANTOS, A., J. M. Adoçantes Artificiais. *Química Nova*, v. 19, n. 3, p.248-260. 1996.
6. FURDA, I., MALIZIA, P. D., KOLOR, M. G., VERNIERI, P. J. Decomposition products of L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester and their identification by gas-liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 23, n. 2, p. 340-343, 1975.

7. GAINES, S. M., BADA, J. L. Aspartame decomposition and epimerization in the diketopiperazine and dipetide products as a function of pH and temperature. *The Journal of Organic Chemistry*. Washington, v. 53, n. 12, p. 2757-2764, Jun. 1988.
8. GIBBS, B. F., ALLI, I., MULLIGAN, C. N. Simple and rapid high-performance liquid chromatography method for the determination of aspartame and its metabolites in foods. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 725, n.2, p. 372-377, Feb. 1996.
9. GROSSE-WAECHTER, S., DIRKS, U. Determination of aspartame and its degradation product, piperazine-2,5-dione, in desserts by high-performance liquid chromatography. Investigations on heat stability of aspartame. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, n. 193, v. 4, p. 344-346, Oct. 1991.
10. HAGIWARA, T., YASUNO, T., SUZUKI, S., SAITO, K. Determination of aspartame and diketopiperazine in food by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, Tóquio, v. 40, n. 1, p. 62-67, Feb. 1999.
11. HAYAKAWA, K., SCHILPP, T., IMAI, K., HIGUSHI, T., WONG, O. S. Determination of aspartic acid, phenylalanine and aspartylphenylalanine in aspartame-containing samples using a precolumn derivatization HPLC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 38, n. 5, p. 1256-1260, May 1991.
12. HOMLER, B. E. Properties and stability of aspartame. *Food Technology*, Chicago, v. 38, n. 7, p. 50-55, July. 1984.
13. KVASNIČKA, F., A. Analysis of the sweetener aspartame by capillary isotachopheresis. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, n. 390, v. 1, p. 237-240, Mar. 1987.

14. LADISCH, M. R., HENDRICKSON, R. L., FIROUZTALE, E. Analytical- and preparative-scale chromatographic separation of phenylalanine from aspartame using a new polymeric sorbent. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 540, n. 1-2, p. 85-101, Mar. 1991.
15. LAWRENCE, J. F., IYENGAR, J. R. Liquid chromatographic determination of beta-aspartame in diet soft drinks, beverage powder and pudding mixes. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 404, n. 1, p. 261-266, Aug. 1987.
16. MAZUR, R. H. *Discovery of Aspartame* In: *Aspartame: physiology and biochemistry*, STEGINK, L. D., FILER, L. J. New York: Marcel Dekker, 1984, cap.1, p.3.
17. MAZUR, R. H.; SCHLATTER, J. M.; GOLDKAMP, A. H. Structure-taste relationships of some dipeptides. *Journal of American Chemical Society*, v. 91, n. 10, p. 2684-2691, May 1969.
18. MOTELLIER, S., WAINER, I. W. Direct stereochemical resolution of aspartame stereoisomers and their degradation products by high-performance liquid chromatography on a chiral crown ether based stationary phase. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 516, n. 2, p. 365-373, Sep. 1990.
19. NEIRYNCK, L., NOLLET, L. Determination of the stability of aspartame in soft drinks by reversed-phase liquid chromatography. *Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology*, v. 43, n.3, p.83-88, 1988.
20. PEREIRA, C., STRINGUETO, K. Adoçantes na rede. *ISTOÉ*, São Paulo, n. 1564, p. 54-55, Set. 1999.

21. PRODOLLIET, J., BRUELHART, M. Determination of acesulfame-K in foods. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, Arlington, v. 76, n. 2, p. 268-274, Mar./Apr. 1993a.
22. PRODOLLIET, J., BRUELHART, M. Determination of aspartame and its major decomposition products in foods. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, Arlington, v. 76, n. 2, p. 275-282, Mar./Apr. 1993b.
23. PRUDEL, M., DAVIDKOVÁ, E. Determination of the decomposition products of Usal in model systems and determination of dioxopiperazine in soft drinks by HPLC. *Die Nahrung*, Berlin, v. 29, n. 4, p. 381-389, 1985.
24. SAITO, K., HORIE, M., HOSHINO, Y., NOSE, N., NAKAZAWA H., FUJITA, M. Determination of diketopiperazine in soft drinks by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, Amsterdam, v. 12, n. 4, p. 571-582, Mar. 1989.
25. SCHERZ, J. C., MONTI, J. C., JOST, R. Analysis of the peptide sweetener aspartame by liquid chromatography. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, n. 177, v. 2, p. 124-128, Aug. 1983.
26. STAMP, J. A., LABUZA, T. P. An ion-pair high performance liquid chromatographic method for the determination of aspartame and its decomposition products. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 54, n. 4, p. 1043-1046, Jul./Aug. 1989a.
27. STAMP, J. A., LABUZA, T. P. Mass spectrometric determination of aspartame decomposition products. Evidence for β -isomer formation in solution. *Food Additives and Contaminants*, v. 6, n. 4, p. 397-414, Oct./Dez. 1989b.

28. 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, n. 33, n. 4, p. 734-738, Jul./Aug. 1985.
29. VERZELLA, G., BAGNASCO, G., MANGIA, A. Ion-pair liquid chromatography analysis of aspartame and related products. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, n. 349, v. 1, p. 83-89, Dec. 1985.
30. VERZELLA, G., MANGIA, A. High-performance liquid chromatography analysis of aspartame. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, n. 346, v. 1, p. 417-422, Oct. 1985.
31. WRÓBEL, K. & WRÓBEL, K. Determination of aspartame and phenylalanine in diet soft drinks by high-performance liquid chromatography with direct spectrofluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 773, n.1-2, p. 163-168, Jun. 1997.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE ASPARTAME E SEUS PRODUTOS DE DECOMPOSIÇÃO EM REFRIGERANTES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

2.1 RESUMO

Os métodos de cromatografia líquida empregados em estudos anteriores para a determinação de aspartame e seus produtos de decomposição foram avaliados para utilização em análises de refrigerantes nacionais. O método aqui otimizado permitiu a determinação de aspartame e seus principais produtos de decomposição, aspartilfenilalanina, dicetopiperazina e fenilalanina, através de uma única corrida cromatográfica, utilizando eluição por gradiente. Uma amostra sabor guaraná foi desgaseificada e filtrada em filtro de celulose de 0,45 μm antes da análise. A separação foi realizada em coluna de fase reversa C₁₈ Spherisorb™ ODS-2 e fase móvel composta por KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,50): acetonitrila (95:5, v/v). A concentração de acetonitrila foi aumentada linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica, com uma vazão de 0,80 mL min⁻¹. A detecção foi feita por detector por arranjo de diodos a 210 nm. Foram necessários 20 minutos de condicionamento da coluna com a fase móvel inicial antes da próxima injeção. A recuperação variou de 99,0 a 100,0%. Os coeficientes de variação foram de 0,13% para aspartame, de 0,53% para dicetopiperazina, de 0,17% para fenilalanina e, de 0,85% para aspartilfenilalanina. O limite de detecção foi de 0,04 mg 100 mL⁻¹ para o aspartame e de 0,02 mg 100 mL⁻¹ para os produtos de decomposição. O limite de quantificação foi de 0,08 mg 100 mL⁻¹ para o aspartame, e de 0,04 mg 100 mL⁻¹ para os produtos de decomposição.

2.2 SUMMARY

Liquid chromatographic methods for the determination of aspartame and its decomposition compounds in soft drinks were evaluated, to apply in national soft drinks analysis. The method here defined was able to determine aspartame and its decomposition compounds, dicetopiperazine, aspartilphenylalanine and phenylalanine, with only one chromatographic injection, using gradient elution. One sample of guaraná were degassed and filtered in filters of cellulose of 0.45 μm , for analysis using a reversed phase C_{18} Spherisorb™ ODS-2 column, mobile phase of 0.0125 mol L^{-1} KH_2PO_4 buffer (pH=3.50): acetonitrile (95:5, v/v). The acetonitrile concentration was linearly increased up to a concentration of 25% in 40 min of chromatographic run, with flow rate of 0.80 mL min^{-1} . Detection was effected using a diode array detector at 210 nm. Twenty minutes were necessary to condition the column to the initial mobile phase, before the next injection. Recovery using this method was between 99.0 and 100.00%. The variability coefficients for repeatability were 0.13% for aspartame, 0.53% for dicetopiperazine, 0.17% for phenylalanine and 0.85% for aspartilphenylalanine. The minimum detection level was 0.04 mg 100 mL^{-1} for aspartame and 0.02 mg 100 mL^{-1} for the decomposition compounds. The minimum quantification level was 0.08 mg 100 mL^{-1} for aspartame and 0.04 mg 100 mL^{-1} for the decomposition compounds.

2.3 INTRODUÇÃO

O aspartame (APM), ($C_{14}H_{18}N_2O_5$) ou N-L- α -aspartil-L-fenilalanina-1-metil éster (Figura 2.1), foi descoberto acidentalmente em dezembro de 1965 nos Estados Unidos, pelo químico James M. Schlatter da companhia G. D. Searle & Co., durante a síntese de moléculas de polipeptídios capazes de bloquear a secreção de ácidos gástricos, para tratamento da úlcera gastrintestinal. O tetrapeptídio C-terminal da gastrina (TRP-MET-ASP-PHE-NH₂) foi empregado como padrão para o ensaio biológico e o APM (ASP-PHE-O-Met) foi o intermediário na síntese (Mazur et al., 1969). Durante o aquecimento do APM em um frasco contendo metanol, a mistura espirrou para fora do frasco e caiu-lhe nos dedos, após alguns minutos ao levar o dedo à boca para folhear um livro sentiu um sabor extremante doce (Mazur, 1984).

O APM é um dipeptídio branco, cristalino, inodoro, de baixa caloria e com uma doçura de 180-200 vezes a da sacarose (Homler, 1984). Possui ponto de fusão de 246-247°C, solúvel em água (10,2 g L⁻¹ a 25°C) sendo insolúvel em óleos e gorduras. A solubilidade do APM em água a 25°C é mínima em pH 5,2 (ponto isoelétrico) e máxima em pH 2,2 (Fatibello-Filho et al., 1996).

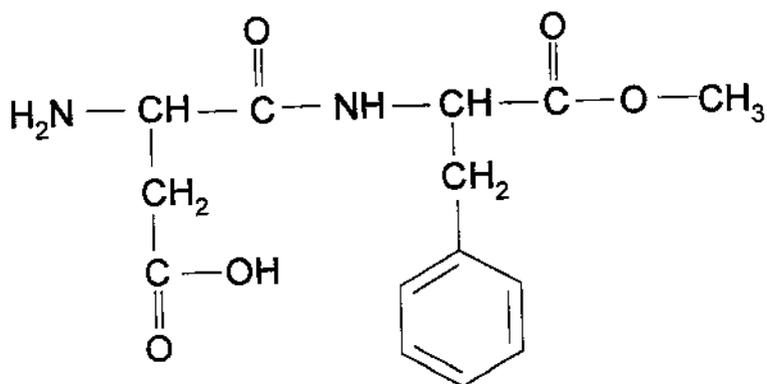


Figura 2.1: Estrutura química do aspartame.

A estabilidade do APM em solução é uma função de três fatores: tempo, temperatura e pH. A decomposição obedece a uma cinética simples de 1ª ordem (Homler, 1984). Os produtos de decomposição conhecidos do APM estão apresentados na Tabela 2.1. Como nenhum dos produtos de decomposição mencionados é doce, o resultado é a perda da doçura do APM (Stamp & Labuza, 1989b).

Tabela 2.1: Produtos de decomposição conhecidos do aspartame.

Composto	Proposta de Formação
ácido aspártico (ASP)	Hidrólise catalisada ácida de ligação peptídica do APM ou AP
aspartilfenilalanina (AP)	Hidrólise catalisada ácida ou básica do APM com perda de molécula de metanol
dicetopiperazina (DKP)	Ciclização catalisada ácida ou básica intramolecular de seis membros com perda de metanol, ou ciclização de AP.
éster metil-fenilalanina (PM)	Hidrólise catalisada ácida de ligação peptídica intacta do APM
fenilalanina (PHE)	Hidrólise catalisada ácida de AP ou hidrólise catalisada básica do PM

Fonte: Stamp & Labuza, 1989b.

Os métodos analíticos usados para a determinação do APM e seus produtos de decomposição em refrigerantes são a eletroforese capilar (EC) (Abuol-Enein & Bakar, 1997; Kvasnička, 1987) e principalmente a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Gibbs et al., 1996; Lawrence & Iyengar, 1987; Motellier & Wainer, 1990; Neiryneck & Nollet, 1988; Prodolliet & Bruelhart, 1993b; Prudel & Davidková, 1985; Saito et al., 1989; Scherz et al., 1983; Stamp & Labuza, 1989a; Tsang et al., 1985; Verzella et al., 1985; Wróbel & Wróbel, 1997).

O objetivo deste trabalho foi otimizar uma metodologia analítica para determinação simultânea de aspartame e seus produtos de decomposição, que melhor se adequasse aos refrigerantes nacionais. Neste sentido, a cromatografia líquida de alta eficiência apresenta-se como uma das técnicas mais apropriadas, incluindo rapidez, precisão, exatidão e alta sensibilidade, mesmo para compostos presentes em quantidades muito pequenas e em matrizes complexas, tais como os alimentos (Macrae, 1990), além de permitir a análise simultânea de vários edulcorantes e seus compostos de decomposição.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 MATERIAL

Amostras de refrigerantes de sabor guaraná foram analisadas neste trabalho, visando à otimização da metodologia analítica. Este refrigerante foi escolhido por ser uma bebida tipicamente brasileira, ainda não estudada, e por ser uma matriz de relativa complexidade. As amostras foram adquiridas em estabelecimentos comerciais de Campinas, São Paulo, no ano de 1999. As amostras eram de refrigerantes normais (adoçados com sacarose), e permaneceram uma semana em suas embalagens originais, à temperatura ambiente até o momento da análise. Duas amostras em embalagens plásticas descartáveis de 2 litros, do mesmo lote, foram analisadas em duplicata, sendo cada replicata representada pela média de três injeções no sistema cromatográfico.

2.4.2 PADRÕES

Soluções estoques individuais dos padrões de N-L- α -aspartil-L-fenilalanina-1-metil éster (aspartame, APM), N-L- α -aspartil-L-fenilalanina (aspartilfenilalanina, AP), L-fenilalanina (fenilalanina, PHE), 1,3,7-trimetilxantina anidra (caféina, CAF), sal sódico do ácido o-sulfobenzóico (sacarina, SAC) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), sal potássico do 6-metil-1,2,3-oxatiazina-4(3H)-ona-2,2-dióxido (acesulfame-K, ACK) (Riedel-de-Häen Products) e ácido (2S-cis)-(-)-5-benzil-3,6-dioxo-2-piperazina etanóico (dicetopiperazina, DKP) (Aldrich Chemical Company) foram preparadas pesando-se 0,5 mg e dissolvendo-se em 100 mL de água desionizada. Os padrões foram dissolvidos no banho de ultra-som, por 15 minutos. Todos os padrões foram armazenados de acordo com as especificações dos fabricantes, e as soluções estoque foram mantidas em temperatura de refrigeração.

2.4.3 REAGENTES E SOLVENTES

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico, exceto a acetonitrila (MeCN), H₃C-CN (Omnisolv – EM SCIENCE) utilizada na preparação da fase móvel que era de grau cromatográfico. Mesmo assim, a MeCN foi filtrada em membrana HVLP 01300 de 0,45 µm de diâmetro (Millipore Corporation, Milford, MA) e desgaseificada no banho de ultra-som.

A água, utilizada nas soluções e na fase móvel, foi destilada e desionizada no sistema de água ultrapura Milli-Q Plus (Millipore Corporation, Milford, MA), filtrada em membrana HA em éster de celulose, 0,45 µm de poro e 47 mm de diâmetro HAWP 04700 (Millipore Corporation, Milford, MA), desgaseificada no banho de ultra-som.

A solução tampão foi preparada numa concentração de 0,0125 mol L⁻¹ de diidrogenofosfato ácido de potássio, KH₂PO₄ P.A. (Merck), com pH ajustado a 3,50 com ácido fosfórico, H₃PO₄ P.A. (Merck).

2.4.4 EQUIPAMENTOS

Cromatógrafo líquido: Bomba ternária modelo 9010 (Varian, Harbor City, CA) com amostrador de 20 µL e um injetor manual modelo 7125 (Rheodyne Inc., Cotati, CA). Detector policromático por arranjo de diodos (DAD) modelo 9065 (Varian, Harbor City, CA), operando com comprimento de onda de 210 nm, 0,1 AUFS. Integrador modelo 4400 (Varian, Harbor City, CA) com atenuação 8. Coluna de fase reversa C₁₈ Supelco (Supelco, Inc., Bellefonte, PA), 250 × 4,6 mm, empacotada com Spherisorb™ ODS-2 (Phase Separations, Ltd.) de 5 µm. Coluna de guarda C₁₈, 10 × 4,6 mm, empacotada com Bondesil™ no próprio laboratório.

Aparelho de filtração de solventes: As fases móveis foram filtradas através de um aparelho de filtração, todo em vidro (Millipore Corporation, Bedford, MA).

Aparelho de filtração das amostras: Todas as amostras foram filtradas em um aparelho em aço inox AA-Millipore (Millipore Corporation, Bedford, MA) antes da injeção.

Banho ultra-som: Microsonic SX 20 ou equivalente.

Purificador de água: sistema de ultrapurificação de água Millipore Milli-Q Plus (Millipore, Milford, MA).

pHmetro: Mettler Toledo modelo 320 com eletrodo In Lab 413 e sensor de temperatura Pt 1000 ou equivalente.

2.4.5 MÉTODOS

Otimização da separação cromatográfica do aspartame e seus produtos de decomposição: A metodologia descrita por Prodolliet & Bruehlhart (1993b) para determinação de APM e seus produtos de decomposição em alimentos, foi avaliada e otimizada, principalmente em relação à fase móvel com diferentes composições, para utilização em análises de refrigerantes nacionais.

Preparo da amostra: As amostras, após serem homogeneizadas, eram colocadas no banho ultra-som para degaseificação, por no mínimo 30 minutos.

Identificação dos compostos: A identificação dos compostos analisados foi efetuada através da comparação dos valores de tempos de retenção (t_R) e fatores de retenção (k) estabelecidos com as amostras e os padrões, por co-cromatografia e por comparação com os espectros de absorção no ultravioleta, obtidos no DAD.

Quantificação dos compostos: O método usado na quantificação dos compostos foi o da padronização externa, utilizando a área do pico. A curva analítica foi estabelecida através de 6 níveis decrescentes de concentração, sendo que cada ponto foi representado pela média de três determinações, num intervalo de 0,20 a 40,0 mg 100 mL⁻¹ para APM, de 0,1 a 10,0 mg 100 mL⁻¹ para DKP, e para AP e PHE de 0,05 a 5,0 mg 100 mL⁻¹ cada. Os limites de quantificação foram considerados como sendo duas vezes o valor dos limites de detecção para cada padrão (Caulcutt & Boddy, 1983).

Recuperação, limites de detecção e repetibilidade: Vários aspectos com relação à técnica analítica foram avaliados, incluindo a recuperação de cada padrão individualmente, o limite de detecção do método e a repetibilidade da técnica. A exatidão foi desenvolvida com o estudo da recuperação de padrões dos compostos, adicionados a uma amostra de guaraná normal, em dois níveis de concentração. Para o APM os níveis de concentração adicionados foram 8,50 e 17,00 mg 100 mL⁻¹; para a DKP foram 5,00 e 10,00 mg 100 mL⁻¹; e para a AP e PHE foram 2,50 e 5,00 mg 100 mL⁻¹. Os limites de detecção do método foram definidos com padrões, realizando-se sucessivas diluições com o refrigerante normal, e determinando a menor quantidade detectável, aproximadamente duas vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento. Os limites de quantificação considerados anteriormente, foram adicionados ao refrigerante normal, e após a adição, uma alíquota foi cromatografada para confirmação destes valores. A repetibilidade do método foi avaliada calculando-se o coeficiente de variação (% CV) do resultado da análise de 4 amostras de refrigerantes normais adicionadas com 0,04 mg 100 mL⁻¹ dos padrões de AP, DKP e PHE, e de 0,08 mg 100 mL⁻¹ de APM.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização da separação cromatográfica do aspartame e seus produtos de decomposição: A metodologia analítica descrita por Prodollet & Bruelhart (1993b) para determinação de APM e seus produtos de decomposição, sofreu algumas modificações para que se adaptasse melhor às nossas condições de trabalho. No sentido de otimizar um sistema, onde fosse possível separar o aspartame e seus principais produtos de decomposição em uma única corrida cromatográfica, foram testados vários gradientes de fase móvel. Foram ainda testados diferentes concentrações e pH para o tampão KH_2PO_4 , diferentes vazões da fase móvel e diferentes comprimentos de onda.

Na otimização da metodologia adicionou-se além do APM, ACK, CAF e SAC, para evitar interferências com os produtos de decomposição AP, DKP e PHE. No Brasil, além do APM os edulcorantes ACK e SAC são utilizados em refrigerantes com o objetivo de atingir um efeito sinérgico e garantir a estabilidade da doçura. Dos edulcorantes citados todos podem ser determinados pelo método por CLAE proposto, com exceção do ciclamato, por apresentar fraca absorção na região do ultravioleta. Tsang et al. (1985), analisaram os refrigerantes canadenses, porque os refrigerantes norte-americanos continham uma mistura de APM e SAC. Esta escolha segundo os autores era para eliminar o pico largo da SAC que poderia interferir na detecção dos produtos de decomposição do APM.

As fases móveis foram compostas por diferentes concentrações de tampão KH_2PO_4 e MeCN. A proporção de MeCN na fase móvel variou de 0 a 30%. O pH do tampão de KH_2PO_4 variou de 3,00 a 4,50, e a concentração de 0,0100 a 0,500 mol L^{-1} . A vazão variou de 0,80 a 1,0 mL min^{-1} e os comprimentos de onda de detecção de 210 a 220 nm.

O comprimento de onda escolhido foi o de 210 nm, onde se obteve melhor sensibilidade para o APM e seus produtos de decomposição. Saito et al. (1989) também usaram este valor, enquanto Prodoliet & Bruelhart (1993 b) e Tsang et al. (1985), usaram 214 nm com o objetivo de detectar também os ácidos sórbico e benzóico. Saito et al. (1989), usando coluna C₁₈ Nucleosil 5 (5 µm, 250 × 4,6 mm), concluíram que a fase móvel composta por tampão KH₂PO₄ 0,01 mol L⁻¹(pH 4,0): MeCN (85:15, v/v), com vazão de 0,70 mL min⁻¹ e detecção a 210 nm, apresentou a melhor separação entre a CAF e a DKP.

Exceto pelo ASP e pelo MeOH que não são retidos pela coluna de fase reversa C₁₈, os valores de t_R e k de todos os padrões decresceram rapidamente quando a quantidade de MeCN era aumentada. O efeito foi menos pronunciado para ACK. Em todos os casos, o APM foi bem separado dos outros aditivos e das possíveis substâncias interferentes. Utilizando-se a eluição por gradiente A, neste estudo, não foi possível eluir o aspartame em menos de 40 minutos de corrida cromatográfica. A retenção de um composto na CLAE de fase reversa é função da hidrofobicidade, enquanto que a seletividade é controlada principalmente pela fase móvel (Jandera et al., 1982). Assim, enquanto que a CLAE de fase reversa é mais útil na separação de compostos apolares e não-iônicos, a análise de compostos ácidos ou básicos como o APM e seus produtos de decomposição é difícil devido à baixa resolução (Stamp & Labuza, 1989a).

O gradiente que apresentou melhor resolução dos picos foi composto por tampão KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,50): MeCN (95:5, v/v). A concentração de MeCN foi aumentando linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica. Após a corrida cromatográfica foram necessários 20 minutos, para eliminar os compostos retidos e que não eluíram e condicionamento da coluna, com a fase móvel composta por tampão KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,50): MeCN (95:5, v/v) antes da próxima injeção. Com o aumento da força do solvente de eluição ficou mais fácil a liberação dos compostos que ficaram mais fortemente retidos na coluna, possibilitando a eluição dos produtos de decomposição do

APM avaliados em uma mesma corrida cromatográfica. Para comparação entre as diferentes composições de fase móvel (Figura 2.2), foram utilizado os valores de k .

Assim, esta fase móvel também apresentou excelente separação para ACK, CAF e SAC. A fase móvel apropriada depende principalmente dos compostos e da complexidade da matriz. Por serem os valores de t_R e k de todos os compostos sensíveis à composição da fase móvel, são necessários cuidados no momento de sua preparação para obtenção de valores reprodutíveis. Prodoliet & Bruehlhart (1993a) usando uma coluna de C_{18} μ Bondapak (10 μ m, 300 \times 3,9 mm) e a fase móvel composta de KH_2PO_4 0,0125 mol L^{-1} (pH 3,5): MeCN (90:10, v/v), com vazão de 0,80 mL min^{-1} e detecção a 220 nm, apresentaram os seguintes valores de k para padrões PHE, ACK, SAC, AP, DKP, CAF e APM de 0,79, 0,94, 1,54, 1,76, 3,85, 4,72 e 8,72, respectivamente.

Em relação ao pH não houve muita diferença entre os valores de k dos compostos analisados quando o pH do tampão variou de 3,00 para 3,50. No entanto, o uso de fases móveis com pH variando de 3,50 a 6,50 é recomendado pelos fabricantes para aumentar a vida das colunas analíticas, além do que, o valor do pH dos refrigerantes geralmente é ao redor de 3,00. Para alguns padrões (APM, CAF e DKP), os valores de k em pH 4,50 apresentaram maiores diferenças do que os valores de k medidos com os outros valores de pH. Nestas condições, foram observadas distorções no pico de DKP, e o mais importante, foi que a resolução entre a PHE e a SAC foi baixa. Estes resultados podem ser observados na Figura 2.2.

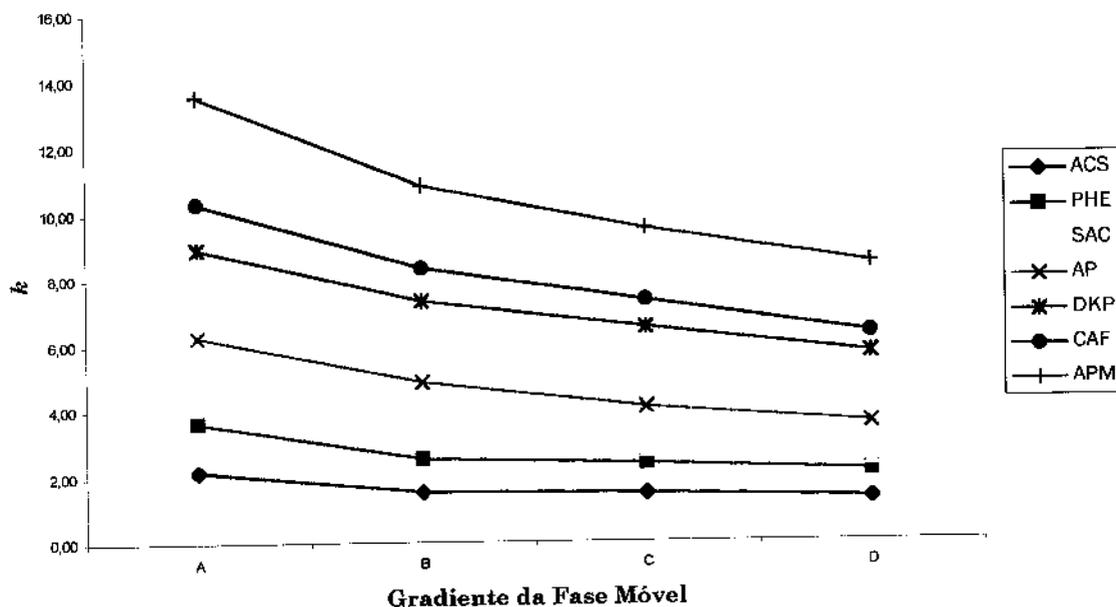


Figura 2.2: Efeito da concentração de acetonitrila na fase móvel nos fatores de retenção dos padrões diluídos em água.

A = Tampão KH_2PO_4 $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,50 (100%) com a concentração de MeCN aumentando linearmente até 20% em 40 minutos de corrida cromatográfica; B = Tampão KH_2PO_4 $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,50 (95%) com a concentração de MeCN de 5% aumentando linearmente até 25% em 40 minutos de corrida cromatográfica; C = Tampão KH_2PO_4 $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,50 (100%) com a concentração de MeCN aumentando linearmente até 25% em 40 minutos de corrida cromatográfica e D = Tampão KH_2PO_4 $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,50 (100%) com a concentração de MeCN aumentando linearmente até 30% em 40 minutos de corrida cromatográfica.

MeCN = acetonitrila, ACK = acesulfame-K, APM = aspartame, AP = aspartilfenilalanina, CAF = cafeína, DKP = dicetopiperazina, PHE = fenilalanina, SAC = sacarina e k' = fator de retenção ($k' = t_R - t_M / t_M$, onde t_R = tempo de retenção e t_M = tempo de retenção da fase móvel ou de um composto não retido pela fase estacionária). Valores de t_M = 2,87 min (fase móvel A), 2,82 min (fase móvel B), 2,73 min (fase móvel C) e 2,65 min (fase móvel D).

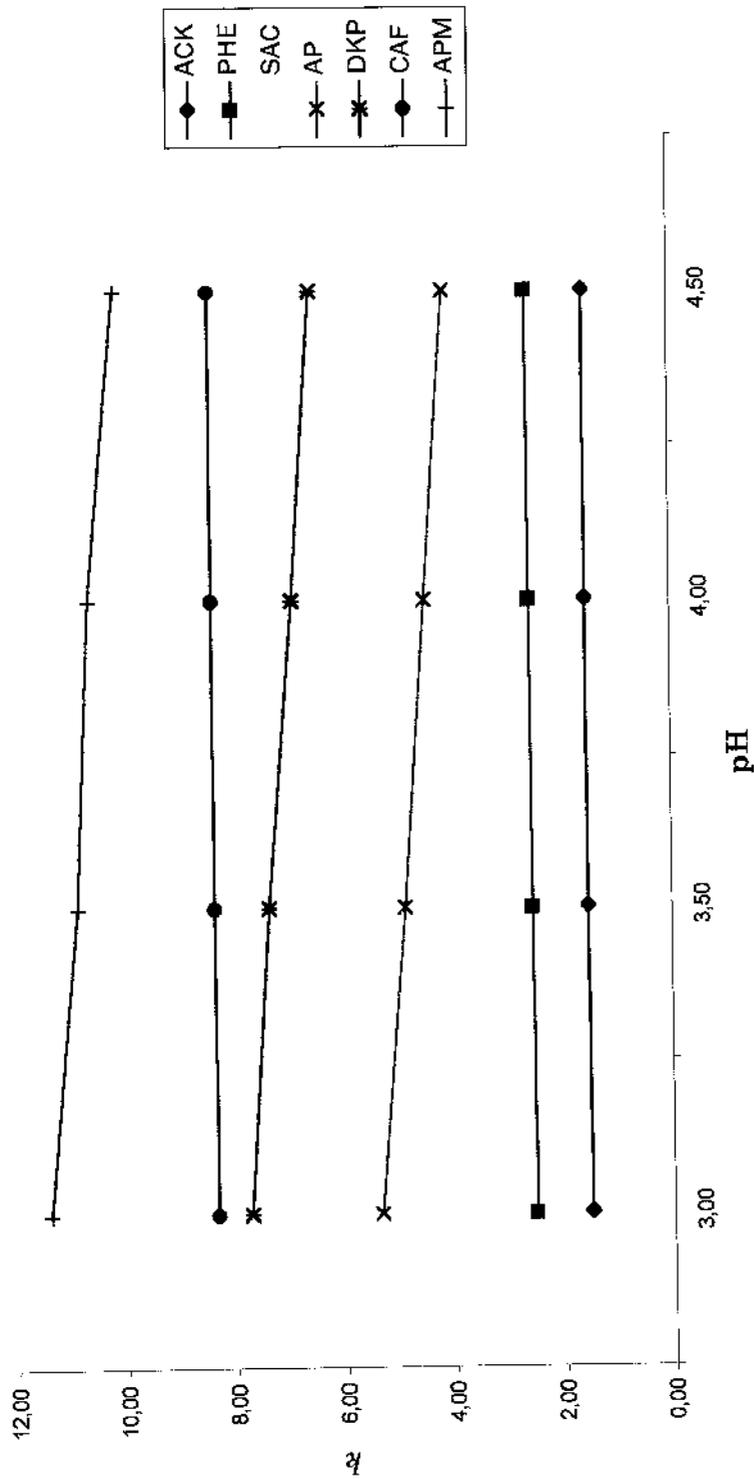


Figura 2.3: Efeito do pH da fase móvel nos fatores de retenção dos padrões diluídos em água.

ACK = acesulfame-K, APM = aspartame, AP = aspartilfenilalanina, CAF = cafeína, DKP = dicetopiperazina, PHE = fenilalanina, SAC = sacarina e k' = fator de retenção ($k' = t_R - t_M / t_M$, onde t_R = tempo de retenção e t_M = tempo de retenção da fase móvel ou de um composto não retido pela fase estacionária). Valores de t_M = 2,81 min (pH 3,00); 2,82 min (pH 3,50); 2,84 min (pH 4,00) e 2,85 min (pH 4,50).

O pH escolhido de 3,50 foi o mesmo utilizado por Prodolliet & Bruelhart (1993b) e Tsang et al. (1985). Saito et al. (1989) usaram pH 4,0, pois só se preocuparam com a determinação da DKP.

A concentração do tampão KH_2PO_4 de $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$, também foi utilizada por Prodolliet & Bruelhart (1993b) e Tsang et al. (1985), proporcionou uma melhor resolução e picos mais agudos. O estudo do efeito da variação da concentração do tampão na faixa de $0,0100$ a $0,500 \text{ mol L}^{-1}$, confirmou o resultado de Saito et al. (1989), que a concentração de $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ era satisfatória. O pequeno acréscimo da concentração do tampão tornou possível a variação do pH na faixa de 3,00 a 4,50, sem afetar a vida útil da coluna.

A vazão da fase móvel escolhida de $0,80 \text{ mL min}^{-1}$, também foi utilizada por Prodolliet & Bruelhart (1993b) e Tsang et al. (1985), porque manteve a pressão do sistema mais baixa, sem alterar muito os tempos de retenção dos padrões. Saito et al. (1989) utilizaram a vazão de $0,70 \text{ mL min}^{-1}$.

A Figura 2.4 mostra o cromatograma típico da solução de padrões dissolvidos em água contendo APM e seus produtos de decomposição AP, DKP e PHE, e também os outros componentes principais da matriz, ACK, CAF e SAC.

O cromatograma obtido com a coluna C_{18} Spherisorb™ ODS-2 (Supelco Inc.) apresentou a ordem de eluição: ACK, PHE, SAC, AP, DKP, CAF e APM. Prodolliet & Bruelhart (1993a) usando uma coluna C_{18} μ Bondapak (Waters Assoc.) mostrou a seguinte ordem de eluição: PHE, ACK, SAC, AP, DKP, CAF e APM. As diferenças no tipo e na concentração dos resíduos silanóis existentes nas colunas preparadas de várias maneiras e vendidas por companhias diferentes, podem ter diferenças nas retenções, principalmente com compostos polares, especialmente com bases ou espécies catiônicas (Snyder et al., 1988).

O presente trabalho apresentou as melhores condições de separação do APM e seus principais produtos de decomposição, AP, DKP e PHE pois conseguiu separá-los em uma mesma corrida cromatográfica com uma vantajosa redução no tempo de análise, comparando-se aos trabalhos publicados na literatura. Prodoliet & Bruelhart (1993b) utilizaram três diferentes composições de fase móvel para eluição do APM e seus compostos de decomposição. Iniciava-se o cromatograma com uma fase móvel composta por tampão KH_2PO_4 0,0125 mol L^{-1} (pH 3,50): MeCN (85:15, v/v) para a separação de APM e DKP, e outra fase móvel com a mesma composição, mas com outra proporção (98:2, v/v) para separação de AP e PHE. Para a separação de ACK, CAF e SAC, a proporção usada na fase móvel era de (80:20, v/v).

Identificação dos compostos: A identificação dos compostos analisados foi efetuada através da comparação dos valores de t_R e k estabelecidos com as amostras e os padrões, por co-cromatografia (adição de padrões à amostra analisada) e por comparação com os espectros de absorção no ultravioleta, obtidos no DAD (Anexos 1 a 7). A Figura 2.4 apresenta o cromatograma da solução dos padrões, dissolvidos em água.

Quantificação dos compostos: Sob as condições otimizadas do método, a linearidade foi determinada para os padrões de APM, AP, DKP e PHE. A resposta linear do detector (coeficiente de correlação, $r = 0,9997$) foi obtida para o APM em concentrações que variaram de 0,200 a 40,0 mg 100 mL^{-1} , para a DKP em concentrações que variaram de 0,100 a 10,0 mg 100 mL^{-1} e para a PHE, em concentrações que variaram de 0,0500 a 5,00 mg 100 mL^{-1} . Para a AP, a resposta linear do detector (coeficiente de correlação, $r = 0,9991$) foi obtida com concentrações que variaram de 0,0500 a 5,00 mg 100 mL^{-1} . As curvas analíticas dos padrões de APM e seus produtos de decomposição, estão apresentadas nos Anexos 8 a 11. A Figura 2.5 apresenta os cromatogramas do guaraná normal e do guaraná normal adicionado com os padrões. O cromatograma do guaraná normal, também se encontra no Anexo 12.

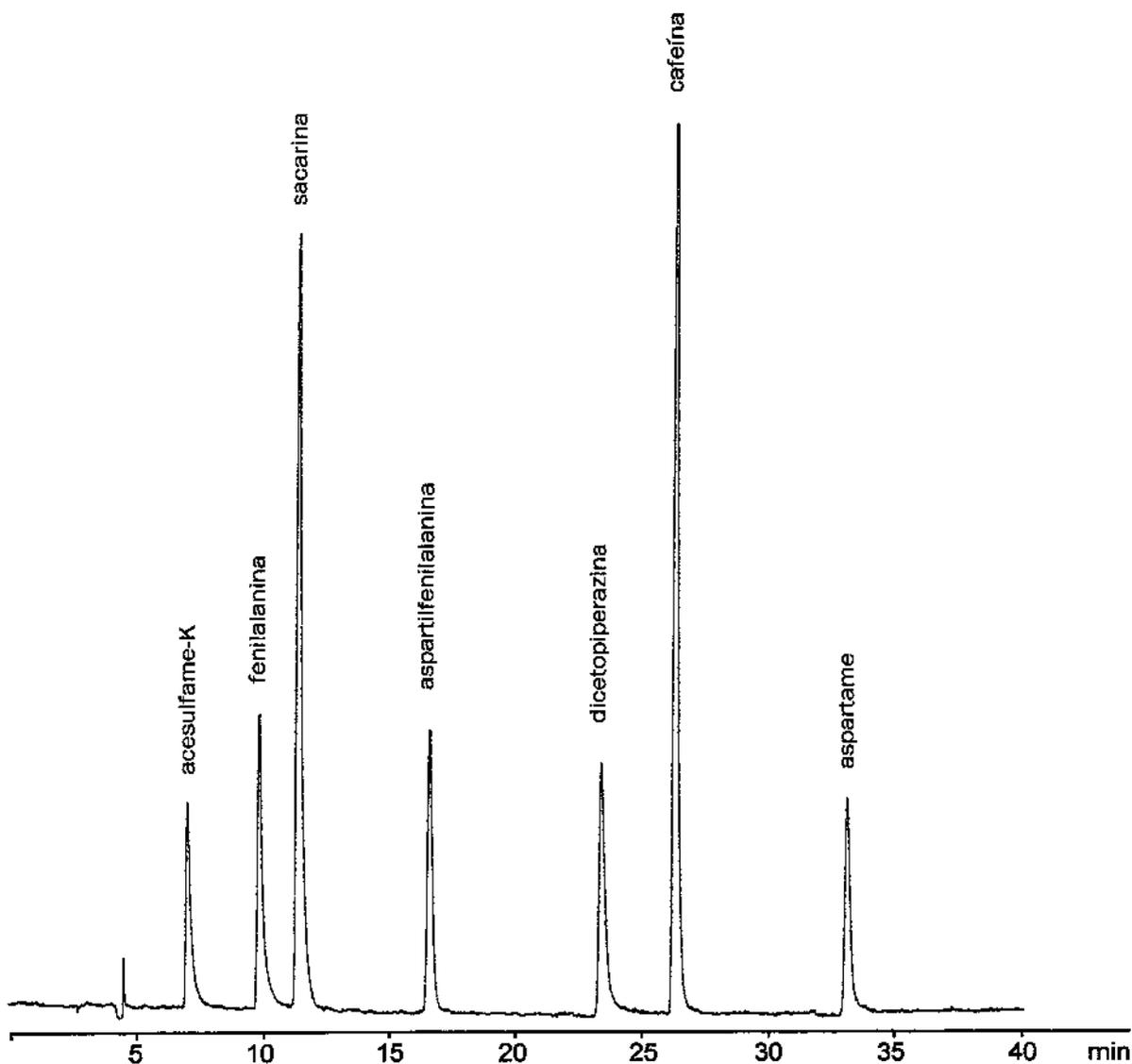


Figura 2.4: Cromatograma da solução dos padrões, dissolvidos em água.

Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ Spherisorb™ ODS-2 (5 μm, 250 × 4,6 mm). O gradiente da fase móvel foi iniciado por tampão KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,50): acetonitrila (95:5, v/v), a seguir a concentração de acetonitrila foi aumentando linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica. A detecção foi feita em 210 nm, usando detector por arranjo de diodos. O volume de injeção foi de 20,0 μL.

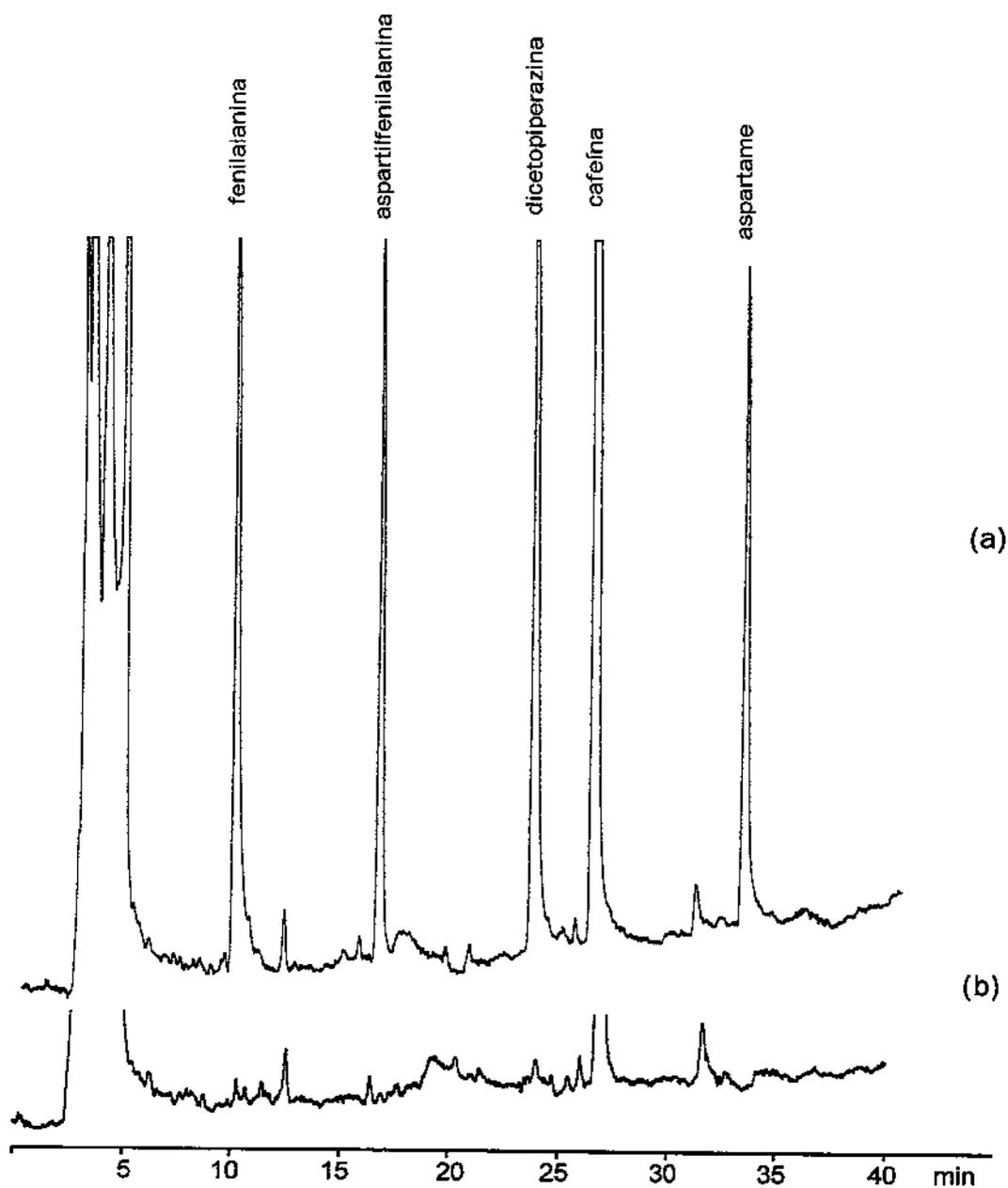


Figura 2.5: Cromatograma do guaraná normal com adição de padrões (a) e do guaraná normal (b).

Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ Spherisorb™ ODS-2 (5 μm, 250 × 4,6 mm). O gradiente da fase móvel foi iniciado por tampão KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,50): acetonitrila (95:5, v/v), a seguir a concentração de acetonitrila foi aumentando linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica. A detecção foi feita em 210 nm, usando detector por arranjo de diodos. O volume de injeção foi de 20,0 μL.

Recuperação: As recuperações dos padrões de APM e dos compostos de decomposição adicionados a guaraná normal estão representados na Tabela 2.2. As porcentagens de recuperação variaram de 99,0 a 100,0% e não foram influenciadas pela matriz do refrigerante ou pela quantidade de padrão adicionada.

Tabela 2.2: Recuperação do aspartame e produtos de decomposição adicionados a guaraná normal.

Padrões	Nível Adicionado (mg 100 mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Coefficiente de Variação (%)
APM	17,00	100,00	0,04
	8,50	99,90	0,07
AP	5,00	99,00	0,23
	2,50	99,30	0,43
DKP	10,00	99,80	0,09
	5,00	99,70	0,21
PHE	5,00	100,00	0,04
	2,50	99,90	0,08

APM = aspartame, AP = aspartilfenilalanina, DKP = dicetopiperazina e PHE = fenilalanina.

As recuperações obtidas no presente trabalho foram superiores as obtidas por Prodollet & Bruelhart (1993b) que obtiveram recuperações entre 96,1 a 105,0% e Saito et al. (1989) que obtiveram recuperações entre 96,0 a 99,8%.

Limites de Detecção e Repetibilidade: Os limites de detecção do método foram determinados com os padrões de APM, AP, DKP e PHE, dissolvidos em guaraná normal. Os limites de detecção, medidos com as soluções padrão foram definidos como a menor quantidade detectável, aproximadamente duas vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento e o coeficiente de variação da repetibilidade avaliada em quadruplicatas estão representados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Limites de detecção e quantificação para os padrões de aspartame e seus produtos de decomposição, segundo as condições de trabalho deste estudo.

Padrões	Limite de Detecção (mg 100 mL ⁻¹)	Limite de Quantifi- cação (mg 100 mL ⁻¹)	Coeficiente de Variação (%)
APM	0,040	0,080	0,13
AP	0,020	0,040	0,85
DKP	0,020	0,040	0,53
PHE	0,020	0,040	0,17

APM = aspartame, AP = aspartilfenilalanina, DKP = dicetopiperazina e PHE = fenilalanina.

2.6 CONCLUSÕES

O procedimento cromatográfico por CLAE de fase reversa, proposto neste estudo de otimização baseou-se principalmente na metodologia de Prodoliet & Bruelhart (1993b). A primeira modificação foi o uso de coluna de fase reversa C₁₈ (5 µm, 250 × 4,6 mm) Spherisorb™ ODS-2 (Supelco Inc.) ao invés da coluna C₁₈ (10 µm, 300 × 3,9 mm) µBondapak (Waters Assoc.), que modificou a ordem de eluição dos compostos para ACK, PHE, SAC, AP, DKP, CAF e APM, ao invés de PHE, ACK, SAC, AP, DKP, CAF e APM. A segunda alteração foi comprimento de onda de detecção, mudado de 214 para 210 nm, com o objetivo de melhorar a sensibilidade para o APM e seus produtos de decomposição. A terceira e principal mudança, foi a utilização da eluição por gradiente ao invés das três diferentes composições de fase móvel usadas para eluição do APM e seus compostos de decomposição (98:2, 80:20 e 85:15, v/v). A concentração do tampão KH₂PO₄, vazão e pH da fase móvel não foram alteradas.

As condições cromatográficas definidas neste estudo de otimização foram: coluna de fase reversa C₁₈ (5 µm, 250 × 4,6 mm,) Spherisorb™ ODS-2 (Supelco Inc.), eluição por gradiente composto por tampão KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,50): MeCN (95:5, v/v) com a concentração de MeCN aumentando linearmente até os 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica. A vazão da fase móvel foi de 0,8 mL min⁻¹. A detecção foi em 210 nm. Após a corrida foram necessários 20 minutos, para eliminar os compostos retidos e que não eluíram e condicionamento da coluna, com a fase móvel inicial antes da próxima injeção.

A metodologia analítica por CLAE proposta neste estudo para determinação de APM e seus principais produtos de decomposição em refrigerantes, pode ser empregado para análise em vários tipos de refrigerantes existentes no mercado brasileiro. A preparação da amostra é relativamente simples, consistindo apenas numa etapa de desgaseificação e filtração antes da injeção no

cromatógrafo. A eluição por gradiente de fase móvel em uma coluna de fase reversa é suficiente para eluir o APM e seus produtos de decomposição em uma única corrida cromatográfica, ao final de 40 minutos. Boas recuperações do APM e seus produtos de decomposição foram obtidas, indicando não haver perda do compostos durante a preparação da amostra e na separação cromatográfica. Esta técnica também pode ser usada na detecção de outros edulcorantes (ACK e SAC) e a CAF, na mesma corrida cromatográfica, sem interferir com o APM e seus produtos de decomposição.

Com os dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que este método é rápido, exato, preciso e sensível, identificando e quantificando o APM e seus produtos de decomposição com relativa facilidade e, é bem adaptado para controle de qualidade ou monitoramento de refrigerantes.

2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOUL-ENEIN, H., BAKR, S. A. Comparative study of the separation and determination of aspartame and its decomposition products in bulk material and diet soft drinks by HPLC and CE. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 20, n. 9, p. 1437-1444, May 1997.
2. CAULCUTT, R., BODDY, R. **Statistic for analytical chemists**. 1st ed. London: Chapman & Hall, 1983. 253 p.
3. FATIBELLO-FILHO, O., VIEIRA, I. C., GOUVEIA, S. T. G., CALAFATTI, S. A., GUARITÁ-SANTOS, A., J. M. Adoçantes Artificiais. *Química Nova*, v. 19, n. 3, p.248-260. 1996.
4. GIBBS, B. F., ALLI, I., MULLIGAN, C. N. Simple and rapid high-performance liquid chromatography method for the determination of aspartame and its metabolites in foods. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 725, n.2, p. 372-377, Feb. 1996.
5. HOMLER, B. E. Properties and stability of aspartame. *Food Technology*, Chicago, v. 38, n. 7, p. 50-55, July. 1984.
6. JANDERA, P., COLIN, H., GULOCHON, G. Interaction indexes for prediction of retention in reversed-phase chromatography. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 54, p. 435-441, 1982.
7. KVASNIČKA, F., A. Analysis of the sweetener aspartame by capillary isotachopheresis. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, n. 390, v. 1, p. 237-240, Mar. 1987.

8. LAWRENCE, J. F., IYENGAR, J. R. Liquid chromatographic determination of beta-aspartame in diet soft drinks, beverage powder and pudding mixes. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 404, n. 1, p. 261-266, Aug. 1987.
9. MACRAE, R. **HPLC in food analysis**. 2^a ed. London: Academic Press. 1990.
10. MAZUR, R. H. *Discovery of Aspartame* In: *Aspartame: physiology and biochemistry*, STEGINK, L. D., FILER, L. J. New York: Marcel Dekker, 1984, cap.1, p.3.
11. MAZUR, R. H.; SCHLATTER, J. M.; GOLDKAMP, A. H. Structure-taste relationships of some dipeptides. *Journal of American Chemical Society*, v. 91, n. 10, p. 2684-2691, May 1969.
12. MOTELLIER, S., WAINER, I. W. Direct stereochemical resolution of aspartame stereoisomers and their degradation products by high-performance liquid chromatography on a chiral crown ether based stationary phase. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 516, n. 2, p. 365-373, Sep. 1990.
13. NEIRYNCK, L., NOLLET, L. Determination of the stability of aspartame in soft drinks by reversed-phase liquid chromatography. *Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology*, v. 43, n.3, p.83-88, 1988.
14. PRODOLLIET, J., BRUELHART, M. Determination of acesulfame-K in foods. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, Arlington, v. 76, n. 2, p. 268-274, Mar./Apr. 1993a.
15. PRODOLLIET, J., BRUELHART, M. Determination of aspartame and its major decomposition products in foods. *Journal of Association of*

Official Analytical Chemists International, Arlington, v. 76, n. 2, p. 275-282, Mar/Apr. 1993b.

16. PRUDEL, M., DAVIDKOVÁ, E. Determination of the decomposition products of Usal in model systems and determination of dioxopiperazine in soft drinks by HPLC. *Die Nahrung*, Berlin, v. 29, n. 4, p. 381-389, 1985.
17. SAITO, K., HORIE, M., HOSHINO, Y., NOSE, N., NAKAZAWA H., FUJITA, M. Determination of diketopiperazine in soft drinks by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, Amsterdam, v. 12, n. 4, p. 571-582, Mar. 1989.
18. SCHERZ, J. C., MONTI, J. C., JOST, R. Analysis of the peptide sweetener aspartame by liquid chromatography. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, n. 177, v. 2, p. 124-128, Aug. 1983.
19. SNYDER, L. R., GLAJCH, J. L., KIRKLAND, J. J. **Practical hplc method development**. 1st ed. New York: John Wiley & Sons, 1988, 260 p.
20. STAMP, J. A., LABUZA, T. P. An ion-pair high performance liquid chromatographic method for the determination of aspartame and its decomposition products. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 54, n. 4, p. 1043-1046, Jul./Aug. 1989a.
21. STAMP, J. A., LABUZA, T. P. Mass spectrometric determination of aspartame decomposition products. Evidence for β -isomer formation in solution. *Food Additives and Contaminants*, v. 6, n. 4, p. 397-414, Oct./Dez. 1989b.
22. TSANG, W. S., CLARKE, M. A., PARRISH, F. W. Determination of aspartame and its breakdown products in soft drinks by reverse-phase chro-

- chromatography with UV detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, n. 33, n. 4, p. 734-738, Jul./Aug. 1985.
23. VERZELLA, G., BAGNASCO, G., MANGIA, A. Ion-pair liquid chromatography analysis of aspartame and related products. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, n. 349, v. 1, p. 83-89, Dec. 1985.
24. WRÓBEL, K. & WRÓBEL, K. Determination of aspartame and phenylalanine in diet soft drinks by high-performance liquid chromatography with direct spectrofluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 773, n.1-2, p. 163-168, Jun. 1997.

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO DE ASPARTAME E SEUS PRODUTOS DE DECOMPOSIÇÃO EM REFRIGERANTES POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

3.1 RESUMO

O método de cromatografia líquida utilizado para a determinação de aspartame e seus produtos de decomposição em refrigerantes, no presente trabalho, mostrou-se simples e adequado para as análises em refrigerantes de várias composições. As amostras (sabores cola, guaraná e limão) foram desgaseificadas e filtradas em filtro de celulose de 0,45 μm antes da análise, enquanto que as amostras sabores laranja foram centrifugadas por 15 minutos a 10 000 g e filtradas antes da análise. Uma alíquota de 20 μL do filtrado foi eluída através de uma coluna de fase reversa C_{18} SpherisorbTM ODS-2 usando eluição por gradiente de fase móvel composta por KH_2PO_4 0,0125 mol L^{-1} (pH 3,50): acetonitrila (95:5, v/v). A concentração de acetonitrila foi aumentada linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica, e a vazão da fase móvel foi de 0,80 mL min^{-1} . A detecção foi feita por detector por arranjo de diodos a 210 nm. Foram necessários 20 minutos de condicionamento da coluna com a fase móvel inicial antes da próxima injeção. A decomposição do aspartame apresentada pelos refrigerantes sabores cola A, cola B, laranja A, laranja B, guaraná e limão, foram de 22,22%, 34,96%, 41,46%, 51,74%, 36,03% e 37,54%, após 66, 44, 64, 148, 37 e 53 dias da fabricação, respectivamente. Os níveis de dicetopiperazina variaram de 0,56 a 6,70 mg 100 mL^{-1} , representando 4,57 a 20,91% do aspartame adicionado aos refrigerantes. Os níveis de aspartilfenilalanina variaram de 0,95 a 4,74 mg 100 mL^{-1} , representando 7,93 a 21,85% do aspartame adicionado aos refrigerantes. Os níveis de fenilalanina foram baixos em todas as amostras analisadas, variando de 0,13 a 0,51 mg 100 mL^{-1} , representado 0,60 a 2,54% do aspartame adicionado aos refrigerantes.

3.2 SUMMARY

The liquid chromatographic method for the determination of aspartame and its decomposition compounds in soft drinks, described in this work, was shown simple and adapted for soft drinks of several compositions. The samples (cola, guaraná and lemon) were homogenized, degassed and filtered in filters of cellulose of 0.45 μm , before the injection in the chromatograph. The samples of orange soft drinks were centrifuged at 10,000 g for 15 minutes before analysis using a reversed phase C_{18} Spherisorb™ ODS-2 column, gradient elution and a mobile phase of 0.0125 mol L^{-1} KH_2PO_4 buffer (pH=3.50): acetonitrile (95:5, v/v). The acetonitrile concentration was linearly increased up to a concentration of 25% in 40 min of chromatographic run. The mobile phase flow rate was 0.80 mL min^{-1} . Detection was effected using a diode array detector at 210 nm. Twenty minutes were necessary to condition the column to the initial mobile phase, before the next injection. The aspartame decomposition level found in cola A, cola B, orange A, orange B, guaraná and lemon soft drinks, had been 22.22%, 34.96%, 41.46%, 51.74%, 36.03% e 37.54%, after 66, 44, 64, 148, 37 e 53 days of manufacture, respectively. The dicetopiperazine levels found were from 0.55 to 6.70 mg 100 mL^{-1} , representing from 4.57 to 20.91% of the aspartame added to the soft drinks. Aspartilphenylalanine levels were from 0.95 to 4.74 mg 100 mL^{-1} , representing from 7.93 to 21.85% of the aspartame added. Phenylalanine levels were low in all the samples analyzed, being between 0.13 and 0.51 mg 100 mL^{-1} , representing from 0.60 to 2.54% of the added aspartame.

3.3 INTRODUÇÃO

O uso de adoçantes começou a se popularizar na década de 60, principalmente nos Estados Unidos. No Brasil, porém, até meados dos anos 80, o consumo de produtos dietéticos estava apenas associado a portadores de distúrbios orgânicos – a diabetes, em especial. Nessa época, alguns desses produtos eram considerados fármacos pela legislação brasileira e, teoricamente, comercializados sob orientação médica. Porém, mudanças na legislação, ocorridas ainda no final da década de 80, reformularam a classificação dos adoçantes, permitindo que invadissem as prateleiras dos supermercados.

A indústria da alimentação vem apostando no mercado promissor dos edulcorantes. Para se ter uma idéia, 250 dos 300 produtos com edulcorantes (refrigerantes, sobremesas, iogurtes) existentes no mercado hoje surgiram nos dois últimos anos. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos (ABIAD), em 1998 o faturamento no setor foi de US\$ 224 milhões (em 1990, essa cifra era de US\$ 55 milhões). E o aspartame (APM) é o edulcorante mais consumido no mundo (em segundo lugar vem o ciclamato de sódio) – preferido por cerca de 100 milhões de pessoas (Pereira & Stringueto, 1999). O APM ($C_{14}H_{18}N_2O_5$) ou N-L- α -aspartil-L-fenilalanina-1-metil éster é um dipeptídeo branco, cristalino, inodoro, de baixa caloria e com uma doçura de 180-200 vezes a da sacarose (Homler, 1984).

A estabilidade do APM está associada à sua identidade química como um éster dimetílico do dipeptídeo aspartilfenilalanina. Sua estrutura contém duas ligações – ligação éster e ligação peptídica – cuja estabilidade dependerá em qual sistema o aspartame será usado. A mais sensível destas ligações é a ligação éster, que sob certas condições de umidade, temperatura e pH, pode ser hidrolisada para produzir aspartilfenilalanina (AP), ou ciclohidrolisar para produzir a dicetopiperazina (DKP). O anel da DKP pode, por sua vez, abrir para

formar a AP, e finalmente a AP pode hidrolisar-se aos seus aminoácidos individuais. Como nenhum dos produtos de decomposição é doce, somente a perda da doçura é percebida – não há sabor residual. Como muitas reações químicas, a hidrólise e a ciclização do APM é rápida em altas temperaturas. A estabilidade a seco do APM (com 4,0 a 4,5% de umidade) é excelente. A estabilidade do APM em solução é uma função de três fatores: tempo, temperatura e pH. Com o tempo a uma dada temperatura, a decomposição aumenta, e similarmente com o aumento da temperatura para um dado tempo, a decomposição aumenta. A decomposição obedece a uma cinética simples de 1ª ordem. Em termos de pH, a maior estabilidade é verificada no intervalo entre pH=3 e pH=5, onde se encontra parcela significativa dos alimentos. A 25°C a estabilidade máxima observada é no pH 4,3 (Homler, 1984). Um esquema das reações de decomposição do APM, e seus respectivos isômeros estão representados na Figura 3.1 (Prodolliet & Bruelhart, 1993).

O aspartame tem seu uso permitido pela Legislação Brasileira com a função de edulcorante artificial (Brasil, 1988), no limite de 75 mg 100 mL⁻¹ para bebidas dietéticas (Resolução CNS/MS nº 4/88 de 21/06/88), e foi avaliado pelo Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização Mundial da Saúde (JECFA/WHO) em 1980, recebendo uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) numérica de 40 mg kg⁻¹ de peso corpóreo (JECFA/WHO, 1980). Comprovando o princípio básico da toxicologia, segundo o qual “tudo é tóxico, dependendo da dose”, o aspartame pode ser consumido diariamente, de forma segura por uma pessoa, durante toda a vida até o valor da IDA.

A técnica analítica mais utilizada a determinação do APM e seus produtos de decomposição em refrigerantes, é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Gibbs et al., 1996; Lawrence & Iyengar, 1987; Motellier & Wainer, 1990; Neiryck & Nollet, 1988; Prodolliet & Bruelhart, 1993; Prudel & Davidková, 1985; Saito et al., 1989; Scherz et al., 1983; Stamp & Labuza, 1989; Tsang et al., 1985; Wróbel & Wróbel, 1997).

Mello & Cecchi (1999) desenvolveram e validaram uma metodologia por CLAE, que além das vantagens de eficiência na separação, rapidez e simplicidade, permite a separação e quantificação do APM e seus principais produtos de decomposição AP, DKP e PHE em uma única corrida, utilizando eluição por gradiente.

Estudos realizados pela G. D. Searle, relacionados com a estabilidade do APM, indicaram que 50% do APM inicial se decompõem, nos refrigerantes a base de cola, após estocagem por 6 meses a 30°C. Em testes sensoriais realizados em colas comerciais armazenadas a 27°C, verificou-se perda da maior parte da doçura do refrigerante após 2 semanas de estocagem. A falta de estabilidade de refrigerantes adoçados com APM pode, portanto, ser um problema para o fabricante e para o consumidor, principalmente durante o verão, caso sejam armazenados à temperatura ambiente (Bakal, 1986). Vários testes mostraram que perdas superiores a 40% são toleradas antes que as bebidas tornem-se inaceitáveis (Wells, 1989).

Este trabalho teve o objetivo de determinar o APM e seus principais produtos de decomposição AP, DKP e PHE em refrigerantes utilizando a CLAE, e comparar os resultados com o conteúdo de APM declarado nos rótulos dos produtos. A escolha deste alimento se deve ao fato de ser um produto bastante consumido do país, e também por ser uma das principais aplicações do edulcorante APM.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 MATERIAL

As amostras analisadas neste trabalho, foram selecionadas pela escolha das marcas de refrigerantes disponíveis nos supermercados de Campinas, SP, no ano de 1999, nas quais constava em seus rótulos, a presença do edulcorante APM. Foram analisadas seis marcas de refrigerantes dos seguintes sabores: duas colas, duas laranjas, um guaraná e um limão, todas dentro do prazo de validade estipulado pelos fabricantes, que variavam de três a seis meses. As amostras permaneceram uma semana em suas embalagens originais, à temperatura ambiente até o momento da análise. Duas amostras de cada marca de refrigerante em embalagens plásticas descartáveis de 2 litros, do mesmo lote, foram analisadas em duplicata, sendo cada replicata representada pela média de três injeções no sistema cromatográfico.

3.4.2 PADRÕES

Soluções estoques individuais dos padrões de N-L- α -aspartil-L-fenilalanina-1-metil éster (aspartame, APM), N-L- α -aspartil-L-fenilalanina (aspartilfenilalanina, AP), L-fenilalanina (fenilalanina, PHE), 1,3,7-trimetilxantina anidra (cafeína, CAF), sal sódico do ácido o-sulfobenzóico (sacarina, SAC) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), sal potássico do 6-metil-1,2,3-oxatiazina-4(3H)-ona-2,2-dióxido (acesulfame-K, ACK) (Riedel-de-Häen Products) e ácido (2S-cis)-(-)-5-benzil-3,6-dioxo-2-piperazina etanóico (dicetopiperazina, DKP) (Aldrich Chemical Company) foram preparadas pesando-se 0,5 mg e dissolvendo-se em 100 mL de água desionizada. Os padrões foram dissolvidos em ultra-som por 15 minutos. Todos os padrões foram armazenados de

acordo com as especificações dos fabricantes, e as soluções estoque foram mantidas em temperatura de refrigeração.

3.4.3 REAGENTES E SOLVENTES

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico, exceto a acetonitrila (MeCN) $\text{H}_3\text{C-CN}$ (Omnisolv – EM SCIENCE) utilizada na preparação da fase móvel que era de grau cromatográfico. Mesmo assim, a MeCN foi filtrada em membrana HVLP 01300 de $0,45\ \mu\text{m}$ de diâmetro (Millipore Corporation, Milford, MA) e desgaseificada em banho de ultra-som.

A água utilizada nas soluções e na fase móvel foi destilada e desionizada no sistema de água ultrapura Milli-Q Plus, filtrada em membrana HA em éster de celulose, $0,45\ \mu\text{m}$ de poro e $47\ \text{mm}$ de diâmetro HAWP 04700 (Millipore Corporation, Milford, MA), desgaseificada em ultra-som.

A solução tampão foi preparada numa concentração de $0,0125\ \text{mol L}^{-1}$ de diidrogenofosfato ácido de potássio, KH_2PO_4 P.A.(Merck), com pH ajustado a 3,50 com ácido fosfórico, H_3PO_4 P.A. (Merck).

3.4.4 EQUIPAMENTOS

Cromatógrafo líquido: Bomba ternária modelo 9010 (Varian, Harbor City, CA) com amostrador de $20\ \mu\text{L}$ e um injetor manual tipo Rheodyne Inc. modelo 7125 (Cotati, CA). Detector policromático por arranjo de diodos (DAD) modelo 9065 (Varian, Harbor City, CA), operando com comprimento de onda de $210\ \text{nm}$, $0,1\ \text{AUFS}$. Integrador modelo 4400 (Varian, Harbor City, CA) com atenuação 8. Com coluna de fase reversa C_{18} Supelco (Supelco, Inc., Bellefonte, PA), $250 \times 4,6\ \text{mm}$, empacotada com Spherisorb™ ODS-2 (Phase Separations, Ltd.) de $5\ \mu\text{m}$. Coluna de guarda C_{18} , $10 \times 4,6\ \text{mm}$, empacotada com Bondesil™ no próprio laboratório.

Aparelho de filtração de solventes: As fases móveis foram filtradas através de um aparelho de filtração, todo em vidro (Millipore Corporation, Bedford, MA).

Aparelho de filtração das amostras: Todas as amostras foram filtradas em um aparelho em aço inox AA-Millipore (Millipore Corporation, Bedford, MA) antes da injeção.

Banho ultra-som: Microsonic SX 20 ou equivalente.

Purificador de água: sistema de ultrapurificação de água Millipore Milli-Q Plus (Millipore, Milford, MA).

pHmetro: Mettler Toledo modelo 320 com eletrodo In Lab 413 e sensor de temperatura Pt1000 ou equivalente.

Centrífuga: Beckman modelo J2-21 ou equivalente.

3.4.5 MÉTODOS

Preparo da amostra: Os refrigerantes sabores cola, guaraná e limão, após serem homogeneizados, foram colocados em banho ultra-som para degaseificação, por no mínimo 30 minutos, e filtrados em filtros de celulose de 0,45 μm antes da injeção no cromatógrafo. Os refrigerantes sabores laranja após a homogeneização foram centrifugados. Para isto, foram pesados 200 g de cada refrigerante e centrifugados por 15 minutos a 10 000 g, em temperatura ambiente. Após a centrifugação o sobrenadante foi degaseificado, filtrado em filtros de celulose de 0,45 μm , e injetado no cromatógrafo.

Análise do aspartame e seus produtos de decomposição: Para a análise do APM e seus produtos de decomposição AP, DKP e PHE foi utilizada a metodologia proposta por Mello & Cecchi (1999). Uma alíquota de 20 µL, das amostras filtradas, foi injetada no sistema cromatográfico. A eluição foi feita por um gradiente composto por tampão KH_2PO_4 0,0125 mol L⁻¹: MeCN (95:5, v/v). A concentração de MeCN foi aumentando linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica. A vazão da fase móvel foi de 0,8 mL min⁻¹. A detecção foi de 210 nm. Após a corrida foram necessários 20 minutos para condicionar a coluna com a fase móvel inicial, antes da próxima injeção.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de aspartame e seus produtos de decomposição: A identificação dos compostos analisados foi realizada através da comparação dos valores de tempo de retenção (t_R) e fator de retenção (k), estabelecidos com as amostras e os padrões, por comparação com os espectros de absorção (Anexos 1 a 7) obtidos pelo DAD. O método de quantificação dos compostos utilizado foi o da padronização externa, utilizando-se as áreas dos picos cromatográficos. Os cromatogramas dos padrões e das amostras dos refrigerantes analisados estão representados pelas Figuras 3.2 a 3.8.

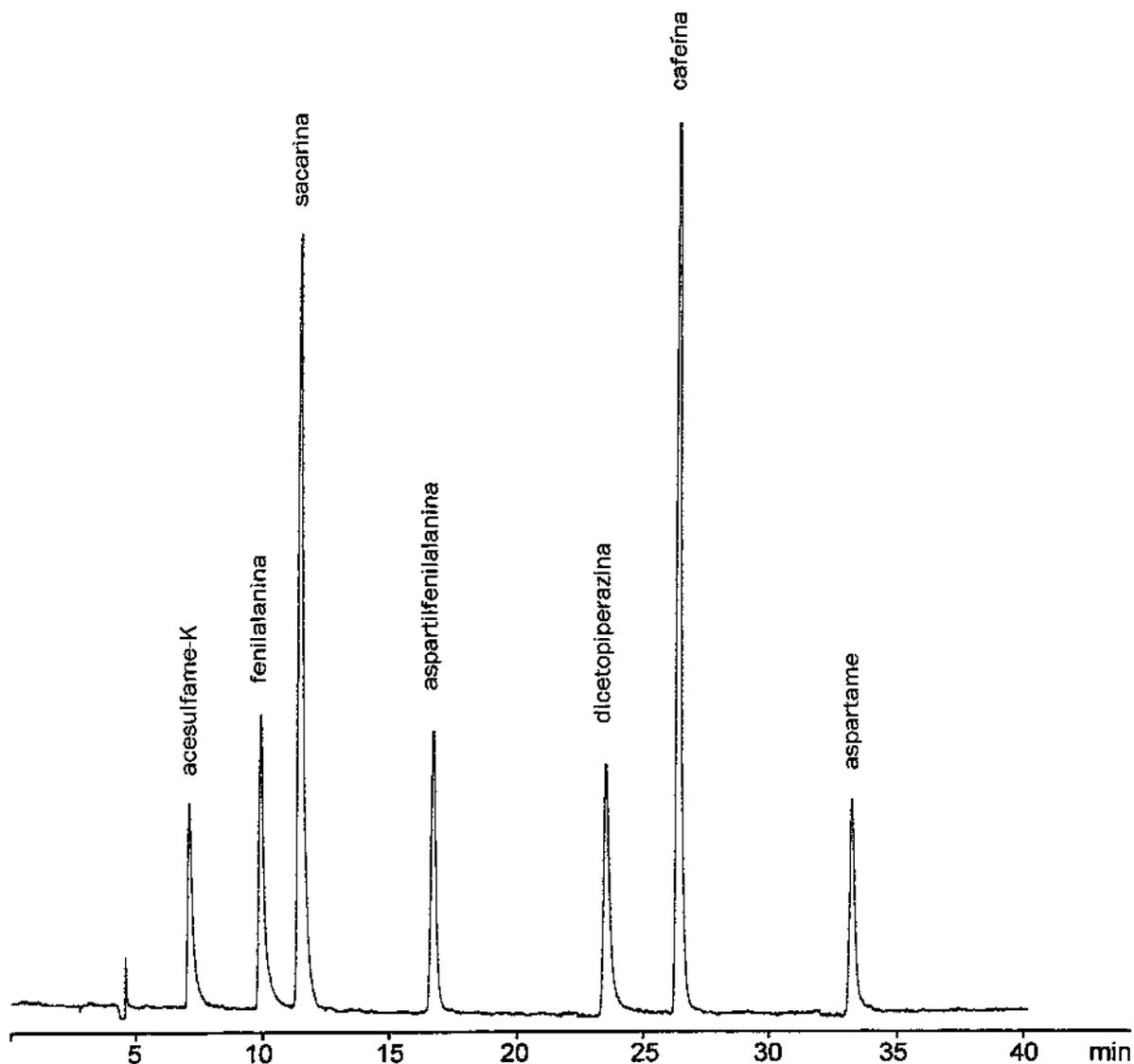


Figura 3.2: Cromatograma da solução dos padrões analisados.

Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ Supelco, 250 × 4,6 mm, empacotada com Spherisorb™ ODS-2 de 5 μm. A eluição por foi iniciada por tampão KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,50): acetonitrila (95:5, v/v), a seguir a concentração de acetonitrila foi aumentando linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica. A detecção foi feita em 210 nm, usando detector por arranjo de díodos. O volume de injeção foi de 20,0 μL.

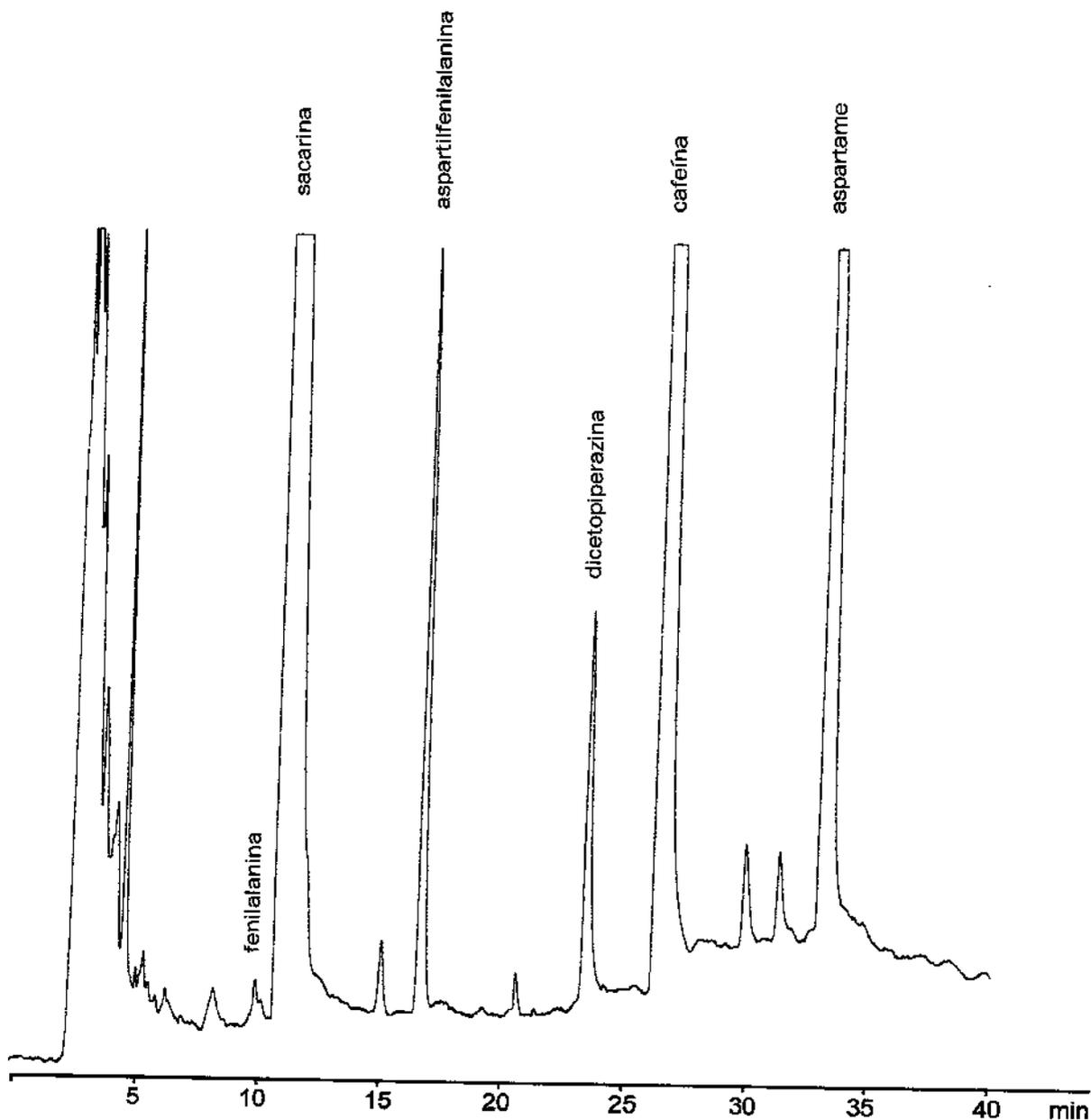


Figura 3.3: Cromatograma do refrigerante sabor cola A.

Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ Supelco, 250 × 4,6 mm, empacotada com Spherisorb™ ODS-2 de 5 μm. A eluição por foi iniciada por tampão KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,50): acetonitrila (95:5, v/v), a seguir a concentração de acetonitrila foi aumentando linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica. A detecção foi feita em 210 nm, usando detector por arranjo de diodos. O volume de injeção foi de 20,0 μL.

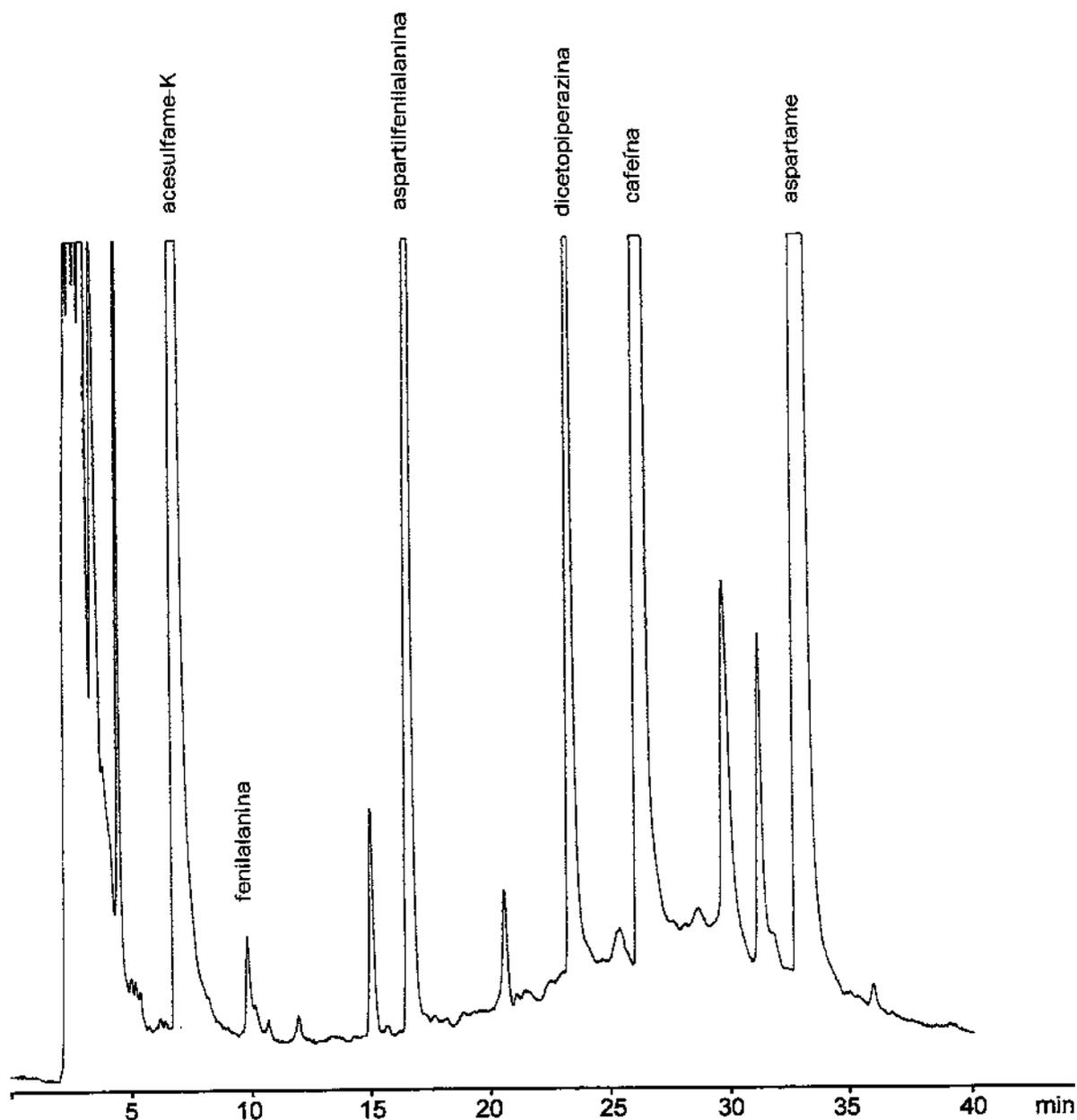


Figura 3.4: Cromatograma do refrigerante sabor cola B.

Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C_{18} Supelco, $250 \times 4,6$ mm, empacotada com Spherisorb™ ODS-2 de $5 \mu\text{m}$. A eluição por foi iniciada por tampão KH_2PO_4 $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,50): acetonitrila (95:5, v/v), a seguir a concentração de acetonitrila foi aumentando linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica. A detecção foi feita em 210 nm, usando detector por arranjo de diodos. O volume de injeção foi de $20,0 \mu\text{L}$.

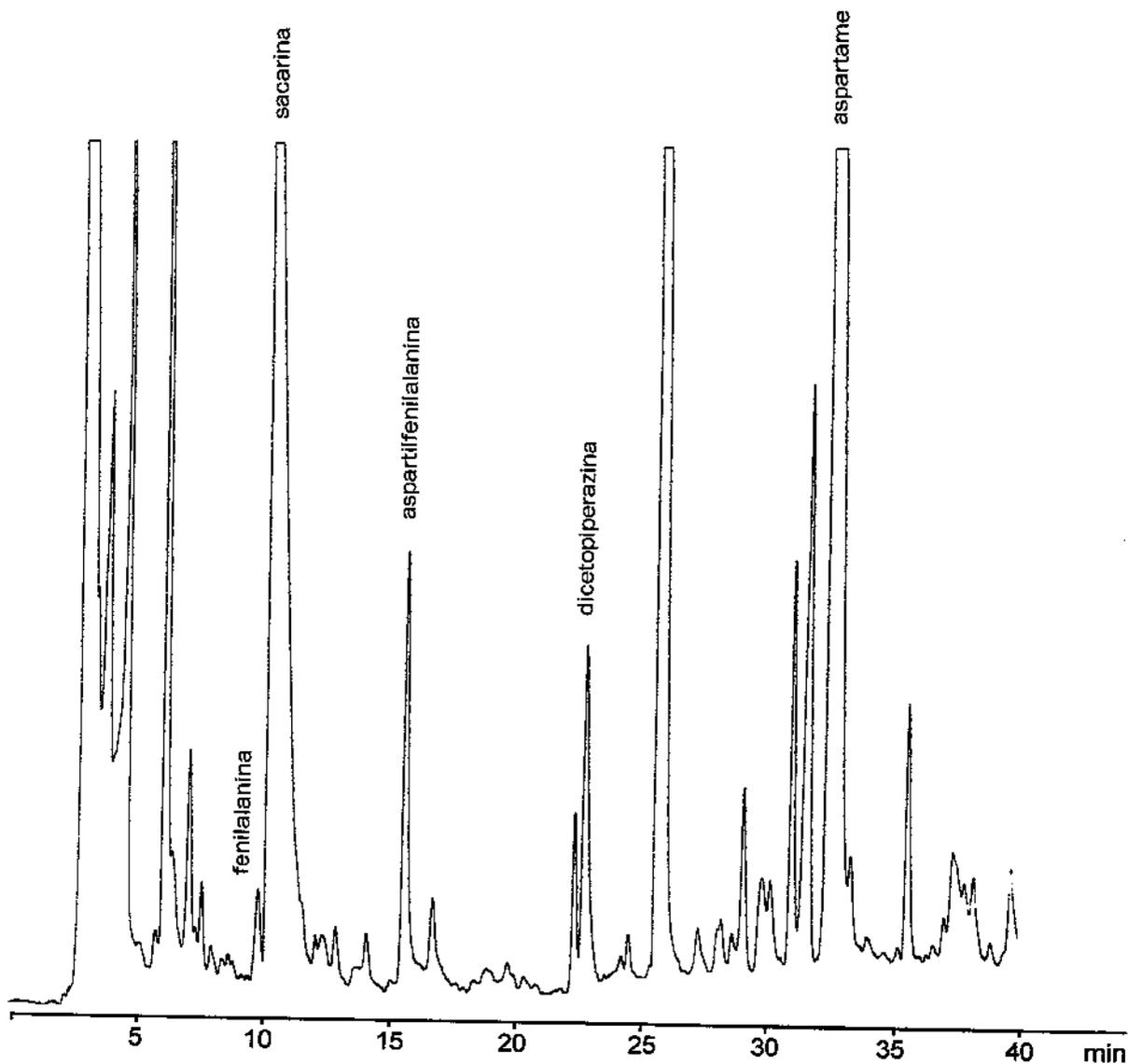


Figura 3.5: Cromatograma do refrigerante sabor laranja A.

Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ Supelco, 250 × 4,6 mm, empacotada com Spherisorb™ ODS-2 de 5 μm. A eluição por foi iniciada por tampão KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,50): acetonitrila (95:5, v/v), a seguir a concentração de acetonitrila foi aumentando linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica. A detecção foi feita em 210 nm, usando detector por arranjo de diodos. O volume de injeção foi de 20,0 μL.

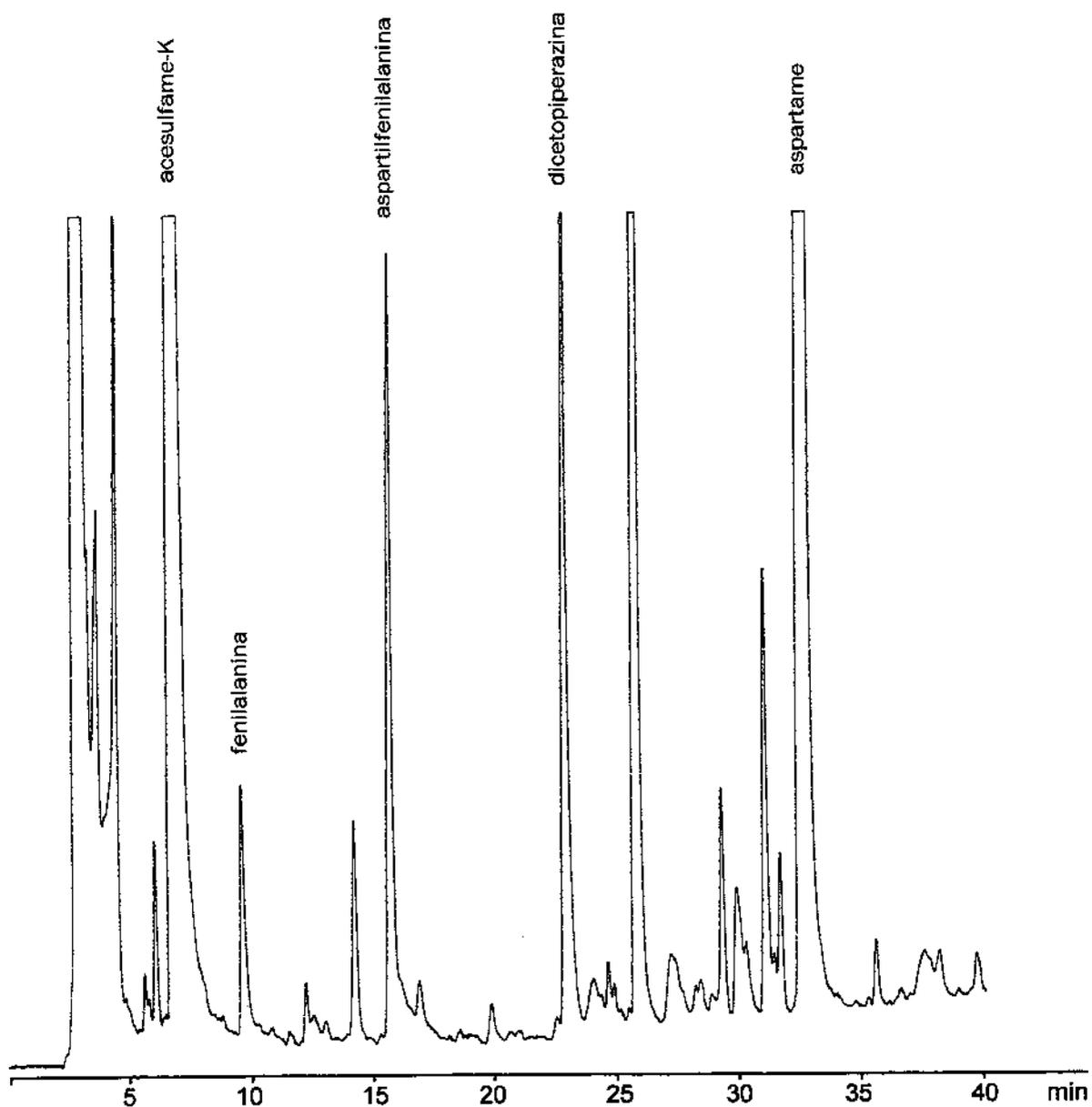


Figura 3.6: Cromatograma do refrigerante sabor laranja B.

Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ Supelco, 250 × 4,6 mm, empacotada com Spherisorb™ ODS-2 de 5 μm. A eluição por foi iniciada por tampão KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,50): acetonitrila (95:5, v/v), a seguir a concentração de acetonitrila foi aumentando linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica. A detecção foi feita em 210 nm, usando detector por arranjo de diodos. O volume de injeção foi de 20,0 μL.

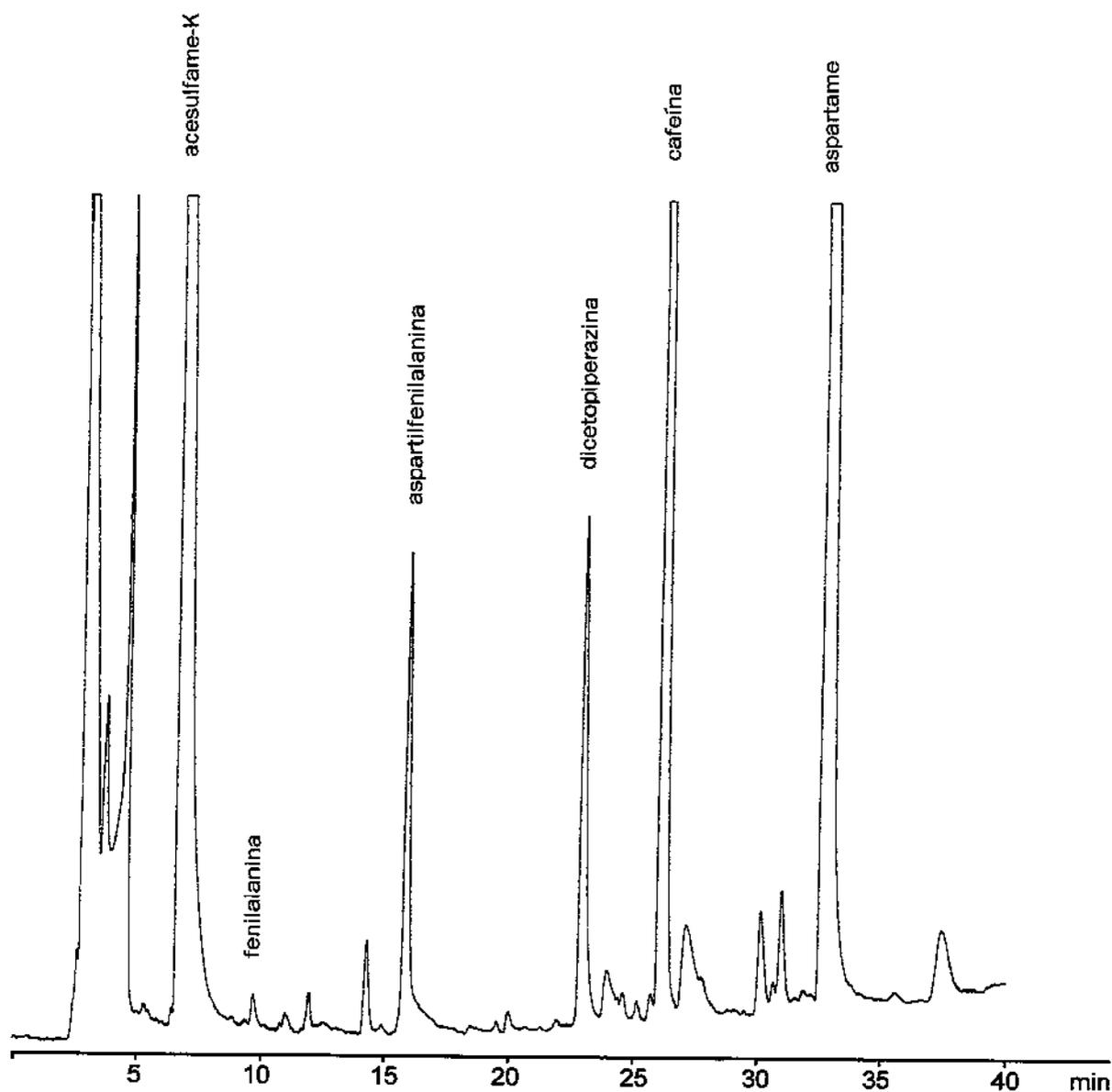


Figura 3.7: Cromatograma do refrigerante sabor guaraná.

Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ Supelco, 250 × 4,6 mm, empacotada com Spherisorb™ ODS-2 de 5 μm. A eluição por foi iniciada por tampão KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,50): acetonitrila (95:5, v/v), a seguir a concentração de acetonitrila foi aumentando linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica. A detecção foi feita em 210 nm, usando detector por arranjo de diodos. O volume de injeção foi de 20,0 μL.

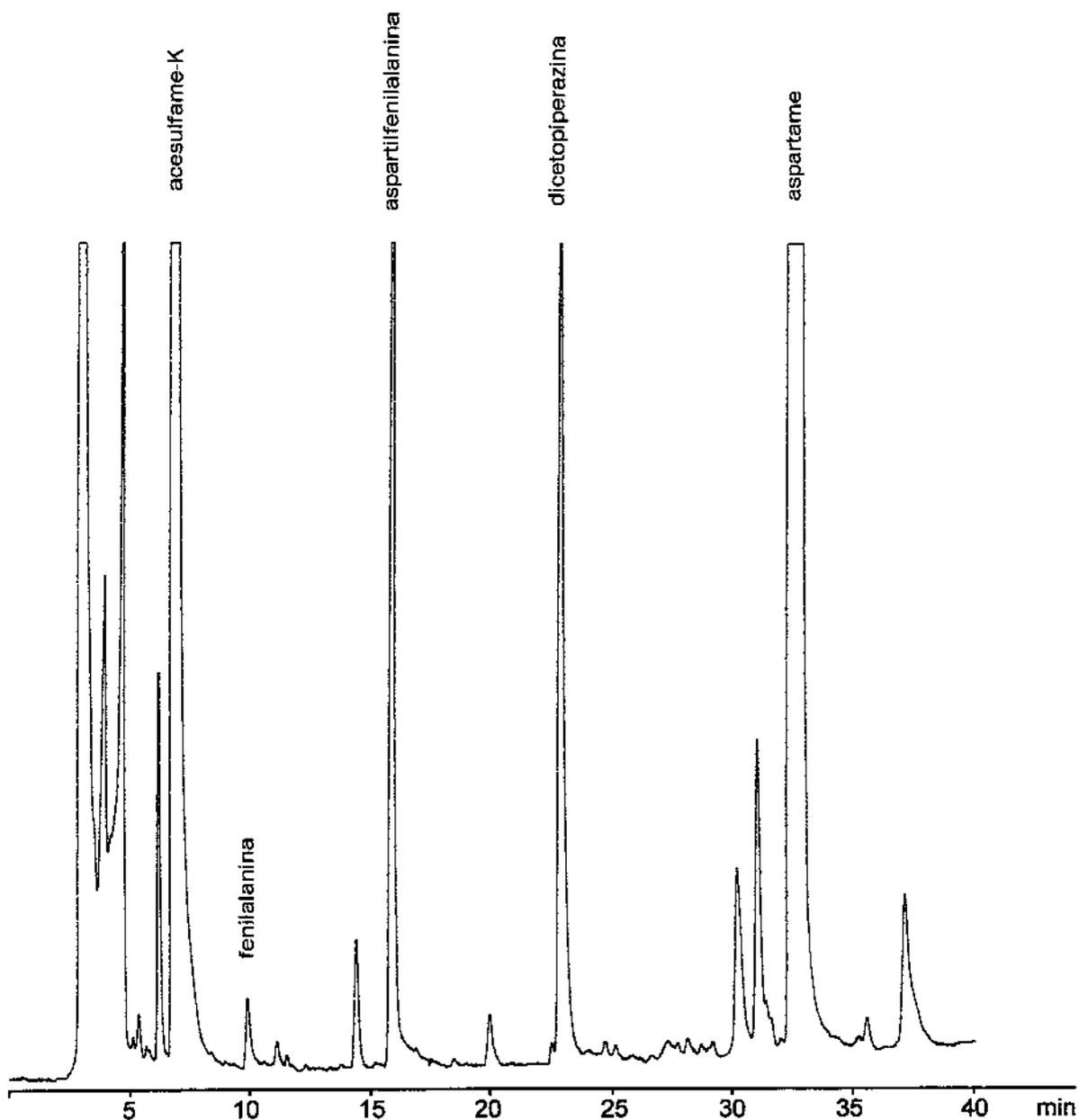


Figura 3.8: Cromatograma do refrigerante sabor limão.

Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ Supelco, 250 × 4,6 mm, empacotada com Spherisorb™ ODS-2 de 5 μm. A eluição por foi iniciada por tampão KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,50): acetonitrila (95:5, v/v), a seguir a concentração de acetonitrila foi aumentando linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica. A detecção foi feita em 210 nm, usando detector por arranjo de diodos. O volume de injeção foi de 20,0 μL.

A pureza dos picos foi acompanhada pelos seus espectros de absorção obtidos através do DAD, na faixa de comprimentos de onda do ultravioleta de 190 a 367 nm. Os parâmetros de pureza dos padrões de ACK, APM, AP, CAF, DKP, PHE e SAC estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Parâmetros de pureza dos picos dos padrões de aspartame, seus produtos de decomposição e de outros compostos da matriz.

Padrão	Parâmetro de Pureza (nm)	Coefficiente de Variação (%)
ACK	225,60 ± 0,01	0,006
APM	194,62 ± 0,04	0,007
AP	193,99 ± 0,02	0,009
CAF	214,63 ± 0,01	0,007
DKP	194,36 ± 0,02	0,007
PHE	192,71 ± 0,10	0,009
SAC	203,55 ± 0,01	0,006

ACK = acesulfame-K, APM = aspartame, AP = aspartilfenilalanina, CAF = cafeína, DKP = dicetopiperazina, PHE = fenilalanina e SAC = sacarina.

Os parâmetros de pureza dos picos cromatográficos, dos compostos identificados como ACK, APM, AP, CAF, DKP, PHE e SAC nos refrigerantes analisados estão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Parâmetros de pureza dos picos dos compostos identificados nos refrigerantes analisados.

Refrigerantes	Parâmetros de pureza (nm)						
	ACK	APM	AP	CAF	DKP	PHE	SAC
cola A	—	194,92±0,02	194,06±0,01	218,20±0,05	194,61±0,02	192,67±0,24	203,67±0,04
cola B	225,60±0,006	197,64±0,19	194,66±0,03	217,48±0,18	194,84±0,06	192,67±0,10	—
laranja A	—	195,95±0,14	194,84±0,03	—	194,90±0,02	200,35±1,94	202,06±0,04
laranja B	225,61±0,01	195,54±0,06	194,08±0,02	—	194,56±0,03	192,62±0,02	—
guaraná	225,61±0,01	195,03±0,09	193,81±0,03	214,63±0,01	194,40±0,02	192,72±0,10	—
limão	225,61±0,01	197,86±0,08	194,18±0,01	—	194,57±0,03	193,15±0,02	—

ACK = acesulfame-K, APM = aspartame, AP = aspartilfenilalanina, CAF = cafeína, DKP = dicetopiperazina, PHE = fenilalanina e SAC = sacarina.

Comparando-se os valores obtidos nas Tabelas 3.1 e 3.2, os resultados sugerem que os picos analisados correspondem a um mesmo composto, estando assim sem a presença de interferentes, pois os comprimentos de onda de absorção máxima apresentaram pequenas variações. Apenas a PHE, na amostra de laranja A, teve seu resultado de pureza com valor ligeiramente maior do que o valor médio do padrão, indicando haver mistura dos dois compostos adjacentes, PHE e SAC. O cromatograma da Figura 3.5 demonstra que a separação completa entre estes dois compostos foi menos eficiente, devido a grande diferença de quantidades entre eles, pois a PHE está em quantidade muito pequena (menor produto de decomposição) em relação a SAC, que se apresenta em grande quantidade.

Os picos que aparecem no mesmo valor de t_R da CAF nos cromatogramas dos refrigerantes com sabor de laranja, são interferentes da matriz. No refrigerante sabor laranja A o parâmetro de pureza deste pico foi de $230,95 \pm 0,09$, e no refrigerante sabor laranja B foi de $230,77 \pm 0,03$, valores muito diferentes do parâmetro de pureza do padrão da CAF que é de $214,51 \pm 0,01$. Além disto, os espectros de absorção destes picos não foram semelhantes ao do padrão de CAF (Anexo 4).

A quantificação dos compostos foi realizada através do método da padronização externa, utilizando-se a áreas dos picos. Sob as condições otimizadas do método, a resposta linear do detector (coeficiente de correlação, $r = 0,9997$) foi obtida para o APM em concentrações que variaram de 0,2 a 40,0 mg 100 mL⁻¹, para a DKP em concentrações que variaram de 0,1 a 10,0 mg 100 mL⁻¹ e para a PHE, em concentrações que variaram de 0,05 a 5,0 mg 100 mL⁻¹. Para a AP, a resposta linear do detector (coeficiente de correlação, $r = 0,9991$) foi obtida com concentrações que variaram de 0,05 a 5,0 mg 100 mL⁻¹. Os limites de quantificação variaram de 0,040 a 0,080 mg 100 mL⁻¹. As curvas analíticas dos padrões de APM, AP, DKP e PHE estão apresentadas nos Anexos 8 a 11, respectivamente.

Os resultados obtidos da análise de APM e seus produtos de decomposição em diferentes marcas de refrigerantes estão apresentados na Tabela 3.3, e as proporções encontradas, em cada refrigerantes analisado, estão representadas pelas Figuras 3.9 e 3.10.

Todos os produtos analisados apresentaram quantidade de APM de acordo com a legislação em vigor, já que o limite máximo de APM permitido pela Legislação Brasileira é de 75 mg 100 mL⁻¹ em bebidas dietéticas (Brasil, 1988). Em todas as amostras analisadas, os níveis de APM encontrados foram menores que 80% do declarado no rótulo.

A decomposição do APM aumentou com o tempo de estocagem. Os refrigerantes apresentaram decomposição entre 22,22 e 51,74%. Os refrigerantes cujos fabricantes estipulam prazo de validade entre 120 a 180 dias, apresentaram maior decomposição, pois eles também foram analisados com maior tempo de fabricação (64 e 148 dias) em relação aos outros refrigerantes (37, 44, 53 e 66 dias).

O refrigerante sabor laranja B, que apresentou a maior decomposição do APM (51,74%), é também aquele cujo fabricante estipula o maior prazo de validade dentre os refrigerantes analisados. Vários testes mostraram que perdas superiores a 40% são toleradas antes que as bebidas tornem-se inaceitáveis (Wells, 1989). Os resultados sugerem então, uma redução no prazo de validade deste refrigerante.

Tabela 3.3: Análise de aspartame e seus produtos de decomposição em diferentes marcas de refrigerantes.

Sabor	Validade (dias)	Análise (dias) ¹	pH	APM (mg 100 mL ⁻¹)		Em relação ao rótulo (%)	DKP (mg 100 mL ⁻¹)	AP (mg 100 mL ⁻¹)	PHE (mg 100 mL ⁻¹)
				Declarado	Encontrado				
cola A	90	66	2,90	12,00	9,33±0,01	77,78	0,558±0,003	0,952±0,003	0,133±0,001
C.V. (%)					0,13		0,56	0,28	0,75
cola B	90	44	2,72	34,96	22,74±0,01	65,04	6,697±0,003	4,431±0,001	0,227±0,001
C.V. (%)					0,05		0,04	0,02	0,44
laranja A	120	64	3,81	17,10	10,01±0,02	58,54	1,677±0,009	2,965±0,010	0,276±0,001
C.V. (%)					0,23		0,57	0,29	0,55
laranja B	180	148	3,61	20,00	9,65±0,01	48,26	4,182±0,004	4,370±0,004	0,509±0,002
C.V. (%)					0,15		0,11	0,09	0,41
guaraná	120	37	3,55	17,00	10,87±0,01	63,97	2,481±0,003	2,452±0,008	0,157±0,003
C.V. (%)					0,10		0,12	0,31	1,68
limão	90	53	3,43	34,92	21,81±0,02	62,46	4,926±0,004	4,737±0,006	0,211±0,004
C.V. (%)					0,09		0,07	0,12	1,92

⁽¹⁾ Data de análise em relação à fabricação. APM = aspartame, AP = aspartilfenilalanina, DKP = dicetopiperazina e PHE = fenilalanina. Todos os resultados são valores médios de determinações em triplicatas.

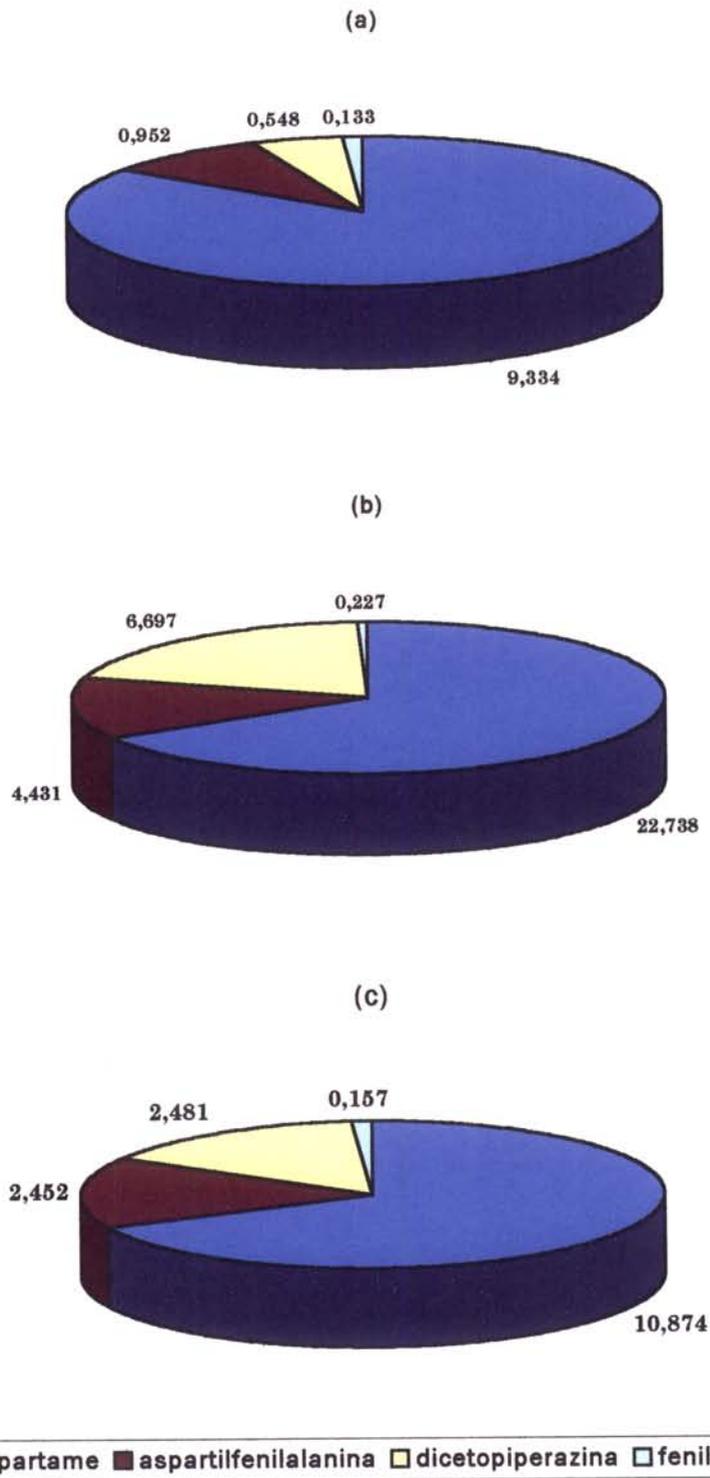


Figura 3.8: Proporções encontradas (mg 100 mL⁻¹) de aspartame e seus produtos de decomposição nos refrigerantes sabores cola A (a), cola B (b) e guaraná (c).

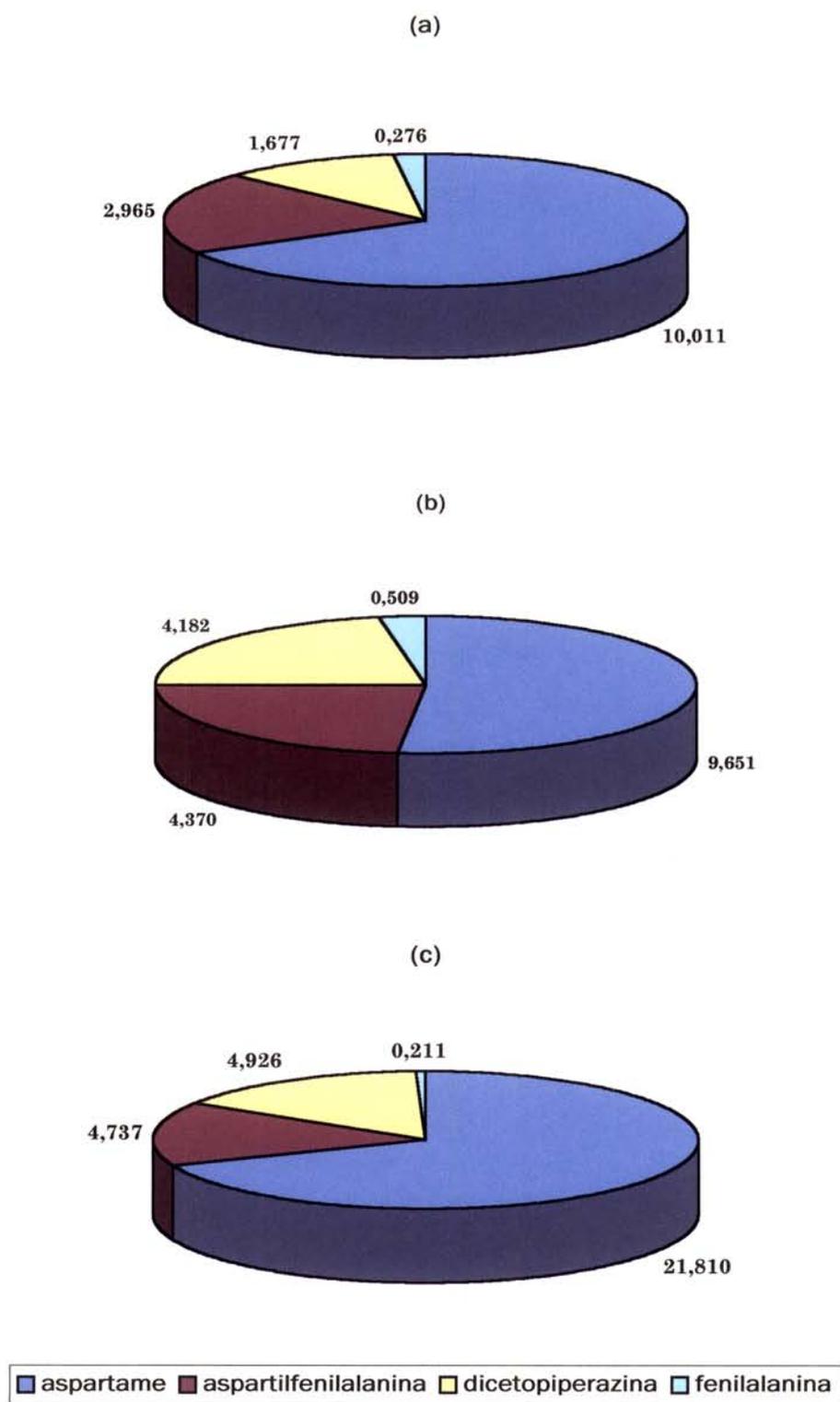


Figura 3.9: Proporções encontradas ($\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$) de aspartame e seus produtos de decomposição nos refrigerantes sabores laranja A (a), laranja B (b) e limão (c).

Pela Tabela 3.3, também se pode observar que os refrigerantes que apresentaram valor de pH próximo a 4,0, (3,81 e 3,61) foram os que sofreram maior decomposição do aspartame, ou seja, os refrigerantes sabores laranja. Os refrigerantes que apresentaram pH abaixo de 3,0, (2,90 e 2,72) sabor cola, sofreram menor decomposição. Segundo Homler (1984), a estabilidade máxima do APM, a 25°C é máxima em pH 4,3, porém as análises dos refrigerantes sabores cola A, cola B, laranja A e laranja B, foram realizadas após 66, 44, 64 e 148 dias da fabricação, respectivamente. Assim pode-se concluir que os fatores tempo e pH são mutuamente suplementares na decomposição do APM.

A AP, DKP e PHE foram encontradas em todas as amostras analisadas. A formação destes compostos foi atribuída principalmente a decomposição do APM, assumindo que o conteúdo natural destes nos refrigerantes é pequeno. Esta pequena quantidade inicial de decomposição pode ser devido a impurezas do APM adicionado e/ou a decomposição ocorrida durante a fabricação do refrigerante. Considerando-se que o valor declarado foi realmente aquele adicionado ao produto, em todos os refrigerantes ocorreu decomposição do APM, sendo que em refrigerantes com sabor laranja a decomposição foi particularmente maior (laranja A, 41,46% e laranja B, 51,74%). O refrigerante que apresentou o menor nível de decomposição foi o sabor Cola A (22,22%).

Os níveis de DKP encontrados variaram de 0,55 a 6,70 mg 100 mL⁻¹, foram muito superiores que os encontrados por Saito et al. (1989), que analisando refrigerantes, verificaram DKP presente em seis amostras comerciais em níveis que variaram de 0,10 a 0,26 mg 100 mL⁻¹. As quantidades de DKP e AP, encontradas no refrigerante sabor laranja B foram extremamente elevadas, 4,18 mg 100 mL⁻¹ (20,91% do APM adicionado) e 4,37 mg 100 mL⁻¹ (21,85% do APM adicionado), respectivamente. O que sugere ter havido uma decomposição química do APM no produto final. Em um trabalho realizado por Saito et al. (1989), foi

analisada a presença de DKP em refrigerantes estocados em diferentes temperaturas. No refrigerante estocado por 2 meses em temperatura ambiente (25-27°C), a concentração de DKP aumentava significativamente quando aumentava o tempo de estocagem, chegando a aumentar em 4 vezes a concentração inicial. No refrigerante estocado a 4-5°C por 2 meses, a concentração de DKP se mantinha inalterada. A concentração de DKP, encontrada no refrigerante sabor limão no presente trabalho, foi de 14,11% da quantidade total de APM adicionada ao refrigerante. Estes resultados são muito superiores aos encontrados por Aboul-Enein & Bakr (1997), que encontraram concentração de 4 a 5% de DKP quando analisaram refrigerantes com sabor limão. Segundo Tsang et al. (1985) a DKP e AP, respectivamente, são os maiores produtos de decomposição encontrados em refrigerantes estocados por períodos longos, no entanto, os resultados encontrados no presente trabalho mostraram que, o maior nível de DKP foi encontrado apenas no refrigerante com sabor cola B, enquanto que as quantidades de AP foram superiores para a cola A e laranja A, e praticamente iguais para laranja B, guaraná e limão. Isto também deve ser devido aos diferentes prazos de validade propostos para cada refrigerante, pois dependendo da data de fabricação, a decomposição deve estar também em diferentes estágios.

Os níveis de PHE medidos foram baixos em todas as marcas de refrigerantes analisadas. Segundo Tsang et al. (1985) os níveis de PHE aumentam significativamente após os 6 meses de estocagem. O nível de 0,509 mg 100 mL⁻¹ encontrado no refrigerante sabor laranja B foi, praticamente o dobro em relação aos outros refrigerantes, mas o tempo de fabricação foi mais que o dobro (148 dias) em relação aos outros (37 a 66 dias).

3.6 CONCLUSÕES

Em todos os refrigerantes analisados, a quantidade de APM, apresentou-se de acordo com a legislação em vigor.

Todos os refrigerantes analisados apresentaram os três produtos de decomposição do APM, DKP, AP e PHE, porém, em quantidades diferentes que dependeram do tempo de fabricação da cada produto, mas todos ainda dentro do prazo de validade.

Baseando-se nos resultados apresentados no presente trabalho, devemos alertar que, refrigerantes adoçados com APM podem perder sua doçura por causa da decomposição deste edulcorante, se eles não forem transportados e armazenados adequadamente. A falta de estabilidade de refrigerantes adoçados com APM pode portanto, ser um problema para o fabricante e para o consumidor, principalmente durante o verão.

Tempo e temperatura de estocagem têm sido considerados fatores determinantes na estabilidade do APM durante a estocagem de refrigerantes que os contêm. Considerando-se a extensão do Brasil, sua grande oscilação climática e o hábito do consumidor e comerciantes de manterem gêneros alimentícios em estoque, os refrigerantes adoçados com APM são mais susceptíveis à degradação.

Os resultados apontam para a necessidade de um controle maior das indústrias no que diz respeito ao transporte, estocagem e redução dos prazos de validade de alguns refrigerantes.

3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOUL-ENEIN, H., BAKR, S. A. Comparative study of the separation and determination of aspartame and its decomposition products in bulk material and diet soft drinks by HPLC and CE. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 20, n. 9, p. 1437-1444, May 1997.
2. BAKAL, A. I. Mixed sweetener functionality. In: NABORS, L. O., GELARDI, R. C. *Alternative Sweeteners*. New York: Marcel Dekker Inc. 1986. p. 325-346.
3. BRASIL. Leis, decretos, etc. – Resolução nº 04/88 do Conselho Nacional de Saúde. Aprova a revisão das tabelas I, III, IV e V referente a aditivos intencionais em alimentos. Diário Oficial, Brasília, 19 de dezembro de 1988. Seção I, pt. I, p. 24716.
4. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES; WORLD HEALTH ORGANIZATION, JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. *WHO Food Additives Series*, n. 15, 1980, 151 p.
5. GIBBS, B. F., ALLI, I., MULLIGAN, C. N. Simple and rapid high-performance liquid chromatography method for the determination of aspartame and its metabolites in foods. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 725, n.2, p. 372-377, Feb. 1996.
6. HOMLER, B. E. Properties and stability of aspartame. *Food Technology*, Chicago, v. 38, n. 7, p. 50-55, July. 1984.
7. LAWRENCE, J. F., IYENGAR, J. R. Liquid chromatographic determination of beta-aspartame in diet soft drinks, beverage powder and pudding

- mixes. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 404, n. 1, p. 261-266, Aug. 1987.
8. MELLO, M. A., CECCHI, H. M. **Otimização de metodologia analítica para determinação de aspartame e seus produtos de degradação em refrigerantes.** (Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas). 1999 (ver capítulo 2).
 9. MOTELLIER, S., WAINER, I. W. Direct stereochemical resolution of aspartame stereoisomers and their degradation products by high-performance liquid chromatography on a chiral crown ether based stationary phase. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 516, n. 2, p. 365-373, Sep. 1990.
 10. NEIRYNCK, L., NOLLET, L. Determination of the stability of aspartame in soft drinks by reversed-phase liquid chromatography. *Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology*, v. 43, n.3, p.83-88, 1988.
 11. PEREIRA, C., STRINGUETO, K. Adoçantes na rede. *ISTOÉ*, São Paulo, n. 1564, p. 54-55, Set. 1999.
 12. PRODOLLIET, J., BRUELHART, M. Determination of aspartame and its major decomposition products in foods. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, Arlington, v. 76, n. 2, p. 275-282, Mar/Apr. 1993.
 13. PRUDEL, M., DAVIDKOVÁ, E. Determination of the decomposition products of Usal in model systems and determination of dioxopiperazine in soft drinks by HPLC. *Die Nahrung*, Berlin, v. 29, n. 4, p. 381-389, 1985.
 14. SAITO, K., HORIE, M., HOSHINO, Y., NOSE, N., NAKAZAWA H., FUJITA, M. Determination of diketopiperazine in soft drinks by high per-

- formance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, Amsterdam, v. 12, n. 4, p. 571-582, Mar. 1989.
15. SCHERZ, J. C., MONTI, J. C., JOST, R. Analysis of the peptide sweetener aspartame by liquid chromatography. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, Berlin, n. 177, v. 2, p. 124-128, Aug. 1983.
 16. SNYDER, L. R., GLAJCH, J. L., KIRKLAND, J. J. **Practical hplc method development**. 1st ed. New York: John Wiley & Sons, 1988, 260 p.
 17. STAMP, J. A., LABUZA, T. P. An ion-pair high performance liquid chromatographic method for the determination of aspartame and its decomposition products. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 54, n. 4, p. 1043-1046, Jul./Aug. 1989a.
 18. 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, n. 33, n. 4, p. 734-738, Jul./Aug. 1985.
 19. WELLS, A. G. The use of intense sweeteners in soft drinks. In: GREMBY, T. H. **Progress in Sweeteners**, New York: Elsevier Applied Science. 1989. p. 121-142.
 20. WRÓBEL, K., WRÓBEL, K. Determination of aspartame and phenylalanine in diet soft drinks by high-performance liquid chromatography with direct spectrofluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 773, n.1-2, p. 163-168, Jun. 1997.

CONCLUSÕES GERAIS

1. As condições cromatográficas definidas neste estudo de otimização e validação de metodologia para determinação de aspartame e seus produtos de decomposição em refrigerantes foram: CLAE em coluna de fase reversa C₁₈ Spherisorb™ ODS-2 (5 µm, 250 × 4,6 mm), eluição por gradiente composta por tampão KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,50): acetonitrila (95:5, v/v) com a concentração de acetonitrila aumentando linearmente até os 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica. A vazão da fase móvel foi de 0,80 mL min⁻¹. A detecção foi feita em detector por arranjo de diodos a 210 nm. Após a corrida foram necessários 20 minutos de condicionamento da coluna com a fase móvel inicial antes da próxima injeção.
2. A preparação das amostras é muito simples, consistindo apenas numa etapa de degaseificação e filtração em filtros de celulose de 0,45 µm. As amostras sabor laranja com polpa em suspensão precisaram de uma centrifugação antes da filtração.
3. O procedimento cromatográfico analisado neste estudo para determinação de aspartame e seus principais produtos de decomposição, dicetopiperazina, aspartilfenilalanina e fenilalanina, pode ser empregado para os tipos de refrigerantes existentes no mercado brasileiro (sabores cola, laranja, limão e guaraná).
4. Esta técnica também pode ser usada na separação de outros edulcorantes (acesulfame-K e sacarina) e da cafeína, na mesma corrida cromatográfica, sem interferir com o aspartame e seus produtos de decomposição.
5. Com os dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que este método é rápido (cerca de 60 minutos), exato (recuperação entre 99,0 e 100,0%), preciso

(coeficientes de variação menores que 0,90%) e sensível (limite de detecção entre 0,020 e 0,040 mg 100 mL⁻¹), identificando e quantificando o aspartame e seus produtos de decomposição em uma única corrida cromatográfica.

6. O método é bem adaptado para controle de qualidade ou monitoramento de refrigerantes.
7. Todos os produtos analisados apresentaram quantidade de aspartame de acordo com a legislação em vigor, já que o limite máximo de aspartame permitido pela Legislação Brasileira é de 75 mg 100 mL⁻¹ em bebidas dietéticas. Em todas as amostras, os níveis de aspartame encontrados foram menores que 80% do declarado no rótulo.
8. Dicotopiperazina, aspartilfenilalanina e fenilalanina foram encontradas em todas as amostras analisadas. A formação destes compostos foi atribuída principalmente a decomposição do aspartame, assumindo que o conteúdo natural destes nos refrigerantes é pequeno. Esta pequena decomposição pode ser devido a impurezas do APM adicionado e/ou a decomposição ocorrida durante a fabricação do refrigerante. Considerando-se que o valor declarado foi realmente aquele adicionado ao produto, em todos os refrigerantes ocorreu decomposição do APM, sendo que em refrigerantes com sabor laranja a decomposição foi particularmente maior (laranja A, 41,46% e laranja B, 51,75%). O refrigerante que apresentou o menor nível de decomposição foi o sabor Cola A (22,22%).
9. Os resultados apresentados no presente comprovaram que os refrigerantes adoçados com aspartame sofrem decomposição, quando armazenados à temperatura ambiente após a fabricação. A falta de estabilidade de refrigerantes adoçados com aspartame pode, portanto, ser um problema para o fabricante e para o consumidor, principalmente durante o verão.

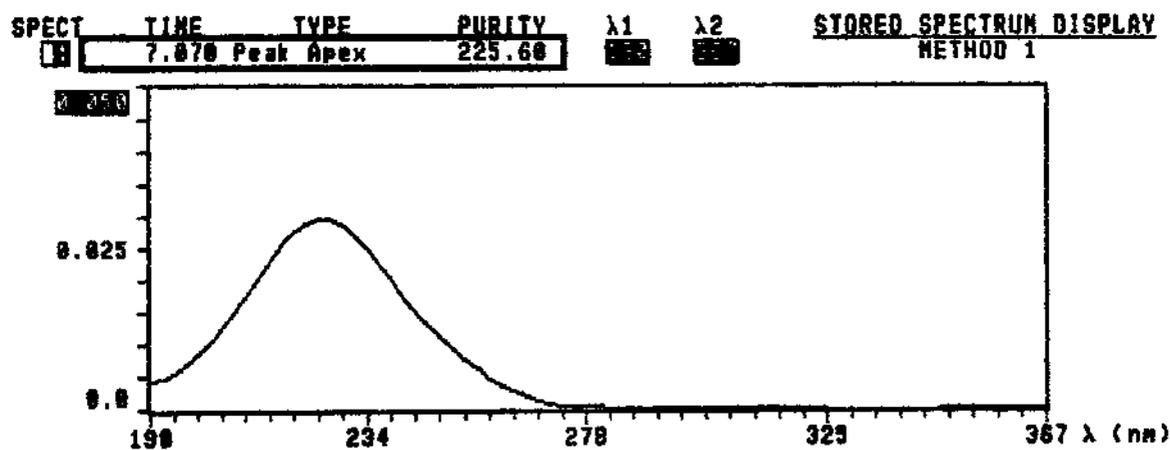
SUGESTÕES

Pelos resultados apresentados pode-se sugerir um estudo mais detalhado do efeito do tempo, temperatura e pH na decomposição do aspartame relacionando com a avaliação sensorial de perda de doçura.

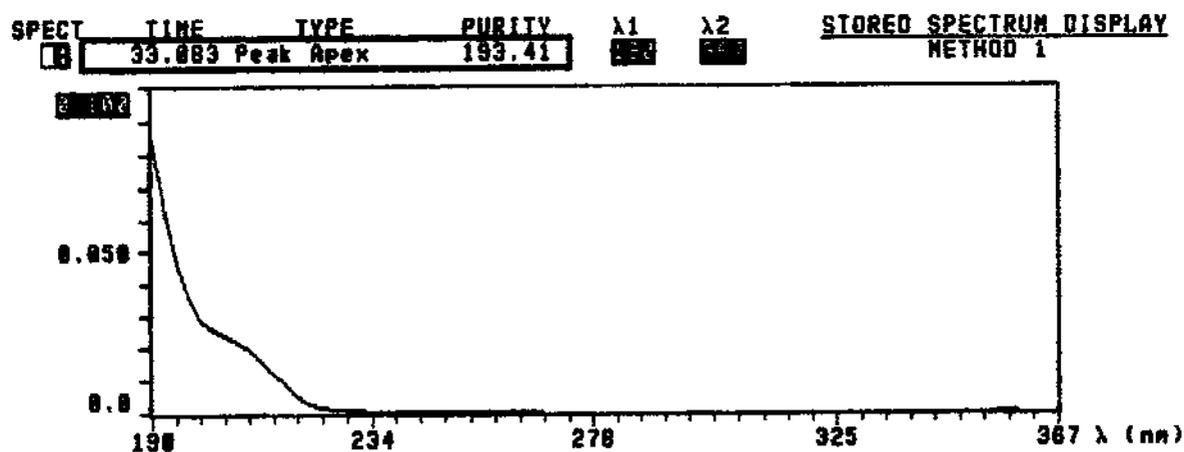
Com relação ao tipo de embalagem, um estudo de estabilidade do aspartame em função do tipo de embalagem usada, pois neste trabalho utilizou somente as embalagens de plástico descartável, por serem as mais comercializadas.

Com relação ao aspartame, e principalmente aos seus produtos de decomposição, ainda se tem poucos dados, no que se refere à sua ingestão potencial sendo, portanto, necessária à obtenção dessas informações, pois é cada vez mais intenso o interesse do consumidor em saber se a quantidade de aspartame consumido representa algum risco para a sua saúde.

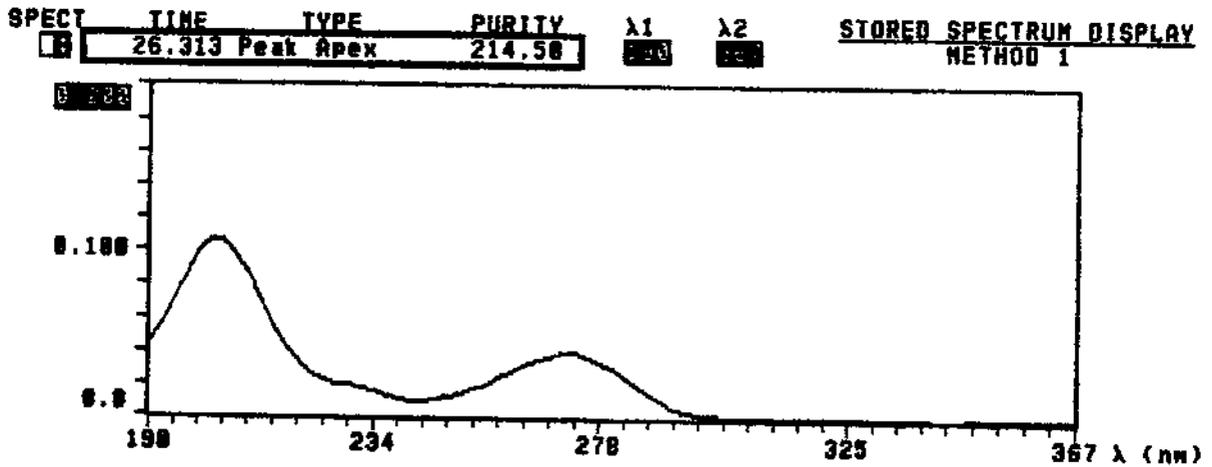
ANEXOS



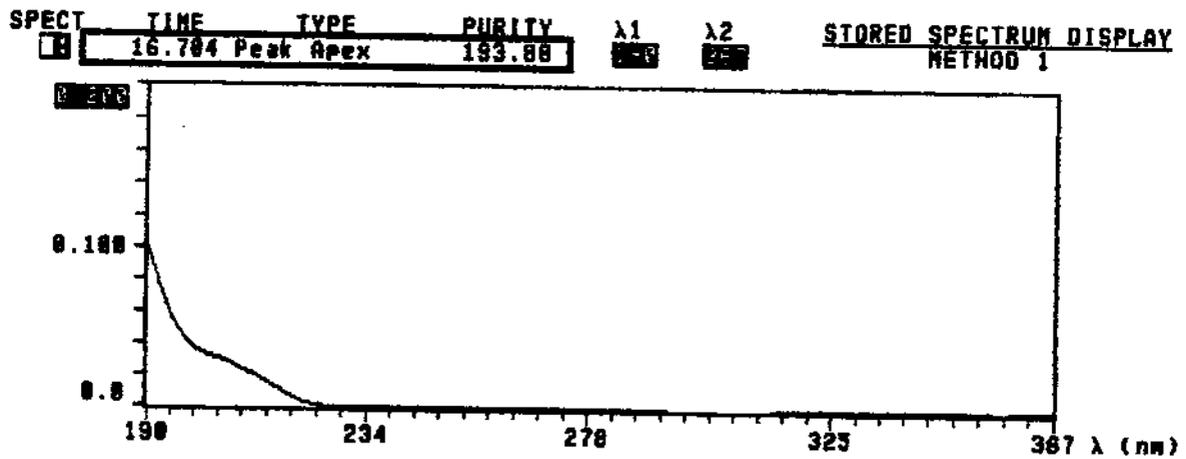
Anexo 1: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão de acesulfame-K.



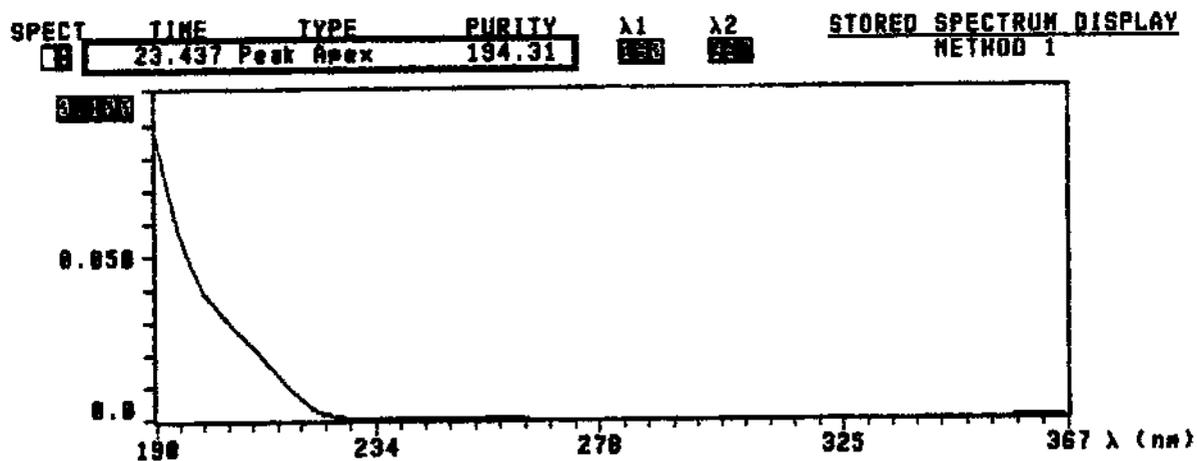
Anexo 2: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão de aspartame.



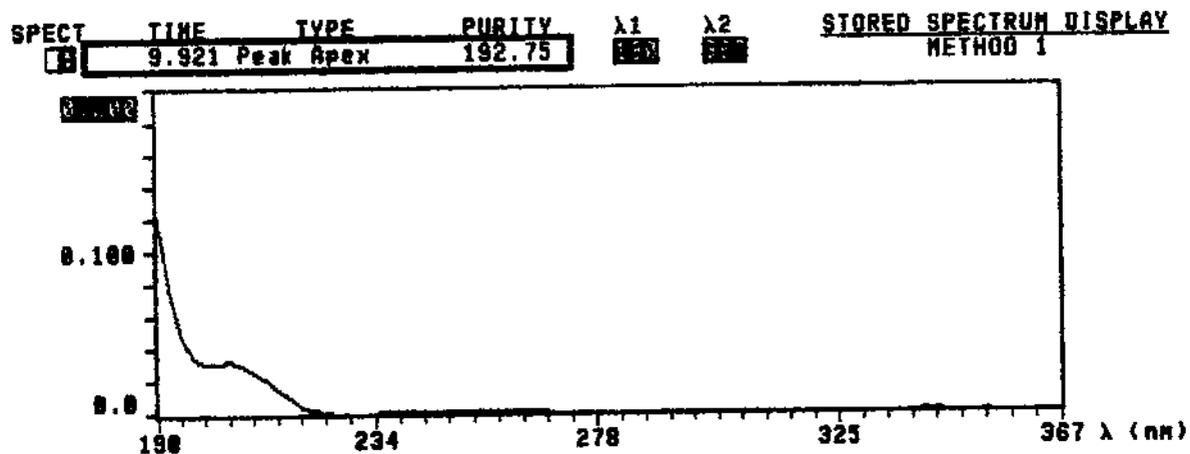
Anexo 3: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão de aspartilfenilalanina.



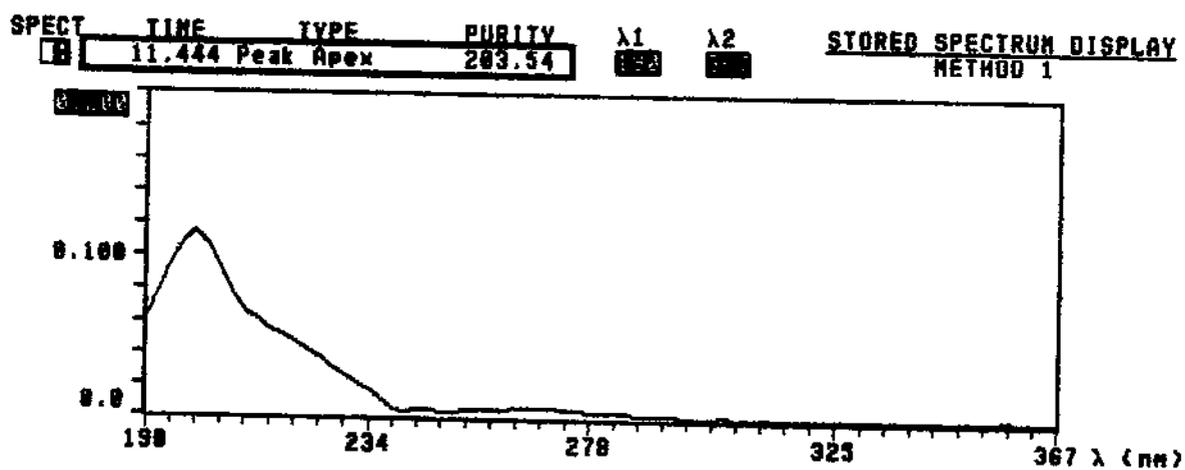
Anexo 4: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão de cafeína.



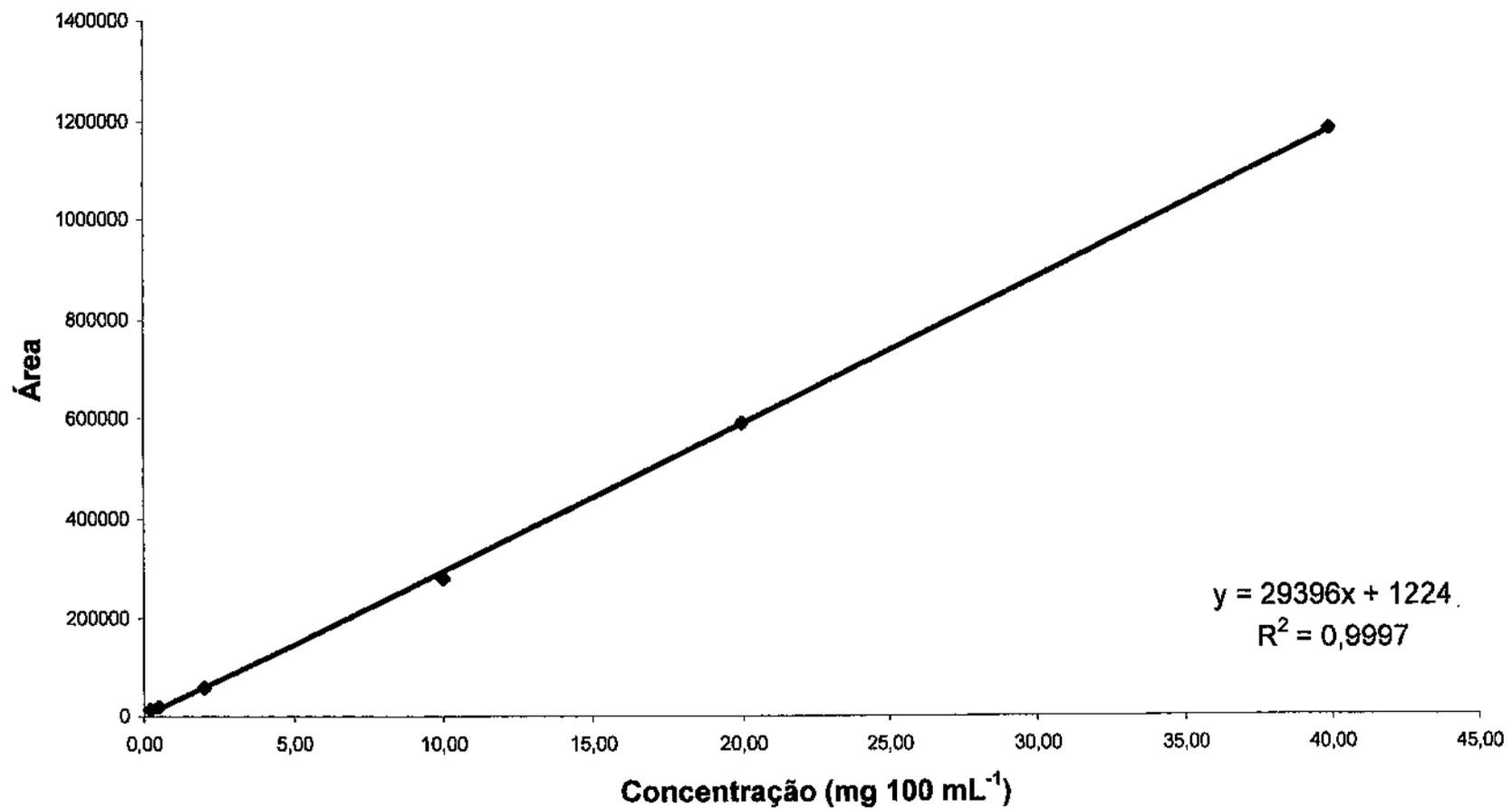
Anexo 5: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão dicetopiperazina.



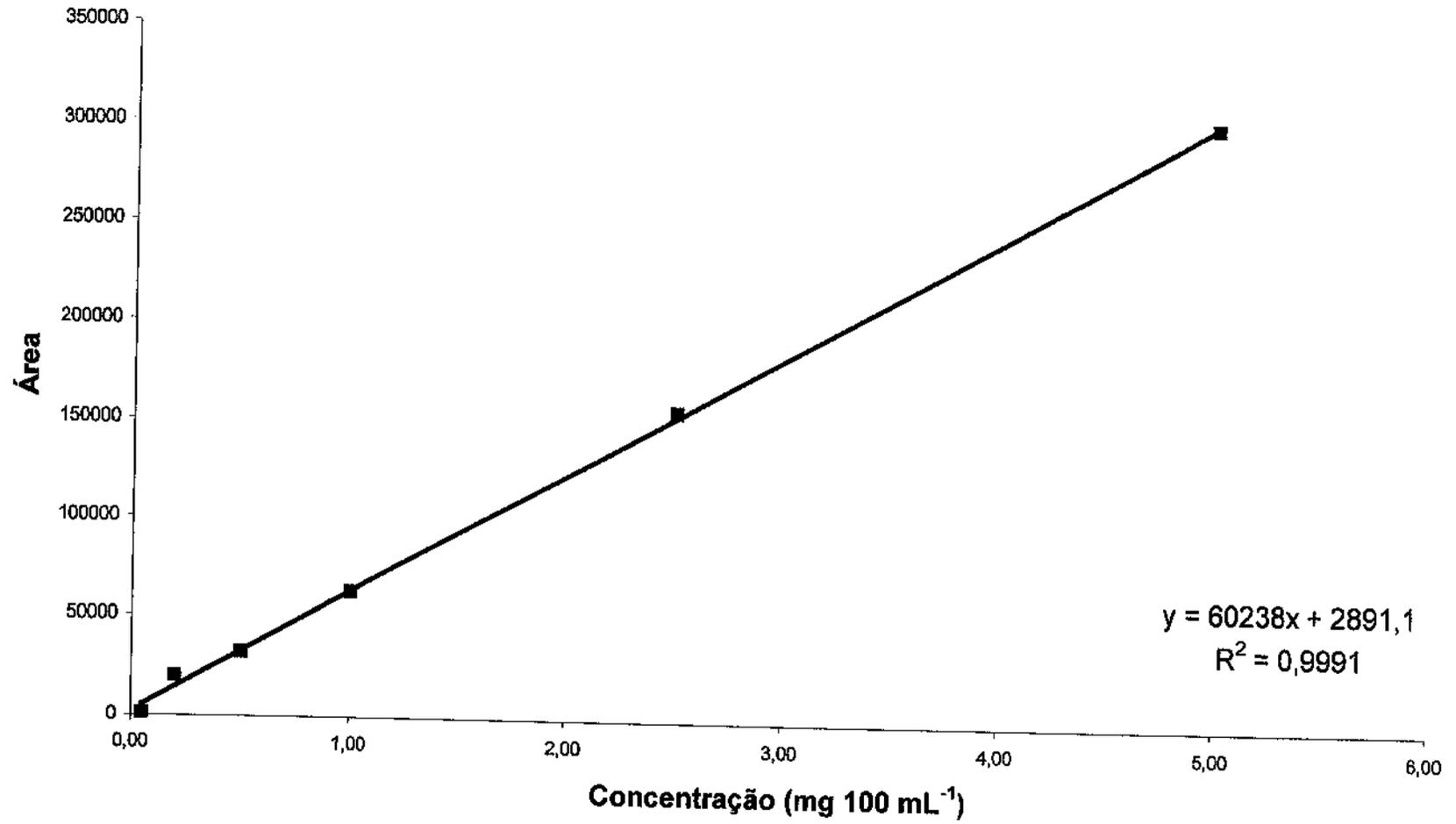
Anexo 6: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão de fenilalanina.



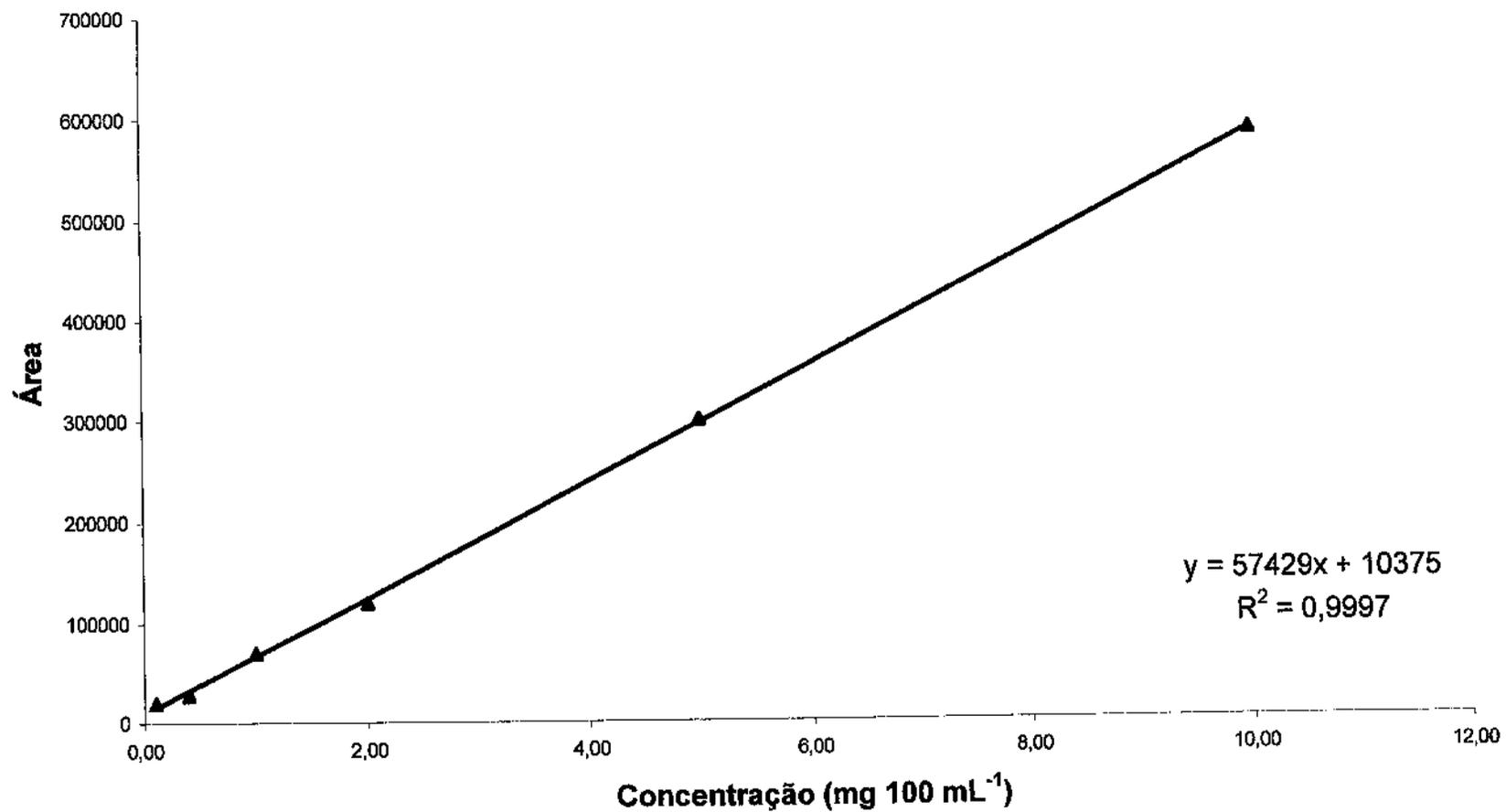
Anexo 7: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão de sacarina.



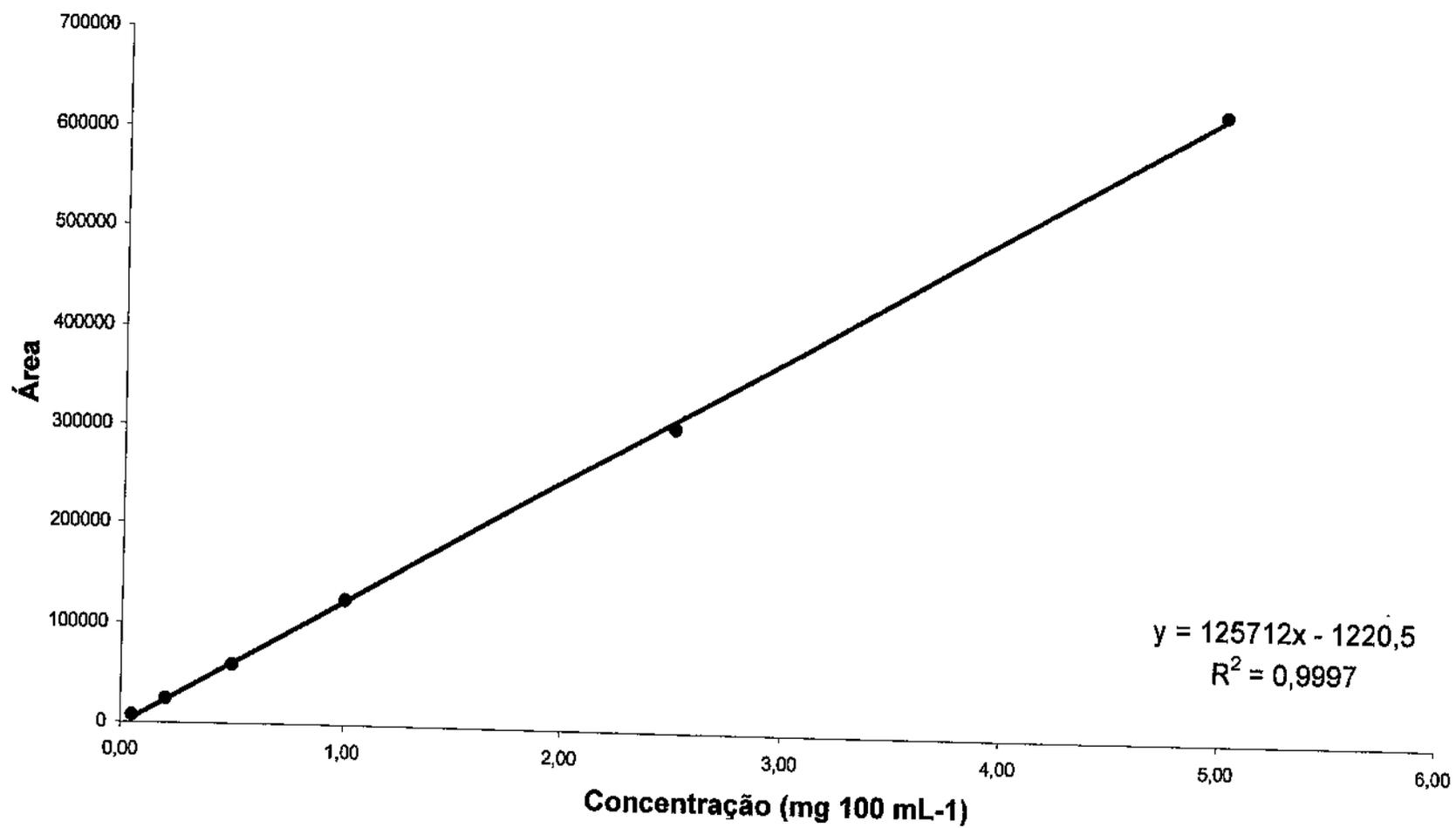
Anexo 8: Curva analítica do padrão de aspartame.



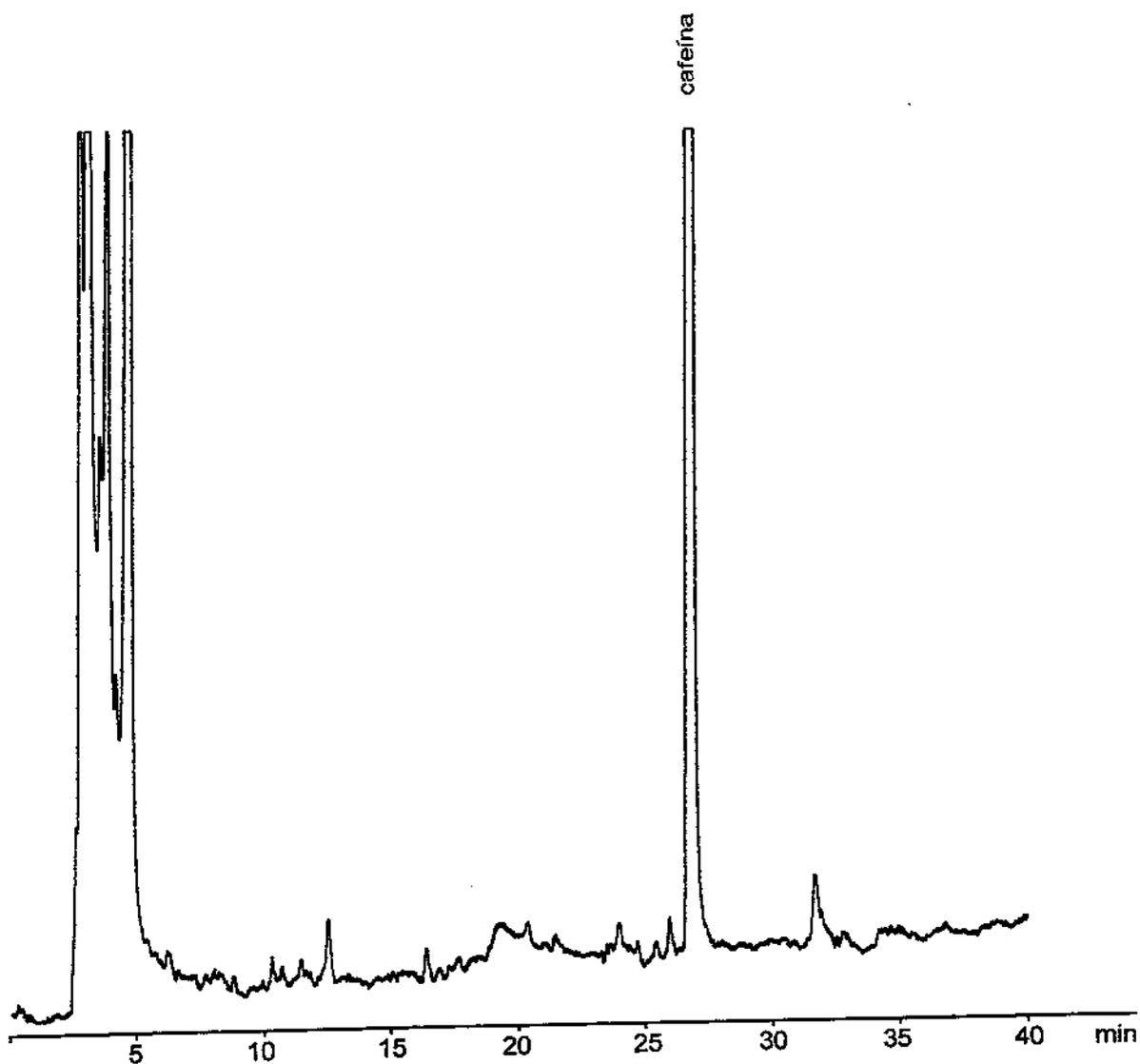
Anexo 9: Curva analítica do padrão de aspartilfenilalanina.



Anexo 10: Curva analítica do padrão da dicetopiperazina.



Anexo 11: Curva analítica do padrão da fenilalanina.



Anexo 12: Cromatograma do refrigerante guaraná normal.

Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ Supelco, 250 × 4,6 mm, empacotada com Spherisorb™ ODS-2 de 5 μm. A eluição por foi iniciada por tampão KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (pH 3,50): acetonitrila (95:5, v/v), a seguir a concentração de acetonitrila foi aumentando linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica. A detecção foi feita em 210 nm, usando detector por arranjo de diodos. O volume de injeção foi de 20,0 μL.

ERRATA

Página	Onde se lê:	Lê:
1, 3, 27, 28, 57 e 58	...C ₁₈ Spherisorb™ ODS-2...	...C ₁₈ 5 µm Spherisorb™ ODS-2...
27e 64	Coluna de guarda C ₁₈ , ...	Coluna de guarda C ₁₈ , 5 µm...
36	...ACK e SAC utilizados...	...ACK, ciclamato de sódio e SAC são utilizados...
	...exceção do ciclamato,...	...exceção do ciclamato de sódio,...
43	...picos mais agudos.	...picos mais estreitos.
50	...perda do compostos..	...perda dos compostos...
90	...sensível (limite de detecção entre 0,020 e 0,040 mg 100 mL ⁻¹),sensível (limite de detecção entre 0,020 e 0,040 mg 100 mL ⁻¹ , e limite de quantificação entre 0,040 e 0,080 mg 100 mL ⁻¹), ...

Página

Alteração

96

Inverter as figuras dos Anexos 3 e 4.