

200205636

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


***DETERMINAÇÃO DO ASPARTAME E SEUS PRODUTOS  
DE DECOMPOSIÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA  
DE ALTA EFICIÊNCIA E ANÁLISE SENSORIAL DA  
PERDA DE DOÇURA EM REFRIGERANTES DIETÉTICOS***

**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Soraia Pesarini**, aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de outubro de 2001.

**Soraia Pesarini**  
Nutricionista

Campinas, 19 de outubro de 2001

  
Prof. Dra. Heloísa Máscia Cecchi  
Presidente da Banca

**Profa. Dra. Heloísa Máscia Cecchi**  
Orientadora

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

Campinas, 2001.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC  
 N.º CHAMADA: TJUNICAMP  
P436d  
 Ex. 47409  
 TOMBO BC/ 47409  
 PROC. 47409  
 C ☐ D ☒ K ☐  
 PREÇO R\$ 11,00  
 DATA 04-02-02  
 V.º CPD 47409

CM00163057-1

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

P436d Pesarini, Soraia  
 Determinação do aspartame e seus produtos de decomposição por cromatografia líquida de alta eficiência e análise sensorial da perda de doçura em refrigerantes / Soraia Pesarini. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

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

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

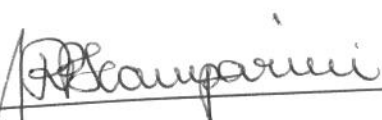
## BANCA EXAMINADORA



---

Dra. Heloísa Máscia Cecchi

Orientadora



---

Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini

Membro



---

Dra. Maria Aparecida Azevedo Pereira da Silva

Membro

---

Dra. Helena Teixeira Godoy

Membro

Dedico este trabalho a meus pais,  
Oswaldo e Leonilda,  
pelo amor e compreensão.



## AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos e Nutrição Básica da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso, por todo apoio para o desenvolvimento desse trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A Profa. Dra. Heloísa Máscia Cecchi, pela orientação, compreensão e amizade.

As Professoras Dra. Helena Teixeira Godoy e Dra. Maria Aparecida A. Pereira da Silva por toda colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Profa. Dra. Márcia Queiróz Latorraca ( Fundação Universidade Federal de Mato Grosso) e Ms. Carlos Ralf de Muis (Universidade de Cuiabá) pelo desenvolvimento da Análise Estatística.

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

Aos amigos da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos, Marcão, Marquinho, José Ricardo e Jardete pela amizade e colaboração na realização deste trabalho.

Aos amigos que muito gentilmente colaboraram na análise sensorial desse trabalho: Regina, Adriana, Luciane, Marcus, Luciana, Lucilene, Márcio, Marcelo, Natália, Sandra, Wânia, Marquinho e José Ricardo.

Ao companheiro de trabalho Márcio por compartilhar seus conhecimentos.

A todos os amigos do Laboratório de Análise de Alimentos em especial aos que convivi mais diretamente: Regina, Luciane, Adriana e Sidnéia pela amizade e companherismo.

A amiga Luciana Lintomen por toda colaboração no desenvolvimento deste trabalho e principalmente pela amizade e os bons momentos.

A amiga Natália pela valiosa contribuição neste trabalho e principalmente pelo seu carinho e amizade.

A Sonia, Paulo, Pricilla e Nathaly pelo apoio, carinho e por me receber em sua casa.

E principalmente a Deus que me amparou nos momentos difíceis...

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
RESUMO GERAL	01
GENNERAL SUMMARY	03
INTRODUÇÃO GERAL	05
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	06
<b>CAPÍTULO 1 - DETERMINAÇÃO ANALÍTICA E SENSORIAL DA DECOMPOSIÇÃO DO ASPARTAME EM REFRIGERANTES DIETÉTICOS: REVISÃO</b>	
1.1 - INTRODUÇÃO	08
1.2 - ASPARTAME	10
1.2.1 - Estrutura	10
1.2.2 - Propriedades e Características	10
1.2.3 - Estabilidade do Aspartame e seus Produtos de Decomposição	11
1.3 - MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINAÇÃO DE ASPARTAME E SEUS PRODUTOS DE DECOMPOSIÇÃO	15
1.4 - PERCEPÇÃO DA DOÇURA E ANÁLISE SENSORIAL	19
1.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
<b>CAPÍTULO 2 - DETERMINAÇÃO DE ASPARTAME E SEUS PRODUTOS DE DECOMPOSIÇÃO EM REFRIGERANTES DIETÉTICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.</b>	
RESUMO	36
SUMMARY	37
2.1 -INTRODUÇÃO	38
2.2 - MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.2.1 - MATERIAIS	41
2.2.2 - MÉTODOS	43
2.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	44

2.4 - CONCLUSÃO	58
2.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
<b>CAPÍTULO 3 - ANÁLISE SENSORIAL DA PERDA DA DOÇURA EM REFRIGERANTES DIETÉTICOS ADOÇADOS COM ASPARTAME</b>	
RESUMO	64
SUMMARY	65
3.1 - INTRODUÇÃO	66
3.2 - MATERIAIS E MÉTODOS	69
3.2.1 - MATERIAIS	69
3.2.2 - MÉTODOS	70
3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.4 - CONCLUSÃO	79
3.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	83
<b>ANEXOS</b>	85

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Informações obtidas dos rótulos sobre os edulcorantes adicionados nas amostras de refrigerante em mg/100mL.	41
<b>Tabela 2.2:</b> Quantidade de aspartame em mg/100ml encontrada nas análises cromatográficas dos refrigerantes na etapa inicial (tempo zero) comparada com a quantidade de aspartame especificada nos rótulos em mg/100 mL.	45
<b>Tabela 2.3:</b> Resultados em mg/100 mL e desvio padrão do teste de média (Tukey) do refrigerante cola 1 com relação ao aspartame, dicetopiperazina, aspartilfenilalanina e fenilalanina.	46
<b>Tabela 2.4:</b> Resultados em mg/100 mL e desvio padrão do teste de média (Tukey) do refrigerante cola 2 com relação ao aspartame, dicetopiperazina, aspartilfenilalanina e fenilalanina.	49
<b>Tabela 2.5:</b> Resultados em mg/100 mL e desvio padrão do teste de média (Tukey) do refrigerante guaraná com relação ao aspartame, dicetopiperazina, aspartilfenilalanina e fenilalanina.	52
<b>Tabela 2.6:</b> Resultados em mg/100 mL e desvio padrão do teste de média (Tukey) do refrigerante limão com relação ao aspartame, dicetopiperazina, aspartilfenilalanina e fenilalanina.	54
<b>Tabela 2.7:</b> Percentuais de perda de aspartame com relação a quantidade inicial nas diferentes temperaturas de armazenamento (0°C, 24,5°C e 38°C) e embalagens (lata e PET) realizada no meio do prazo de validade dos refrigerantes.	56
<b>Tabela 2.8:</b> Percentuais de perda de aspartame com relação a quantidade inicial nas diferentes temperaturas de armazenamento (0°C, 24,5°C e 38°C) e embalagens (lata e PET) realizada no final do prazo de validade dos refrigerantes.	56

<b>Tabela 3.1:</b> Informações obtidas dos rótulos sobre edulcorantes adicionados as amostras de refrigerante em mg/100 mL.	69
<b>Tabela 3.2:</b> Ilustração dos testes Triangular realizado para cada refrigerante (cola 1, cola 2, guaraná e limão) no meio e final da validade nas várias condições de embalagem e temperatura de armazenamento.	72
<b>Tabela 3.3:</b> Diferenças sensíveis encontradas em refrigerantes dietéticos armazenados em diferentes temperaturas através do teste triangular.	75
<b>Tabela 3.4:</b> Diferenças sensíveis encontradas em refrigerantes dietéticos armazenados em diferentes temperaturas através do teste triangular.	76
<b>Tabela 3.5:</b> Médias do teste Diferença-do-Controle com relação a variável temperatura dos refrigerantes cola 1, cola 2, guaraná e limão, nas embalagens lata e PET.	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Estrutura química do aspartame	10
<b>Figura 1.2:</b> Esquema das reações de decomposição do aspartame (Prodolliet and Bruehlhart, 1993).	12
<b>Figura 1.3:</b> Representação dos grupos funcionais (AH-B) de cada adoçante (a – sacarina, b – acesulfame-K, e c – ciclamato) e d – representação esquemática da interação entre o sítio receptor (A'H-B') e o sítio doador (AH-B) do dipeptídeo aspartame.	20
<b>Figura 2.1:</b> Fórmula estrutural do aspartame.	38
<b>Figura 3.1:</b> Gráfico do teste seqüencial utilizado para selecionar provadores.	70
<b>Figura 3.2:</b> Ficha aplicada no teste Triangular	73
<b>Figura 3.3:</b> Ficha aplicada no teste Diferença-do-Controle	74

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 2.1:</b> Cromatograma dos padrões do aspartame, dicetopiperazina, aspartilfenilalanina e fenilalanina.	86
<b>Anexo 2.2:</b> Espectro de absorção no ultra violeta do padrão do aspartame.	87
<b>Anexo 2.3:</b> Espectro de absorção no ultra violeta do padrão do dicetopiperazina.	87
<b>Anexo 2.4:</b> Espectro de absorção no ultra violeta do padrão do aspartilfenilalanina.	88
<b>Anexo 2.5:</b> Espectro de absorção no ultra violeta do padrão do fenilalanina.	88
<b>Anexo 2.6:</b> Cromatograma do refrigerante sabor Cola 1 a 24,5°C no final do prazo de validade (4 meses), na embalagem PET.	89
<b>Anexo 2.7:</b> Cromatograma do refrigerante sabor Cola 2 a 38°C no final do prazo de validade (3 meses), na embalagem PET.	90
<b>Anexo 2.8:</b> Cromatograma do refrigerante sabor Guaraná a 38°C no final do prazo de validade (6 meses), na embalagem PET.	91
<b>Anexo 2.9:</b> Cromatograma do refrigerante sabor Limão a 38°C no final do prazo de validade (4 meses), na embalagem PET.	92
<b>Anexo 2.10:</b> Curva Analítica do padrão de aspartame.	93
<b>Anexo 2.11:</b> Curva Analítica do padrão de dicetopiperazina.	94
<b>Anexo 2.12:</b> Curva Analítica do padrão de aspartilfenilalanina.	95
<b>Anexo 2.13:</b> Curva Analítica do padrão de fenilalanina.	96

## RESUMO GERAL

O consumo de edulcorantes artificiais tem aumentado pela maior oferta de alimentos e bebidas dietéticas, principalmente através dos refrigerantes “diet” e “light”. O aspartame é um edulcorante muito utilizado por ter o sabor muito parecido com a sacarose. Apesar das muitas vantagens deste edulcorante ele apresenta algumas restrições quanto a estabilidade em sistemas líquidos com pH neutro ou alcalino ou a temperaturas elevadas. Diante destes fatos, este trabalho teve como objetivo determinar o aspartame e seus produtos de decomposição em refrigerantes dietéticos e analisar sensorialmente a perda da doçura destes refrigerantes devido a decomposição do aspartame.

A determinação do aspartame e seus produtos de decomposição (dicetopiperazina, aspartilfenilalanina e fenilalanina) foram realizados por CLAE em coluna de fase reversa C18. As amostras analisadas foram duas colas, um guaraná e um limão em dois tipos de embalagem (lata e PET). Os refrigerantes foram armazenados em três temperaturas (0°C, 24,5°C e 38°C) e analisados no início, meio e final do prazo de validade dos mesmos.

Inicialmente, no tempo zero, dois dos quatro refrigerantes apresentaram quantidade de aspartame maior do que o declarado no rótulo e nenhum produto de decomposição foi encontrado neste momento. Nos quatro refrigerantes, a decomposição do aspartame aumentou com a elevação da temperatura de armazenamento e o aumento do prazo de validade. A dicetopiperazina e o aspartilfenilalanina foram encontrados em praticamente todas as condições estudadas dos quatro refrigerantes, enquanto a fenilalanina somente a 38°C.

O refrigerante que apresentou menores porcentagens de perdas de aspartame no final da validade foi a cola 2, (0°C – 3,3%, 24,5°C – 17,5% e 38°C- 65,1%), que tem um prazo de validade de 3 meses, e os que mais apresentaram perdas foram o guaraná (0°C – 10,9% e 38°C- 93,0%) e limão (24,5°C – 49,1%), com 6 e 4 meses de validade respectivamente.

Na análise sensorial foram realizados teste triangular em dois momentos meio e final do prazo de validade e teste de diferença-do-controle no final do validade. Os refrigerantes armazenados a 0°C foram considerados padrão ou controle devido a baixa decomposição do aspartame nesta temperatura.



No teste triangular, realizado na metade da validade, observou-se que as amostras cola 2 (lata e PET), guaraná (PET) e limão (PET), não apresentaram diferença significativa a  $p \leq 0,05$  em relação ao controle, mas no final da validade todas as amostras apresentaram diferença significativa a  $p \leq 0,05$ .

No teste de diferença-do-controle os resultados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e teste de média de Dunnett. Com exceção do refrigerante cola 2 na temperatura 24,5°C, todas as amostras apresentaram diferença significativa a  $p \leq 0,05$  do controle. Os refrigerantes armazenados na temperatura de 38°C diferiram em maior grau do que os armazenados na temperatura de 24,5°C.

## GENERAL SUMMARY

The consumption of artificial sweeteners has been increasing due to the greater availability of dietary food and drinks, mainly "diet" and "light" soft drinks. Aspartame is a widely used sweetener, having a taste very similar to that of sucrose. Despite the many advantages of this sweetener, it presents some restrictions with respect to its stability in liquid systems with neutral or alkaline pH and at high temperatures. On account of this instability, this study aimed at determining aspartame and its decomposition products in soft drinks, and, using sensory methods, to analyze for loss of sweetness in these soft drinks, due to decomposition of the aspartame.

HPLC was used to quantify aspartame and its decomposition products (dicetopiperazine, aspartilphenylalanine and phenylalanine) in diet soft drinks, during the period of validity (beginning, middle and end). Four different soft drink brands were analyzed: two colas, one guaraná and one lemon, in two types of container; can and PET. The soft drinks were stored at three different temperatures (0°C, 24.5°C and 38°C).

Initially, at zero time, two of the soft drinks showed an amount of aspartame greater than that declared on the label and no decomposition products were found. In all the soft drinks the decomposition of aspartame increased with increase in storage temperature and validity period. Dicetopiperazine and aspartilphenylalanine were found under all the conditions studied, while phenylalanine was only found at 38°C.

The soft drink that showed the lowest losses in aspartame level at the end of its validity period (3 months) was cola 2, (0°C - 3.3%, 24.5°C - 17.5% and 38°C - 65.1%), and those showing the greatest losses were guaraná (0°C - 10.9% and 38°C - 93.0%) and lemon (24.5°C - 49.1%), with validity periods of 6 and 4 months respectively.

In the sensorial analysis were made triangle test in two moments, in a half and final of the validity period and difference from control test in the final of the validity. The soft drinks stored for 0°C were considered control, due to low decomposition of the aspartame in this temperature.

In the triangle test, carried out in the middle of the validity period, it was observed that the samples cola 2 (can and PET), guaraná (PET) and lemon (PET), did not present any significant difference at  $p \leq 0.05$ , in relation to the control, but at the end of the validity period, all the samples presented significant differences at  $p \leq 0.05$ .

In the difference from control test the results were submitted to an analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's test. With the exception of the soft drink cola 2, at the temperature of 24.5°C, all the samples presented significant differences at  $p \leq 0.05$  as compared to the control. The soft drinks stored at a temperature of 38°C, differed to a greater degree than those stored at 24.5°C.

## INTRODUÇÃO GERAL

A sacarose é um dos adoçantes nutritivo mais empregada nas dietas alimentares. No entanto devido a patologias como a diabetes e obesidade, a sacarose está sendo substituída por adoçantes não nutritivos naturais e / ou sintéticos, os quais oferecem a mesma sensação doce do açúcar, sem causar privações e / ou diminuição da qualidade de vida destes indivíduos.

Os edulcorantes são substâncias diferentes dos açúcares que confere sabor doce ao alimento (Portaria Nº 540 da Secretaria Nacional da Vigilância Sanitária/ MS de 27/10/97). Podem ser classificados em naturais, obtidos sem reações químicas, de plantas ou animais e sintéticos, quando obtidos de produtos naturais ou não, através de reações químicas apropriadas (Bobbio&Bobbio, 1992).

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). O aspartame é o edulcorante mais consumido no mundo, em segundo lugar vem o ciclamato de sódio (Pereira & Strigueta, 1999).

Pode ser utilizado em praticamente todos os tipos de alimentos, incluindo: adoçantes de mesa, assados, misturas em pó, cereais, gomas de mascar, balas duras e moles, sobremesas, bebidas, congelados, refrigerados, geléias, coberturas, xaropes, produtos lácteos e produtos farmacêuticos (Almeida, 1991).

O consumo de edulcorantes artificiais tem aumentado pela maior oferta de alimentos e bebidas dietéticas, principalmente através dos refrigerantes “diet e light”. No Brasil o aspartame tem seu uso permitido no limite de 75mg / 100ml para bebidas dietéticas, sendo classificado como um edulcorante artificial (ABIA, 1988).

O aspartame adoça cerca de 200 vezes mais que a sacarose e não causa cáries. Apesar disso o aspartame apresenta algumas restrições quanto a estabilidade. É estável em sistemas líquidos acidificados mas perde a doçura em pH neutro ou alcalino, ou a temperaturas elevadas.

A estabilidade do aspartame está associada à sua identidade química como éster dimetilico do dipeptídeo aspartilfenilalanina. Em decorrência da instabilidade da ligação éster sob condições desfavoráveis de umidade, pH e temperatura pode haver hidrólise do aspartame a aspartilfenilalanina (AP) e metanol. Alternativamente, o metanol pode ser eliminado pela ciclização do aspartame, formando dicetopiperazina (DKP). Esta, por sua

vez, pode ser hidrolisada para formar aspartilfenilalanina, que pode ser hidrolisada em ácido aspártico e fenilalanina. Quando estes compostos são formados em alimentos, há uma diminuição da doçura nos mesmos (Ioshii, 1992). Nenhum dos produtos de conversão é doce, mas não conferem sabor desagradável ao produto (Bussiére, 1988).

Os objetivos deste trabalho foram verificar no prazo de validade dos refrigerantes dietéticos, o nível de decomposição do aspartame através de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e paralelamente à análise cromatográfica, verificar através de análise sensorial, se houve perda de doçura significativa dentro do prazo de validade dos refrigerantes analisados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L.G. A responsabilidade dos dietéticos. **Superhiper**, São Paulo, n.3, p.58-76, mar.1991.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO - ABIA. **Compêndio da Legislação de Alimentos**. São Paulo: ABIA, 1988.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O.: **Química do Processamento de Alimentos**. 2ª ed.: São Paulo: Ed. Varela, 1992, 145.
- BUSSIÉRE, G. Edulcorantes de alto poder edulcorante. In: MULTON, J-L. **Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias**. Zaragoza: Acribia, 1988. p. 257-273.
- IOSHII, S. **Ingestão diária potencial de edulcorantes no Brasil**. Campinas, 1992. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- PEREIRA, C.; STRIGUETO, K.: Adoçantes na rede, **ISTO É**, São Paulo, n. 1564, p. 54 – 55. Set. 1999.

**DETERMINAÇÃO ANALÍTICA E  
SENSORIAL DA DECOMPOSIÇÃO DO  
ASPARTAME EM REFRIGERANTES  
DIETÉTICOS: REVISÃO**

## 1.1- INTRODUÇÃO

Para o homem moderno, que vive num mundo em que a maioria dos produtos industrializados contém açúcar, é difícil imaginar a vida sem esse sabor. Mas o agradável costume vem de longe. Entre os brasileiros, desde que a cana-de-açúcar, originária da Índia, foi trazido para a América pelos portugueses e passou a ser cultivada e processada aqui em larga escala, o açúcar tornou-se tão popular que passou a fazer o parte da alimentação cotidiana de todas as classes sociais (Luduvig, 1998).

No entanto, em meados dos anos 60, a sacarose passou a ser considerada inimiga da saúde, principalmente devido a doenças como obesidade e diabetes mellitus (Luduvig, 1998).

Para atender as necessidades de obesos e diabéticos, além de milhares de pessoas preocupadas com o culto ao corpo, houve uma acelerada produção de outras substâncias capazes de conferir sabor doce aos alimentos, tais substâncias foram denominadas de edulcorantes.

Os edulcorantes são substâncias diferentes dos açúcares que confere sabor doce ao alimento (Portaria N° 540 da SNVS / MS de 27/10/ 97). Podem ser classificados em naturais, obtidos sem reações químicas, de plantas ou animais e sintéticos, quando obtidos de produtos naturais ou não, através de reações químicas apropriadas (Bobbio & Bobbio, 1992).

Um edulcorante que promove a liberação de calorias é considerado nutritivo ou calórico. A FDA defini como edulcorantes não nutritivos aqueles que apresentam menos de 2% do valor calórico da sacarose por unidade equivalente de capacidade adoçante (Grenby *et al.*, 1983; Glinsmam & Dennis, 1991). Portanto, o aspartame pode ser considerado não nutritivo pois apresenta valor calórico por unidade de doçura de aproximadamente 0,02 Kcal (Wells, 1989). O termo “não nutritivo”, pode ser substituído pela expressão edulcorantes “intensos”.

Existe um grande número de compostos capazes de produzir o sabor doce, entretanto, só alguns entre naturais e sintéticos são permitidos em alimentos. É este um campo em contínua evolução, seja pela descoberta de novas substâncias edulcorantes seja pela descoberta de efeitos tóxicos ou pelo estabelecimento da atoxidez nos produtos em uso e naqueles em estudo. Há evidentemente grande interesse neste campo, seja por razões

econômicas ou de saúde, como também pelos problemas tecnológicos envolvidos na substituição da sacarose por um edulcorante (Bobbio & Bobbio, 1992).

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). O aspartame é o edulcorante mais consumido no mundo, em segundo lugar vem o ciclamato de sódio (Pereira & Strigueta, 1999).

O aspartame foi descoberto em 1965 por James Schlatter químico da companhia G. D. Searle & Co. durante a síntese de um novo remédio contra a úlcera. Ao misturar dois aminoácidos (fenilalanina e o ácido aspártico), Schalatter notou um gosto doce (Homler *et al.*, 1986; Cardello & Damásio, 1997).

Além de ter sabor parecido com o açúcar, o aspartame adoça cerca de 200 vezes mais que a sacarose e não causa cáries. Apesar disso o aspartame apresenta algumas restrições quanto a estabilidade. É estável em sistemas líquidos acidificados mas perde a doçura em pH neutro ou alcalino, ou a temperaturas elevadas (NutraSweet, 1986).

Pode ser utilizado em praticamente todos os tipos de alimentos, incluindo: adoçantes de mesa, assados, misturas em pó, cereais, gomas de mascar, balas duras e moles, sobremesas, bebidas, congelados, refrigerados, geléias, coberturas, xaropes, produtos lácteos e produtos farmacêuticos (Almeida, 1991). Mundialmente existem mais de 5000 produtos contendo aspartame abrangendo mais de 50 categorias de produtos (Nordmann, 1994). Em 1995, ainda considerava-se o aspartame o edulcorante de maior sucesso, sendo que o aspartame e acesulfame -K tinham uma participação de 21% no mercado mundial, tendo êxito especialmente na América do Norte e do Sul, onde conquistaram cerca de 47% de todo mercado de edulcorantes (Teschner, 1995).

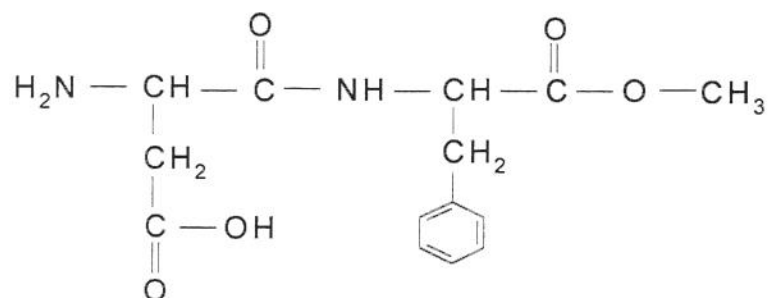
O consumo de edulcorantes artificiais tem aumentado pela maior oferta de alimentos e bebidas dietéticas, principalmente através dos refrigerantes “diet” e “light”. No Brasil o aspartame tem seu uso permitido no limite de 75mg/100ml para bebidas dietéticas, sendo classificado como um edulcorante artificial (Brasil, 1995; ABIA, 1988).



## 1.2 – ASPARTAME

### 1.2.1 - Estrutura

Do ponto de vista estrutural, o aspartame é um éster metílico de dois aminoácidos, a fenilalanina e o ácido aspártico, ou seja, éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina (figura 1.1). A molécula de aspartame é composta de 39,5% de ácido aspártico, 50% de fenilalanina e 10,5% de éster metílico (Cardello & Damásio,1997).



**Figura 1.1:** Estrutura química do aspartame

Introduzido sob o nome comercial de Nutrasweet, o aspartame, é atualmente o adoçante artificial de maior comercialização no mundo, sendo sintetizado a partir do ácido aspártico e do éster metílico da fenilalanina por método químico, que resulta em outros produtos secundários, ou com maior especificidade, por síntese enzimática e de tecnologia do DNA recombinado (Knorr, 1987; King & Cheethan, 1988; Fernández, 1990). Entretanto, a síntese química é a mais utilizada industrialmente.

### 1.2.2 - Propriedades e Características

O aspartame é um dipeptídeo branco, cristalino, inodoro, de baixa caloria e com uma doçura de 180 – 200 vezes a da sacarose, para refrigerantes pode ser considerado o valor de 180. Possui ponto de fusão de 246 – 247 °C, solúvel em água (10,2g/l a 25°C) sendo insolúvel em óleos e gorduras. A solubilidade em água a 25°C é mínima em pH 5,2 (ponto isoelétrico) e máxima em pH 2,2 (Homler,1984; Fatibello-Filho *et al.*, 1996; Vallejo *et al.*, 1999).

O aspartame tem o sabor do açúcar, o perfil de doçura é o que mais se aproxima ao da sacarose apesar de desenvolver-se mais lentamente e persistir por mais tempo, não deixa qualquer sabor residual amargo, químico ou metálico, freqüentemente associados aos demais edulcorantes (Homler, 1984; Matysiak & Noble, 1991; Wells, 1989), e além disso, não provoca cáries (Anderson, 1990).

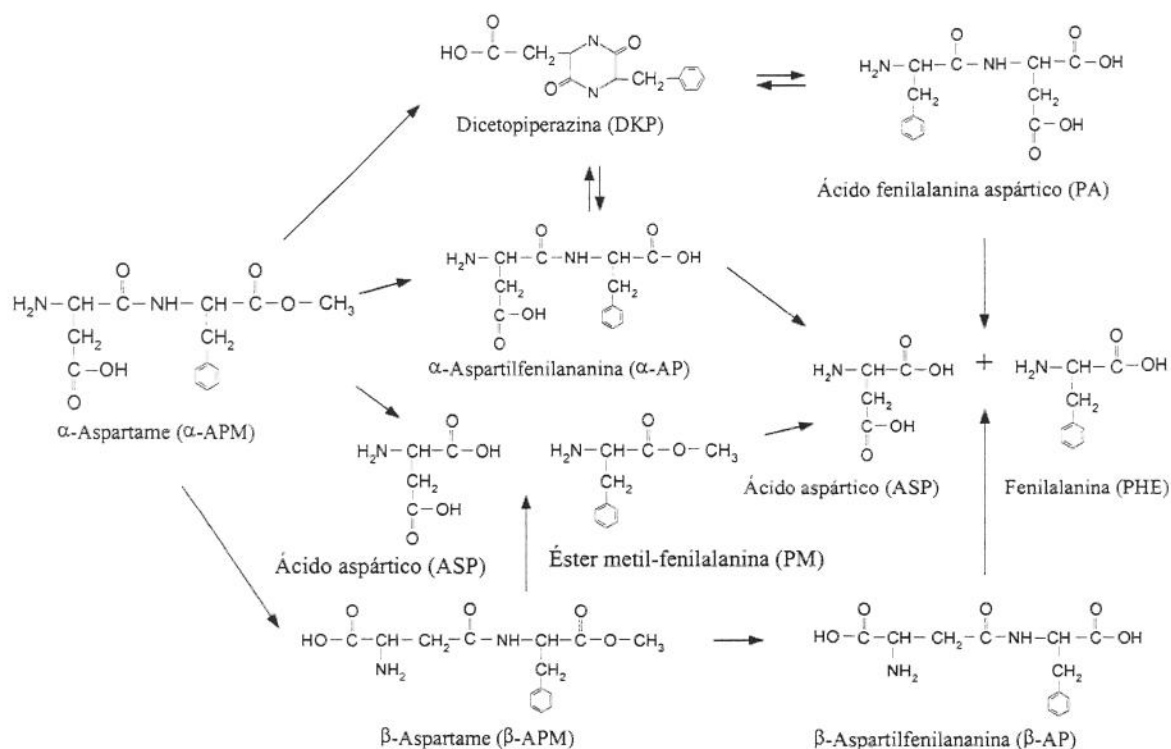
O aspartame acentua o aroma e prolonga a percepção do sabor das frutas, principalmente de frutas ácidas como laranja, limão, maracujá, goiaba e morango. A intensificação é mais efetiva com sabores naturais do que com artificiais (Dziezak, 1986; Giese, 1993).

Segundo Cardello & Damásio (1997), alguns pesquisadores observaram um fato interessante na determinação do poder edulcorante em sacarose do aspartame: com o aumento da concentração, ocorre diminuição da potência do edulcorante.

### **1.2.3 – Estabilidade do Aspartame e seus Produtos de Decomposição**

A estabilidade do aspartame está associada à sua identidade química como éster dimetilico do dipeptídeo aspartilfenilalanina. Em decorrência da instabilidade da ligação éster sob condições desfavoráveis de umidade, pH e temperatura pode haver hidrólise do aspartame (APM) a aspartilfenilalanina (AP) ou ciclohidrolisar formando a dicetopiperazina (DKP). Esta por sua vez, pode ser hidrolisada para formar aspartilfenilalanina, que por fim pode hidrolisar até seus compostos aminoácidos (Homler, 1984; Ioshii, 1994; Fernández, 1990). Ácido aspártico e fenilalanina são produtos resultantes da decomposição do aspartame, mas não são os maiores produtos dessa decomposição, o maior produto de degradação do aspartame é AP (aspartilfenilalanina) e DKP (dicetopiperazina) (Oi-Wah *et al.*, 1988).

Um esquema das reações de conversão de aspartame nestes compostos mencionados é mostrado na figura 1.2, juntamente com suas fórmulas estruturais. Nenhum dos produtos de conversão é doce, mas não conferem sabor desagradável ao produto, somente perda da doçura (NutraSweet, 1986; Ioshii, 1992; Vallejo *et al.*, 1990).



**Figura 1.2:** Esquema das reações de decomposição do aspartame (Prodoliet and Bruehlhart, 1993).

A estabilidade a seco do aspartame (com 4,0 a 4,5% de umidade) é excelente. Em condições adequadas de armazenagem, o produto dura mais de 5 anos sem apresentar qualquer alteração significativa. Em solução a estabilidade depende do tempo de estocagem, temperatura, pH e umidade livre. É estável no intervalo de pH de 3 a 5, tendo a melhor estabilidade em temperaturas de 20 – 25°C e pH igual a 4,3. Em pH 4, a 20°C, perde 20% de sua doçura em um período de quatro a cinco meses. Assim, a estabilidade deste edulcorante diminui com o aumento do pH e da temperatura, não sendo portanto recomendado seu uso em produtos alimentícios que possuam pH alcalino, e nos que necessitam de aquecimento acima de 100 °C durante muito tempo, tais como bolos, pães, biscoitos e bolachas (NutraSweet, 1986).

Prudel & Davidkova (1981), mostraram que aspartame em solução tampão citrato – fosfato foram muito estável em pH 4 – 5 e menos estável abaixo e acima desses valores, similarmemente Stamp (1990) demonstrou uma ótima estabilidade do aspartame em solução tampão fosfato com pH 4 e 5. A estabilidade do aspartame é maior em sistemas com atividade de água menor que 0,99 (Graves & Luo, 1987; Bell & Labuza, 1991).

Temperatura também é um importante fator da estabilidade do aspartame durante o armazenamento. Com o aumento da temperatura em um dado tempo de armazenagem, a quantidade de aspartame restante é diminuída (Holmer, 1984; Prudel et al, 1986; Fellows *et al.*, 1986; Tsoubeli e Labuza, 1991).

Apesar da instabilidade do produto frente a temperaturas elevadas, vários processamentos como UHT (“Ultra High Temperature”) ou HTST (“High Temperature Short Time”) promovem perdas inferiores a 3% na doçura do produto adoçado com aspartame (NutraSweet, 1986; Klacik, 1990).

Aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano, tirosina) histidina e aminoácidos contendo enxofre (cisteína, cistina e metionin) livre ou na forma de dipeptídeo são descritos como sensíveis a fotodecomposição (Weil, 1965; Matheson & Lee, 1979; Rosenthal, 1985; Kanner & Fennema, 1987). A estabilidade do aspartame com relação a fotodestruição é extremamente dependente do pH do sistema, a estabilidade do aspartame sob a luz é maior no pH 6, seguida pelo pH 4 e pelo pH 7, em ordem decrescente.

Assim, em alimentos com pH neutro devem ser acondicionados em embalagens que os protegem da ação da luz (Kim *et al.*, 1997).

A estabilidade do aspartame, comparados aos outros edulcorantes tais como a sacarina, ciclamato e acesulfame-K, é relativamente baixa. Esta estabilidade são dependentes do pH e da temperatura. Em certas condições o aspartame pode se decompor em dicetopiperazina e / ou aspartilfenilalanina e posteriormente em seus aminoácidos ácido aspártico e fenilalanina (Homler, 1984).

Lawrence & Charbonneau, (1988) pesquisaram a determinação múltipla de edulcorantes em adoçantes de mesa, constataram para o aspartame uma diferença de até 12%, menor entre os valores determinados e aquele descrito no rótulo. Para os refrigerantes dietéticos observou-se que a maior diferença entre o valor declarado no rótulo e o valor determinado para o aspartame foi de 45%. Se for considerado que o valor declarado no rótulo foi realmente adicionado ao produto, pode-se dizer que em todos os refrigerantes ocorreu decomposição do aspartame, sendo que em refrigerantes á base de cola, a decomposição foi maior.

Ioshii, (1994), determinou as concentrações de aspartame em adoçantes de mesa e bebidas dietéticas e comparou com as informações do rótulo. De acordo com os resultados,

observou-se que as concentrações determinadas para o aspartame em adoçantes de mesa variaram entre 91% a 106%, em relação às informações do rótulo.

Em refrigerantes armazenados por 8 semanas, 11-16%, e 28% do aspartame foram perdidos quando mantidos a 20 e 30 °C, respectivamente. No entanto, vários testes mostraram que perdas superiores a 40% são toleradas antes que as bebidas tornem-se inaceitáveis (Wells, 1989).

Estudo realizados pela G. D. Searle, relacionado com a estabilidade do aspartame, indicaram que 50% do aspartame inicial se degradam, nos refrigerantes a base de cola, após estocagem por seis meses a 30°C. Em xaropes de cola (pH 2,4), 75% do aspartame inicial permaneceram depois de aproximadamente duas semanas de armazenamento a 30°C.

Em um estudo sobre estabilidade de refrigerantes adoçados com aspartame (2 marcas sabor lima-limão e 2 marcas sabor cola), armazenado por 6 meses a temperatura de 22°C, a porcentagem de formação de fenilalanina foi de 4 - 13% e de AP e DKP foram de 18 - 30% e 17 - 28% respectivamente (Oi-Wah *et al.*, 1988).

Neirynck & Nollet, (1988) estudaram os efeitos da temperatura, tempo de armazenagem e pH na decomposição do aspartame em bebidas não alcoólicas, depois de um período de 180 dias à temperatura ambiente 60% do aspartame é decomposto em pH 2,5 e somente 35% com pH 4,5.

Stempfl & Lotz, (1996), pesquisaram a estabilidade de várias edulcorantes em bebidas sabor cola e constataram que refrigerantes adoçados com aspartame e conservados a temperatura ambiente apresentavam 80% da quantidade inicial após 10 semanas, ao término do teste, 1 ano, o refrigerante adoçado com aspartame apresentava 40% do conteúdo inicial.

Campos *et al.* (1992), em um trabalho visando avaliar a aceitação de molho de maçã adoçado com diferentes edulcorantes, demonstraram que o produto com melhor aceitação foi o elaborado com aspartame, mesmo após ter sido submetido a esterilização por 20 minutos a 95 °C (pH =3,9). Ensaio realizado pela NutraSweet confirmam estes dados, demonstrando que a esterilização realizada na faixa de pH de 3,8 a 4,0 ocasionou perdas de 3,1% (NutraSweet, 1986).

Fellows *et al.* (1986) determinaram a estabilidade do aspartame em preparados de frutas para iogurtes na faixa de pH de 3,6 a 4,0 às temperaturas de 4,4°C, 21,1°C e 32,2°C por um período de seis meses. Verificaram que a vida-de-prateleira foi superior a seis

meses, de quatro a seis meses e de um mês e meio, respectivamente, com retenção de 60% do aspartame original.

Suco de frutas refrigerados apresentando pH entre 3,3 – 3,6 tiveram uma vida de prateleira de 6 – 8 semanas. Produtos congelados tiveram uma vida de prateleira de mais de um ano (Homler *et al.*, 1987).

Em testes sensoriais as colas comerciais armazenadas a 27°C perderam a maior parte da doçura depois de duas semanas, esta perda provavelmente pode ser detectada pelo consumidor após a compra, se o produto for armazenado por um período prolongado e em temperaturas elevadas (Bakal, 1986).

A decomposição é maior nas soluções alcalinas, em pH ao redor de 4 há uma perda de 20% da doçura em 4 meses e, em pH 7, perdem-se 50% em algumas horas (Horwitz & Bauer-Nehrling, 1983). Segundo Wells, (1989), uma solução aquosa em pH 4, a 20°C, perde 20% de sua doçura em um período de quatro a cinco meses.

### **1.3 – MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINAÇÃO DE ASPARTAME E SEUS PRODUTOS DE DECOMPOSIÇÃO**

Para dosagem de aspartame foram desenvolvidos métodos utilizando: fluorescência (Poctova & Kavac, 1982; Atmaca *et al.*, 1989), cromatografia em camada delgada (Daniels, 1984), cromatografia gasosa (Furda *et al.*, 1975), cromatografia líquida (Daniels *et al.*, 1984), cromatografia líquida de alta eficiência (Fox *et al.*, 1976; Argoudelis, 1984; Tsang, 1985; Neiryneck & Nollet, 1988; Lawrence & Charbonneau, 1988; Pietra *et al.*, 1990; Fellows *et al.*, 1986; Galletti & Bocchini, 1996; Lotz & Kreuder, 1992; Prodolliet & Brulhart, 1993; Gibbs, *et al.*, 1996; Mello, 1999), eletroforese capilar (Abuol-Enein & Bakar 1997; Kvasnicka, 1987), espectrofotometria (Goven & Ozol, 1984; Ozol, 1984; Vechek, 1984; Homler *et al.*, 1987; Prasad *et al.*, 1988), titulometria (Prasad *et al.*, 1988), eletrodos enzimáticos (Fatibello-Filho *et al.*, 1988; Guilbault *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1989).

Alguns métodos colorimétricos e fluorimétricos sensíveis e precisos são empregados para aminoácidos e, conseqüentemente, para o aspartame. Entretanto, em muitos casos, estes métodos não são aplicáveis para análise de produtos alimentícios, já que



o alimento pode conter quantidades variáveis de aminoácidos e peptídeos, que poderiam interferir na quantificação do aspartame e também representar um branco inadequado para estes métodos (Fatibello-Filho *et al.*, 1996).

Foram desenvolvidos métodos espectrofotométricos na região do visível para análise do aspartame, mas a maioria está sujeito a interferências (Lau *et al.*, 1988) além disso, os métodos espectrofotométricos não são possíveis quando há pouca absorbância do aspartame em comprimento de onda normalmente selecionado e também devido a baixa concentração de aspartame em bebidas (Homler *et al.*, 1987).

Determinação quantitativa do aspartame também pode ser realizada por métodos volumétricos, que comparando com métodos espectrofotométricos, mostrou-se sensível para aplicação em análises de rotina, com a desvantagem de ser um método muito trabalhoso (Prasad *et al.*, 1988). Além disso, a presença dos produtos de decomposição do aspartame (aspartilfenilalanina e dicetopiperazina) quase sempre presentes nos alimentos adoçados com aspartame, pode causar interferência na análise (Verstappen & Miltenburg, 1990).

Métodos enzimáticos envolvem tediosas purificações de enzimas e diversas etapas são requeridas para obtenção de resultados, por isso, esse método não é aplicado rotineiramente devido a sua complexidade (Gibbs, *et al.*, 1996).

A separação do aspartame por cromatografia em camada delgada é limitada por ser uma análise semi-quantitativa e determinações utilizando cromatografia gasosa não são adequadas, pois não são encontrados derivados voláteis estáveis (Fox *et al.*, 1976).

Aspartame pode ser quantificado usando-se análises de aminoácidos, pelo método fluorimétrico e cromatografia gás – líquido ou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Com exceção do método por cromatografia líquida de alta eficiência, os demais não apresentaram sensibilidade e especificidade adequadas (Argoudelis, 1984).

Os métodos mais precisos, e por isso os mais utilizados, para determinações de edulcorantes são os que utilizam cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), pois além de determinar o edulcorante, podem dar informações sobre a presença de produtos de decomposição destes edulcorantes. A cromatografia líquida de alta eficiência apesar do custo elevado, apresentam muitas vantagens: rapidez, sensibilidade, precisão e simplicidade. Segundo Verstappen & Miltenburg, (1990) aspartame está presente em

alimentos em quantidades muito pequenas, por isso são necessários métodos sensíveis para sua detecção, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Argoudelis, (1984), desenvolveu um método isocrático para cromatografia líquida na determinação de aspartame e outros aditivos (cafeína, ácido benzóico e sacarina) em bebidas dietéticas.

Os edulcorantes artificiais aspartame, sacarina, ciclamato, alitame, acesulfame-K, sucralose e dulcina foram determinados em vários produtos dietéticos (bebidas e sobremesas). Amostras foram diluídas, filtradas e analisadas diretamente no cromatógrafo líquido, utilizando coluna de fase reversa C-18 e fase móvel em gradiente, aumentando-se de 3% acetonitrila e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,02M (pH 5) para 20% de acetonitrila e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,02M (pH 3,5). Todos os edulcorantes, com exceção da sucralose e ciclamato, foram detectados por absorvância no UV a 200 ou 210nm. Sucralose foi determinada pelo índice de refração. Ciclamato foi determinado simultaneamente usando uma pós-coluna com par-ionico conectada em série no sistema do cromatógrafo líquido (Lawrence & Charbonneau, 1988).

Pietra *et al.*, (1990), desenvolveu um método utilizando cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa para avaliar controle de qualidade de produtos farmacêuticos e dietas formuladas contendo aspartame e sacarina. O objetivo do método era separar aspartame, sacarina, acessulfame e dicetopiperazina (maior produto de decomposição do aspartame), 4-ácido sulfamoi benzóico e o e p- toluenesulfonamida (impurezas da sacarina).

Galletti & Bocchini (1996) detectaram aspartame em dois refrigerantes dietéticos sabor cola e em produtos farmacêuticos utilizando CLAE com detector eletroquímico e reação fotoquímica pós-coluna. Este método, apesar de ser mais trabalhoso do que CLAE em fase reversa, aumenta a seletividade e sensibilidade na detecção do aspartame.

O método por CLAE também tem sido amplamente utilizado para determinação de aspartame e seus produtos de decomposição.

Tsang *et al.*, (1985), estudaram um método rápido e simples para determinação de aspartame e seus produtos de decomposição (L- fenilalanina metil éster, DKP, AP e fenilalanina) em bebidas dietéticas, utilizando CLAE com coluna em fase reversa e detecção no UV a 214nm em condições isocráticas. As amostras foram armazenadas a  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  por períodos variáveis: 1 mês, 6 meses e 36 meses. Depois de 6 meses todas as amostras apresentaram menos de 40% de aspartame, e três de quatro amostras apresentaram menos de 10% de aspartame após 36 meses de armazenamento. Os resultados mostraram



que o aspartame é relativamente instável em bebidas carbonatadas por longos períodos de armazenagem.

Prudel & Davidková (1985) desenvolveram um método cromatográfico para determinação de aspartame e seus produtos de decomposição em refrigerantes. Foi utilizado coluna Separon SI C – 18 para separar ácido aspártico, fenilalanina, dicetopiperazina, fenilalanina metil éster, aspartilfenilalanina e fenilalanina-ácido aspártico. A fase móvel utilizada foi 0,5M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2,1) e metanol (85:15, v/v), a detecção foi a 220nm. O método mostrou ser muito sensível para a determinação de dicetopiperazina em refrigerantes e adoçantes de mesa.

Segundo Neiryck & Nollet (1988) vários autores mostraram a separação do aspartame em bebidas dietéticas utilizando como fase estacionária octadecilsilano e como fase móvel metanol ou acetonitrila e tampão fosfato. Técnicas de eluição isocráticas e por gradiente foram utilizadas. Scherz (1983) desenvolveu um método por CLAE utilizando coluna em fase reversa e eluição por gradiente para separar aspartame, aspartilfenilalanina (AP) e dicetopiperazina (DKP). Cross (1984) elaborou um método isocrático somente para determinação do aspartame e um método por gradiente para determinação de seus produtos de decomposição, a detecção foi por UV e fluorescência.

Neiryck & Nollet (1988) otimizaram um método para separar aspartame e seus produtos de decomposição em bebidas dietéticas variando o valor de pH entre 2,5 e 5,0 com nível constante de metanol (25%) e variando a concentração de metanol com valor de pH constante. A melhor separação foi com a mistura de 30% de metanol e 70% de tampão fosfato 0,025M com pH 3,5.

Prodoliet & Bruehlhart (1993) desenvolveu uma metodologia para detecção de acesulfame-K e otimizou este método para determinação de aspartame e seus produtos de decomposição (aspartilfenilalanina, dicetopiperazina e fenilalanina) em vários produtos dietéticos. Amostras foram extraídas ou diluídas com água e filtradas, matrizes complexas foram centrifugadas e clarificadas com solução Carrez, utilizou-se coluna em fase reversa  $\mu$ Bondapak C18 e fase móvel 0,0125M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3.5) – acetonitrila (85 + 15) para aspartame e dicetopiperazina (98 + 2) para aspartilfenilalanina e fenilalanina. A detecção foi realizada por UV a 214nm. Os autores estudaram 24 diferentes alimentos dietéticos e constataram a presença de DKP, aspartilfenilalanina e fenilalanina em vários produtos, a

formação destes produtos foi atribuída somente devido a degradação do aspartame, considerando a presença natural destes compostos nos alimentos foi insignificante.

Gibbs *et al.*, (1995) determinaram aspartame e seus produtos de decomposição ASP, DKP, AP e PHE em refrigerantes e vários produtos por CLAE. Amostra de bebida dietética após um ano de armazenamento a 25°C apresentou DKP, AP e PHE.

Aboul-Enein & Bakr, (1997) compararam dois métodos, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC), para determinar aspartame e seus metabólitos em aspartame em pó e refrigerantes. O método por CLAE mostrou-se mais vantajoso que o EC. Os métodos indicaram a presença de 4 a 5% de dicetopiperazina em amostras de refrigerantes.

Mello, (1999) desenvolveu uma metodologia para a determinação de aspartame e seus principais produtos de decomposição, aspartilfenilalanina, dicetopiperazina e fenilalanina em refrigerantes dietéticos. O método permitiu a determinação através de uma única corrida cromatográfica, utilizando eluição por gradiente. A separação foi realizada em coluna de fase reversa C18 Spherisorb<sup>TM</sup> ODS-2 e fase móvel composta por KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0125M (pH 3,5) e acetonitrila (95:5, v/v). A concentração de acetonitrila foi aumentada linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica, com uma vazão de 0,80mL/minuto. A detecção foi realizada por detector por arranjo de diodos a 210nm. A recuperação variou de 99,0 a 100,0%. O limite de detecção foi de 0,04mg/100mL para o aspartame e de 0,02mg/100mL para os produtos de decomposição. O limite de quantificação foi de 0,08mg/100mL para o aspartame e de 0,04mg/100mL para os produtos de decomposição. Os coeficientes de variação foram de 0,13% para o aspartame, 0,53% para dicetopiperazina, 0,85% para aspartilfenilalanina e 0,17% para fenilalanina.

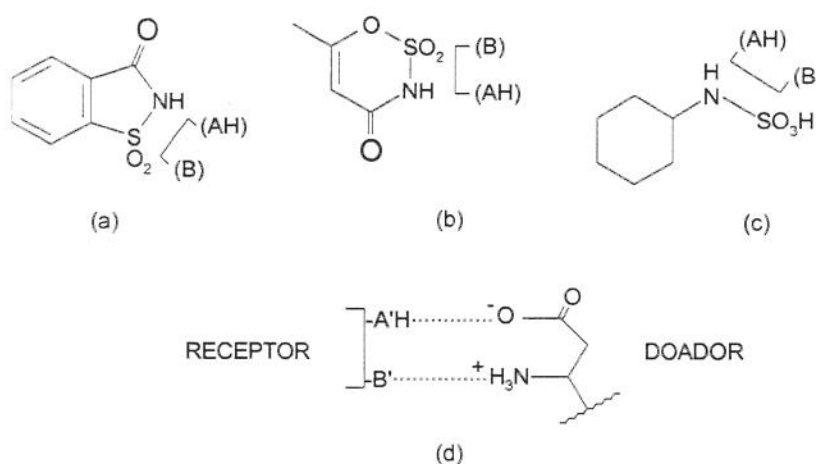
#### **1.4 – PERCEPÇÃO DE DOÇURA E ANÁLISE SENSORIAL**

Os gostos fundamentais ou primários são o doce, o salgado, o ácido (azedo) e o amargo. Um quinto gosto fundamental é o “umami” (delicioso), veiculados por glutamatos e 5- ribonucleotídeos, que é assim admitido devido ao fato de não poder ser reproduzido pela associação dos quatro gostos fundamentais tradicionais (Guion, 1994). Entre os gostos secundários tem-se o metálico, o refrescante, o adstringente e o picante.

A doçura é uma propriedade fundamental primária dos carboidratos simples como : sacarose, glucose, frutose e outros. A doçura decorre principalmente da presença de grupos hidroxila, o amargor de íons metálicos, a acidez de íons hidrogênio e o salgado da ionização de sais inorgânicos (Blenford, 1992).

A principal hipótese para explicar atualmente o mecanismo do sabor doce se baseia em ligações de hidrogênio (Shallenberger & Acree, 1967): a interação com o glucóforo que confere a doçura envolve um par A, H, B (A e B são átomos eletronegativos) os quais poderiam originar pontes de hidrogênio com o receptor doce como a hidroxila dos açucares (Figura 1.3). Todas as substâncias doces devem possuir uma ponte de hidrogênio doadora (AH) e uma ponte de hidrogênio receptora (B) (Fernández, 1990).

Nos edulcorantes, existem grupos funcionais constituídos por átomos eletronegativos (A e B) distanciados entre si de 2,5 a 4 Å (Figura 1.3).



**Figura 1.3:** Representação dos grupos funcionais (AH-B) de cada adoçante (a – sacarina, b – acesulfame-K, e c – ciclamato) e d – representação esquemática da interação entre o sítio receptor (A'H-B') e o sítio doador (AH-B) do dipeptídeo aspartame.

Entre grupamentos doadores de pontes de hidrogênio estariam: NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, COOH, OH, NH e NH<sub>2</sub> e como receptores: COO<sup>-</sup>, NH<sub>2</sub>, C=O, NO<sub>2</sub> e CN (Shallenberger & Acree, 1967).

O modelo de Shallenberger & Acree, (1967), foi ampliado por Kier, (1972) que introduziu o conceito do terceiro sítio complementar (X) hidrofóbico, que em uma molécula doce desempenha um papel fundamental na intensificação da doçura (Fernández, 1990).

Kier, (1972) examinou o perfil de doçura de 18 aminoácidos nas configurações L e D, concluindo que o sistema aromático da tirosina, fenilalanina e do D – triptofano seriam glucóforos ideais para o sítio X. Tinti & Nofre, (1991) designaram o componente (X) de sítio G, segundo os autores, o sítio G induz potenciais superiores de doçura em cooperação com o sistema AH,B.

A descoberta do aspartame foi o início do atual interesse na relação entre estrutura molecular e doçura. A partir de modificações estruturais do aspartame foram descobertos edulcorantes como o alitame e edulcorantes altamente potentes (Walters, 1991).

De acordo com o modelo de Shallenberger & Acree (1967), três glucóforos estão presentes no aspartame: os elementos A-H e B estão presentes no resíduo aspartil como  $\text{NH}_3^+$  e o grupo  $\beta$ -carboxil. O grupo hidrofóbico (X) é acomodado pelo grupamento fenil da fenilalanina. A substituição do éster por éter hidrofóbico levou ao aparecimento de compostos 800 vezes mais doce que a sacarose (derivados do tetrametilciclo-pentano – TMCP) (Tinti & Nofre, 1991).

A sacarose é tomada como referência de gosto doce por ser o adoçante mais utilizado, ser encontrado quase universalmente, por sua versatilidade, e, principalmente, por não apresentar sabor secundário ou residual ("aftertaste"). A doçura relativa é definida como a razão entre concentrações de soluções de edulcorantes que possuem igual intensidade de doçura. A doçura relativa da sacarose foi considerada arbitrariamente como 100. Quando comparada com edulcorantes de alta intensidade, este valor é considerado 1 (Cândido & Campos, 1996).

No estudo da avaliação da intensidade de doçura de substâncias é comum compará-la com soluções de sacarose cujas concentrações variam de 5 a 12%. Uma solução a 9% de sacarose é representativa da doçura de muitas bebidas dietéticas (Giese, 1992; Cerestar, 1993).

Os fatores que influenciam a percepção da doçura de um adoçante são: tipo e concentração do adoçante, meio de dispersão (solução aquosa, lipídica ou outros ingredientes alimentícios), sinergismo, viscosidade, temperatura, pH, aroma, textura,

aparência, diferenças pessoais inatas e individuais, grau de hidrólise do açúcar, sua configuração e outras propriedades. Comparações de doçura devem ser realizadas com concentrações equivalentes em doçura, e a temperatura, o pH e a concentração da solução devem ser mantidos constantes. O estado físico no qual se apresentam os produtos também é importante, pois produtos em solução podem gerar resposta sensorial diferente que em forma cristalina (Cândido & Campos, 1996).

Em bebidas quentes, a doçura dos edulcorantes intensos é geralmente menor do que à temperatura ambiente, sendo este efeito menos pronunciado para o acesulfame-K, cuja doçura é ligeiramente maior em soluções ácidas que em neutras (Wells, 1989). Verifica-se que para os edulcorantes intensos, o poder adoçante não aumenta proporcionalmente ao aumento de concentração (Cândido & Campos, 1996).

Nenhum adoçante é perfeito para todos os usos, contudo, limitações podem ser eliminadas através da combinação de dois ou mais adoçantes. Na indústria alimentícia é de grande valor a “Concepção de adoçante múltiplo” (“Multiple Sweetener Concept”). Esta concepção consiste na utilização de combinações de adoçantes e edulcorantes de maneira que permita: (a) obter níveis mais elevados de doçura (sinergismo); (b) aperfeiçoar o gosto, procurando produzir perfil de doçura o mais próximo possível ao da sacarose; (c) mascarar sabores residuais; (d) aumentar a estabilidade; (e) aumentar a solubilidade em água; (f) reduzir o custo de produção e do preço unitário da mistura; (g) reduzir o consumo de edulcorantes artificiais e de exposição do consumidor a um único adoçante, fazendo com que a quantidade de cada edulcorante usado permaneça bem abaixo da sua ingestão diária aceitável (IDA) e dentro dos limites legais; e (h) reduzir a contribuição calórica do agente edulcorante e do produto final (Cândido & Campos, 1996).

Meilgaard, (1988) definiu sinergismo como sendo o efeito da presença de uma substância aumentando a intensidade combinada da percepção de duas substâncias, sendo assim a intensidade da mistura é maior do que a soma das intensidades dos componentes individualmente. Segundo Birch, (1982); Wells, (1989) algumas combinações que apresentam sinergismo são: (a) acesulfame-K em mistura com aspartame, alitame, ciclamato, sucralose, esteveosídeo ou taumatina; (b) aspartame com acesulfame-K, sacarina, ciclamato ou esteveosídeo; etc.

Wells (1989), discute associação de edulcorantes com o objetivo de melhorar o perfil de sabor, o aspartame foi usado em mistura com sacarina, ciclamato, ou acesulfame-K para melhorar a estabilidade da doçura.

As misturas binárias, misturas de três ou mais edulcorantes podem resultar em implementação de propriedades. A mistura de sacarina/aspartame/ciclamato na razão de 1:5:8 aperfeiçoa o perfil de doçura em relação ao do edulcorante individualmente (Wells, 1989).

Segundo O'Mahony (1995) pode-se avaliar a doçura através das sensações humanas utilizando-se técnicas de análise sensorial. Os métodos empregados são classificados de diferentes formas, por diferentes autores, baseando-se nos objetivos da avaliação.

Segundo Lawless e Claasen (1993) a escolha de um método de análise sensorial está baseado na resposta em três questionamento: existência de diferença perceptível entre o produto em estudo e algum produto convencional similar, a aceitação do produto pelos consumidores, especificação dos pontos de diferença e o seu grau de intensidade. As respostas a estes três questionamentos permitem classificar os métodos sensoriais em testes discriminativos (ou de diferença), de aceitação e análise descritivas, respectivamente.

Os testes de diferença são de fácil interpretação, necessitam um painel treinado e selecionado relativamente pequeno, e são relativamente baratos (Jackson *et al.*, 1987). A ABNT conceitua-se como sendo método que estabelecem diferenciação qualitativa e / ou quantitativa entre amostras.

O teste triangular é o método discriminativo mais utilizado na indústria de alimentos, através do qual o julgador deve determinar qual amostra codificada, entre três (duas iguais e uma diferente), é estranha (Jackson *et al.*, 1987; O'Mahony, 1990).

A ABNT recomenda que o teste triangular seja utilizado para detectar pequenas diferenças entre amostras, e selecionar e treinar julgadores. As vantagens atribuídas ao teste são: ter menor probabilidade de acertar ao acaso, e diferenciar as amostras de maneira global. As desvantagens são: tornar-se pouco prático com um número elevado de amostras, visto que aumenta o número de intercomparações necessárias; e pode ser afetado pela fadiga sensorial, principalmente com amostras de sabor forte (Cândido & Campos, 1996).

Para testes de diferença em geral, Meilgaard *et al.*, (1987) recomendam que o analista sensorial desenvolva uma série de testes de seleção de provadores, os quais



servirão não só para ensinar os indivíduos sobre os procedimentos dos testes que serão utilizados, como também para eliminar aqueles indivíduos que não podem detectar diferenças sensoriais no produto sendo avaliado.

O objetivo do teste duo-trio assemelha-se ao teste triangular, ou seja verificar se existe diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre duas amostras que receberam tratamento diferentes. Neste teste o provador utiliza uma amostra padrão e é informado que uma das amostras codificada é igual a este padrão. O teste duo-trio é mais simples em relação ao provador que o teste triangular, pois é mais fácil identificar a amostra solicitada, mas também é mais ineficiente porque a probabilidade de acertar ao acaso é de  $1/2$  ao invés de  $1/3$  como no teste triangular (Meilgaard *et al.*, 1987).

O teste de comparação pareada é utilizado para detectar diferenças entre duas amostras em relação a uma característica pré-estabelecida, sendo que o julgador deve indicar, por exemplo, a amostra mais doce. Este tipo de teste é muito aplicado em pesquisa de mercado (Meilgaard *et al.*, 1987). Este teste é mais discriminativo que os testes triangular e duo-o-trio, mas estes apresentam a vantagem de não ser necessário especificar a natureza da diferença (O'Mahony, 1990).

O teste de ordenação tem como objetivo comparar diversas amostras ao mesmo tempo com relação a um determinado atributo (como doçura por exemplo) e verificar se existe diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) com relação ao atributo avaliado (Meilgaard *et al.*, 1987).

Segundo a ABNT, o teste de ordenação é indicado para pré-seleção entre um grande número de amostras, ordenação das amostras com relação a intensidade de um determinado atributo ou em relação a preferência. Apresenta a vantagem da rapidez na aplicação e na avaliação de várias amostras simultaneamente. A desvantagem é a impossibilidade de quantificar o grau de diferença ou de preferência entre as amostras.

O teste de diferença-do-controle ou comparação múltipla verifica se existe diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre várias amostras e uma amostra padrão ou controle e estima o grau dessa diferença. Os resultados do teste são avaliados através de Análise de Variância (ANOVA) e teste de média Dunnett, comparando-se apenas o padrão com todas as outras condições dos testes devem ser cuidadosamente controladas para que as amostras sejam homogênea em todos os aspectos, à exceção do que está em julgamento : as amostras

devem apresentar mesmo peso, volume, formato, temperatura, ser servidas em recipientes iguais, etc.

Stempfl & Lotz (1996) estudaram refrigerantes a base de cola produzido em planta piloto em escala semi-industrial adoçados de modo diversos durante um ano, o objetivo era de analisar sensorialmete a estabilidade do sabor doce e quimicamente a quantidade do adoçante que permaneceu no final do experimento. Houve uma redução significativa no grau de doçura dos refrigerantes adoçado com aspartame quando conservados 3 – 4 meses em temperatura ambiente, ainda dentro do prazo de validade dos mesmos. Refrigerantes adoçados com acesulfame-K/aspartame, no mesmo período e temperatura de conservação, mostraram estabilidade no grau de doçura. Na análise química observou-se uma redução 20/30% do aspartame inicial nos refrigerantes adoçados exclusivamente com aspartame á temperatura ambiente. Em conservação á 4°C não se observou redução no grau de doçura em nenhuma das misturas de adoçantes.

## 1.5 — REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ALMEIDA, L. G. A responsabilidade dos dietéticos. *Superhiper*, São Paulo, n. 3, p. 58-76, mar. 1991.
- ALMEIDA-MURADIAN, L. B., PENTEADO, M. D. V. C. Edulcorantes em alimentos: uma revisão. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 24, n. 1/2, p. 1-11, jan/jun. 1990.
- ANDERSON, K. Ingredients for reduced calorie foods. In: BIRCH, G.G.; CAMPBELL-PLATT, G.; LINDLEY, M.G. (Ed). **Foods for the 90's**. London: Elsevier Applied Science, 1990, p.149 -167.
- ARGOUDELIS, C. J. Isocratic liquid chromatography method for the simultaneous determination of aspartame and other additives in soft drinks. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 303, p. 256-262, 1984.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO – ABIA. *Compêndio da Legislação de Alimentos*. São Paulo: ABIA, 1988.



- ATMACA, S., ISKENDER, G., BAYER, E. *Acta Pharmaceutica Turcica*, Istambul, n. 31, p. 37, 1989.
- BAKAL, A. I. *Chemistry and Industry*, London, p. 700, Sept. 1983.
- BAKAL, A. I. Mixed sweetener functionality. In: O'BRIEN, N., GELARDI, R. C. *Alternative Sweeteners*. New York: Marcel Dekker Inc. 1986. p. 325-346.
- BELL, L. N.; CLINTON, WETZEL, C. R. Aspartame degradation in solution as impacted by buffer type and concentration. *Journal Agric. Food Chem.*, n. 43, p. 2608 - 2612, 1995.
- BELL, L. N.; LABUZA, T. P. Aspartame stability in commercially sterilized flavored dairy beverages. *Journal of Dairy Science*. Vol. 77, n. I, p. 35 - 38, 1994.
- BIRCH, G. G., PARKER, K. J. *Nutritive Sweeteners*. London: Applied Science Publishers, 1982. 316 p.
- BLACK, R. M., TANAKA, P., LEITER, L. A., ANDERSON, G. H. *Physiology & Behavior*, Elmsford, n. 49, p. 803, 1991.
- BOBBIO, P. A., BOBBIO, F. O. *Química do Processamento de Alimentos*. Campinas: UNICAMP. 1984. 232 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 122, de 24 de novembro de 1995. Aprova as Normas Técnicas referentes a Alimentos para Fins Especiais. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, nº 229, p. 19788-19790, 30 nov. 1995 a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 41, de 12 de maio de 1995. Aprova as Normas Técnicas referentes a Alimentos para Fins Especiais. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, nº 91, p. 6886-6887, 15 maio 1995 b.
- BLENFORD, D. Sweet and sour - the finer points of taste. *Food Ingredients & Processing International*, Rickmansworth, p. 8 - 10, Mar. 1993.
- BULLOCK, L. M. Replacement of simple sugars in cookie dough. *Food Technology*, Chicago, v. 46, n. 1, p. 82-86, Jan. 1992.
- BUSSIÈRE, G. Edulcorantes de alto poder edulcorante. In: MULTON, J-L. *Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias*. Zaragoza: Acribia, 1988. P. 257-273.
- CAMPOS, A. M., CÂNDIDO, L. M., RODRIGUEZ, R. M. H. P. Avaliação sensorial de molho de maçã com diferentes edulcorantes. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 135-150, jul/dez. 1992.

- CANDEBAT, Z. E. V., ROCHÉ, M. O. G. Acción, uso, análisis y toxicidad de los edulcorantes sintéticos de empleo actual y potencial en Cuba. *Alimentaria*, Madrid, v. 26, n. 204, p. 47-52, jul/ago. 1989.
- CÂNDIDO, L. M. B., CAMPOS, A. M. *Alimentos para fins especiais: dietéticos*. São Paulo: Varela. 423p, 1996.
- CARDELLO, H. M. A. B.; DAMÁSIO, M. H. Edulcorantes e suas características: Revisão. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 31 (2), jul/dez, p.241 -248, 1997.
- CERESTAR. Providing the bulk of the flavour. *Food Processing*, Kent, v. 62, n. 11, p. 25 - 31, Nov. 1993.
- DANIELS, D. H., JOE, F. G., WARNER, C. R., FAZIO, T. Liquid chromatographic determination of aspartame in dry beverage bases and sweetener tablets with confirmation by thin layer chromatography. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, v. 67, n. 3, p. 513-515, May/June. 1984.
- DARÉ, R. Aspartame. In: *Edulcorantes e Adoçantes em Alimentos*. Campinas: ITAL. 1990. p. 15-18.
- DAVÍDEK, J., DAVÍDKOVÁ, E. Non-nutritive sweeteners. *International Food Ingredients*, [s.l.], n. 3, p. 30-34, 1991.
- 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.
- DZIEZAK, J. D. Sweeteners and product development. *Food Technology*, Chicago, v. 40, n. 1, p. 112-130, Jan. 1986.
- FATIBELLO-FILHO, O., SULEIMAN, A. A., GUILBAULT, G. G. *Journal of Microchemical*, n.60, p. 369, 1988.
- 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.
- FELLOWS, J. B., CHANG, S. W., SHAZER, W. H. Stability of aspartame in fruit preparations used in yogurt. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 53, n. 3, p. 689-691, May/June. 1989.
- FERNÁNDEZ, L. A. R. Edulcorantes intensos en la Comunidad Europea. *Alimentaria*, Madrid, v. 27, n. 216, p. 17-21, 1990.
- FOX, L., ANTHONY, G. D., LAU, E. P. K. Preservatives and artificial sweeteners: high-performance liquid chromatographic determination of L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester in various food products and formulations. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, v. 59, n. 5, p. 1048-1050, Sept/Oct. 1976.

- FRANK, R. A., MIZE, S. J., CARTER, R. An assessment of binary mixture interactions for nine sweeteners. *Chemical Senses*, Oxford, v. 14, n. 5, p. 621-632, Oct. 1989.
- FURDA, I. 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.
- GALLETTI, G. C.; BOCCHINI, P. High-performance liquid chromatography with electrochemical detection of aspartame with a post-column photochemical reactor. *Journal of Chromatography A*, 729, p.393 - 398, 1996.
- GIBBS, B. F. ; ALLI, I.; MULLIGAN, C.N. Simple and rapid-performace liquid chromatographic method for the determination of aspartame and its metabolites in foods. *Journal of Cromatography*, n. 725, p.372 - 377, 1996.
- GIESE, J. H. (Ed).Hitting the spot: beverages and beverage technology. *Food Technology*, Chicago, v. 46, n. 7, p. 70 - 80, july, 1992.
- GIESE, J. H. Alternative sweeteners and bulking agents. An overview of their properties, function, and regulatory status. *Food Technology*, Chicago, v. 47, n. 1, p. 144, Jan. 1993.
- GLINSMANN, W. H., DENNIS, D. A. Regulation of nonnutritive sweeteners and other sugar substitutes. In: KRETCHMER, N., HOLLENBECK, C. B. *Sugars and Sweeteners*. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 257-285.
- GRAVES, D. J.; LUO, S. Decomposition of aspartame caused by heat in acidified and dried state. *Journal Agric. Food Chem.*, v. 35, n. 3, p. 439 - 442, 1987.
- GRENBY, T. H. Intense sweeteners for the food industry: an overview. *Trends in Food Science & Technology*, Cambridge, v. 2, n. 1 [7], p. 2-6, Jan. 1991.
- GRENBY, T. H., PARKER, K. J., LINDLEY, M. G. *Developments in Sweeteners – 2*. London: Applied Science Publishers, 1983. 254 p.
- GUILBAULT, G. G., LUBRANO, G. J., KAUFFMANN, J. M., PATRIARCHE, G. J. Enzyme electrodes for the sugar substitute aspartame. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 206, n. 20, p. 369-374, 1988.
- GUION, P. Les agents de sapidé. *Industries Alimentaires et Agricoles*, Paris, v. 111, n. 9, p. 575 -582, sept, 1994.
- GUVEN, K. C. ; OZOL, T. *Acta Pharmaceutica Turcica*, Istambul, n. 26, p. 28, 1984.
- HOMLER, B. E. Properties and stability of aspartame. *Food Technology*, Chicago, v. 38, n. 7, p. 50-55, July. 1984.
- HOMLER, B., KEDO, A., SHAZER, W. R. FDA approves four new aspartame uses. *Food Technology*, Chicago, v. 41, n. 7, p. 41-44, July, 1987.

- IOSHII, S. *Ingestão diária potencial de edulcorantes no Brasil*. Campinas, 1992. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- JACKSON, K. G.; HOWELLS, J.; ARMSTRONG, J. Sweeteners in special foods for diabetic, slimming and medical purposes. In: GRENBY, T. H. (Ed). **Developments in Sweeteners** - 3. London: Elsevier Applied Science, 1987, p. 213 - 262.
- KANNER, J. D.; FENNEMA, O. Photooxidation of tryptophan in the presence of riboflavin. **Journal Agric. Food Chem.** n. 35, p. 71 - 76, 1987.
- KIER, L. B. **Journal of Pharmacology and Science**, n. 61, p. 1394, 1972.
- KIM, S. K.; JUNG, M. Y.; KIM, S. Y. Photodecomposition of aspartame in aqueous solutions. *Food Chemistry*, Vol. 59, n. 2, p. 273 - 278, 1997.
- KING, R. D., CHEETHAN, P. S. J. **Food Biotechnology**, v. 2, New York: Elsevier Applied Science, p. 219, 1988.
- KLACIK, K. Applications in confectionery: sugarless hard candy technology review. **The Manufacturing Confectioner**, Chicago, v. 70, n. 11, p. 69 - 76, Nov., 1990.
- KNORR, D. **Food Biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc. 1987. p. 425.
- KVASNICKA, F. Analysis of the sweetener aspartame by capillary isotachophoresis. **Journal of Chromatography**, n. 390, p. 237 - 240, 1987.
- LARSON-POWERS, M., PANGBORN, R. M. Paired comparison and time-intensity measurements of the sensory properties of beverages and gelatins containing sucrose or synthetic sweeteners. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 43, p. 41-46, 1978.
- LAU, O. W., LUK, S. F., CHAN, W. M. Spectrophotometric determination of aspartame in soft drinks with ninhydrin as reagent. **Analyst**, London, v. 113, p. 765-768, May. 1988.
- LAWRENCE, J. F., CHARBONNEAU, C. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse – phase liquid chromatography with absorbance detection. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 71, n. 5, p. 934-937, May. 1988.
- 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, p. 261-266, 1987.
- LAWLESS, H. T.; CLAASSEN, M. R. Application of the central dogma in sensory evaluation. **Food Technology**, Chicago, v. 47, n. 6, p. 139 -223, june, 1993.
- LUDUVIG, M.M. Saiba Usar. **Revista Saúde**. Junho, p.66 - 74, 1998.
- MATHESON, I. B. C.; LEE, J. Chemical reaction rates of amino acids with singlet oxygen. **Photochem. Photobiol.**, n. 29, p. 879 - 881, 1979.

- MATYSIAK, N. L.; NOBLE, A. C. Comparison of temporal perception of fruitiness in model systems sweetened with aspartame, na aspartame + acesulfame k blend, or sucrose. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 3, p. 823 - 826, May/June, 1991.
- MAZUR, R. H. In: STEGINK, L. D., FILER, L. J. **Discovery of Aspartame**. New York: Marcel Dekker. 1984. P. 3.
- MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B. T. **Sensory Evaluation techniques**. Boca Raton: CRC Press, 1988, p.45.
- MELLO, M. A . **Metodologia analítica para determinação do aspartame e seus produtos de decomposição em refrigerantes por cromatografia líquida de alta eficiência**. Campinas, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- NABORS, L. B. Intense sweeteners: acesulfame-k, alitame, aspartame, saccharin, sucralose. **The Manufacturing Confectioner**, Chicago, v. 70, n. 11, p. 65-68, Nov. 1990.
- NABORS, L. B., GELARDI, R. C. **Alternatives sweeteners**. New York: Marcel Dekker, 1986. 355 p.
- NEIRYNCK, W.; 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.
- NOBLE, A. C., MATYSIAK, N. L., BONNANS, S. Factors affecting the time-intensity parameters of sweeteners. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 11, p. 121-126, Nov. 1991.
- NORDMANN, H. Les édulcorants. **Industries Alimentaires et Agricoles**, Paris, v. 111, n. 9, p. 593-596, sept. 1994.
- O'BRIEN, L., GELARDI, R. C. **Chemtech**, Washington, p. 274, May. 1981.
- O'MAHONY, M. Cognitive aspects of difference testing and descriptive analyses: criterion variation and concept formation. In: McBRIDE, R.L.; MacFIE, H. J.H. **Psychological basis of sensory evaluation**. London: Elsevier Applied Science, 1990
- OZOL, T. **Acta Pharmaceutia Turcica**, n. 26, p. 59, 1984.
- PIETRA, A . M.; CAVRINI, V.; BONAZZI, D.; BENFENATI, L. HPLC Analisis of Aspartame and Saccharin in Pharmaceutical and dietary formulations. **Chromatographia**. Vol. 30, n. 3/4, August, p. 215 - 219, 1990.
- PEDERSEN, D. C. Alternative sweeteners. In: GOLDENBERG, I., WILLIAMS, R. **Biotechnology and Food Ingredients**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. p. 393-413.



- POWERS, M. A. Sweetener blending: how sweet it is. *Journal of American Dietetic Association*, Chicago, v. 94, n. 5, p. 498, 500, May. 1994.
- PRASAD, U. V. New methods for the determination of aspartame. *Food Chemistry*, Barking, v. 28, n. 4, p. 269-278, July, 1988.
- 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.
- PRUDEL, M., DAVIDKOVÁ, E. *Analytical Abstracts*, London, n. 40, 1F27, 1981
- 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.
- PRUDEL, M., DAVIDKOVÁ, E., DAVÍDEK, J., KMÍNEK, M. Kinetics of decomposition of aspartame hydrochloride (Usal) in aqueous solutions. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 51, n. 6, p. 1393-1397, 1986.
- QUEST International. Ingredients. *Chilton's Food Engineering International*, Radnor, v. 20, n. 2, p. 19-24, Apr. 1995.
- RODRIGUEZ-PALACIOS, F. J., ITURBE-CHIÑAS, F. A., VALLE-VEJA, P. Edulcorantes. *Revista de Tecnologia de Alimentos*, São Paulo, n. 4, p. 12-18, 1986.
- ROSENTHAL, I. Photooxidation in foods. In **Singlet O<sub>2</sub>**, Vol. IV: Polymers and biomolecules, ed. A. A. Frimer. CRC Press, Boca Raton, p. 146 - 163, 1985.
- 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, 1989.
- SHALLENBERGER, R. S.; ACREE, T. E. Molecular theory of sweet taste. *Nature*, London, v. 216, n. 5114, p.480 - 482, Nov. , 1967.
- SMITH, V. J., GREEN, R. A., HOPKINS, T. R. Determination of aspartame in beverages using an alcohol oxidase enzyme electrode. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, v. 72, n. 1, p. 30-33, Jan/Feb. 1989.
- 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, 1989.
- STEGINK, L. Aspartame: review of the safety issues. *Food Technology*, Chicago, v. 41, n. 1, p. 119-121, Jan. 1987.
- STEGINK, L., FILER JR, L. J. *Aspartame: physiology and biochemistry*. New York: Marcel Dekker, 1984. 655 p.

- STEMPFL, W.; LOTZ, A. : Stabilità nelle bevande alla cola dolcificanti. **Industrie delle Bevande** - XXV, febbraio, p. 11 - 16, 1996.
- TESCHNER, H. J. Productos de moda bajos en calorías en Sudamérica. **Industria Alimenticia**, Havana, v. 6, n. 2, p. 40-47, Feb. 1995.
- TINTI, J. M.; NOFRE, C. Why does a sweetener taste sweet? A new model. In: WALTERS, E. D.; ORTHOEFER, F.T.; DUBOIS, G.E. **Sweeteners. Discovery, molecular design, and chemoreception**. Washington: American Chemical Society, 1991, p.206 - 213.
- 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, 1985.
- TSOUBELI, M. N.; LABUZA, T. P. Accelerated kinetic study of aspartame degradation in the neutral pH range. **Journal of Food Science**, vol. 56, n. 6, p. 1671 - 1675, 1991.
- TYLER, T. A. Liquid chromatographic determination of sodium saccharin, caffeine, aspartame, and sodium benzoate in cola beverages. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 67, n. 4, p. 745-747, July/Aug. 1984.
- UMA VISÃO técnica do NutraSweet. Skokie: **NutraSweet**, 1986. 12p. Publicação técnica.
- VALEJO, R. B. B. *et al.* Edulcorante artificial: aspartame. **Alimentaria**, Madrid, v.30, n. 244, p.27 - 32, jul/ago. 1993.
- VEERABHADRARAO, M.; NARAYAN, M. S.; KAPUR, O. Reverse phase liquid chromatographic determination of some food additives. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 70, n. 3, p. 578-582, May/June, 1987.
- VERDI, R. J.; HOOD, L. L. Advantages of alternative sweetener blends. **Food Technology**, Chicago, v. 47, n. 6, p. 94-101, June. 1993.
- VERSTAPPEN, T. A. ; MILTENBURG, S. M. S. Metodi per l'analisi dell'aspartame. **Industrie Alimentari**. n. XXIX, febbraio, p. 132 - 136, 1990.
- VERZELLA, G., MANGIA, A. High-performance liquid chromatography analysis of aspartame. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, n. 346, p. 417-422, 1985..
- WALTERS, E. D. The rational discovery of sweeteners. In: WALTERS, E. D.; ORTHOEFER, F.T.; DUBOIS, G. E. **Sweeteners. Discovery, molecular design, and chemoreception**. Washington: American Chemical Society, 1991, p. 1 - 11.
- WEBB, N. G., BECKMAN, D. D. Reverse phase liquid chromatographic determination of aspartame in beverages and beverages mixes. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 67, n. 3, p. 510, May/June. 1984.

WEIL, L. On the mechanism of the photo-oxidation of amino acids sensitized by methylene blue. **Arch. Biochem. Biophys.**, n. 110, p. 57 - 68, 1965.

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.



## Capítulo 2

# **DETERMINAÇÃO DE ASPARTAME E SEUS PRODUTOS DE DECOMPOSIÇÃO EM REFRIGERANTES DIETÉTICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

## RESUMO

Refrigerantes dietéticos foram analisados por CLAE para quantificar aspartame e seus produtos de decomposição (dicetopiperazina, aspartilfenilalanina e fenilalanina), durante o prazo de validade dos mesmos (começo, meio e final da validade). Foram utilizadas quatro marcas de refrigerantes e três sabores: duas colas, um guaraná e um limão em dois tipos de embalagem, lata e PET. Os refrigerantes foram armazenados em três temperaturas (0°C, 24,5°C e 38°C) a fim de tentar simular as condições utilizadas nos diversos tipos de transportes e armazenamento em todo o Brasil.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa C18 Spherisorb<sup>TM</sup> ODS – 2 e fase móvel composta de tampão ácido dihidrogenofosfato de potássio/ácido fosfórico 0,0125 M pH 3,50: acetonitrila (95:5, v/v). A concentração de acetonitrila aumentou linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica. A vazão da fase móvel foi de 0,8mL min<sup>-1</sup> e a detecção foi em 210nm.

Os resultados mostraram que inicialmente dois dos quatro refrigerantes apresentaram quantidade de aspartame maior do que o declarado no rótulo mas menor que o limite permitido na legislação brasileira. Nenhum produto de decomposição foi encontrado no tempo zero da análise. Nos quatro refrigerantes a decomposição do aspartame aumentou com a elevação da temperatura de armazenamento e o tempo de estocagem. A dicetopiperazina e aspartilfenilalanina foram encontradas em praticamente todas as condições estudadas dos quatro refrigerantes, enquanto que fenilalanina apareceu somente nas condições mais drásticas, a 38°C.

O refrigerante que apresentou menores porcentagens de perdas de aspartame no final da validade foi a cola 2 (0°C – 3,3%, 24,5°C – 17,5% e 38°C- 65,1%), e o que mais apresentou porcentagens de perdas foi o guaraná (0°C – 10,9% e 38°C- 93,0%) e limão (24,5°C – 49,1%).

## SUMMARY

HPLC was used to quantify aspartame and its decomposition products (dicetopiperazine, aspartilphenylalanine and phenylalanine) in diet soft drinks, during the period of validity (beginning, middle and end). Four different soft drink brands were analyzed: two colas, one guaraná and one lemon, in two types of container; can and PET. The soft drinks were stored at three different temperatures (0°C, 24.5°C and 38°C) in order to simulate the conditions used in several kinds of transport and storage in Brazil.

The chromatographic separation was done using a reverse phase column Spherisorb C18 ODS - 2 and a mobile phase composed of 0.0125 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 3.50) - acetonitrile (95:5, v/v). The acetonitrile concentration was linearly increased up to 25% in 40 minutes. The mobile phase flow rate was  $0.8 \text{ mL min}^{-1}$  and detection at 210 nm.

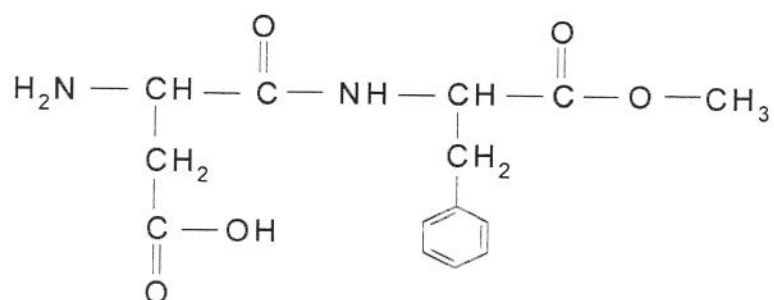
The results showed that two of the four soft drink brands had amounts of aspartame greater than those declared on the label but smaller than the limit allowed by the Brazilian legislation. Decomposition products were not found at zero time of analysis. An increase in aspartame decomposition was also observed in the soft drinks which were stored at higher temperatures and longer validity. Dicetopiperazine and aspartilphenylalanine were found under almost all conditions and in all brands studied, while phenylalanine was only found under the most drastic conditions, at 38°C.

The soft drink that showed the lowest losses in aspartame level at the end of the validity was cola 2, (0°C - 3.3%, 24.5°C - 17.5% and 38°C - 65.1%), and guaraná showed the biggest loss (0°C - 10.9% and 38°C - 93.0%) and lemon (24.5°C - 49.1%).

## 2.1- INTRODUÇÃO

Aspartame, N-L- $\alpha$ -aspartil-L-fenilalanina-L-metil éster, é um adoçante intenso descoberto em 1965 por J.Schlatter e comercializado pela Searle & Co. sob a propriedade da NutraSweet (Prodolliet & Bruehlhart, 1993). O aspartame é cerca de 180 a 200 vezes mais doce que a sacarose e exibe um gosto semelhante, sem sabor residual amargo ou metálico (Neirynck & Nollet, 1988; Kim *et al.*, 1997; Almeida-Muradian & Penteado, 1990; Prodolliet & Bruehlhart, 1993; Homler, 1984).

Do ponto de vista estrutural, o aspartame é um éster metílico de dois aminoácidos, a fenilalanina e o ácido aspártico (figura 2.1), é um dipeptídeo branco, cristalino, inodoro e de baixa caloria (NutraSweet, 1986). O aspartame acentua o aroma e prolonga a percepção do sabor das frutas, principalmente de frutas ácidas, sendo que esta intensificação é mais efetiva com sabores naturais do que com artificiais (Dziezak, 1986; Giese 1992).



**Figura 2.1:** Fórmula estrutural do aspartame.

O consumo de edulcorantes artificiais tem aumentado pela maior oferta de alimentos e bebidas dietéticas, principalmente através dos refrigerantes “diet” e “light”. No Brasil o aspartame tem seu uso permitido no limite de 75mg/100mL para bebidas dietéticas, sendo classificado como um edulcorante artificial (Brasil, 1995; ABIA, 1988).

A estabilidade do aspartame está associado à sua identidade química como éster dimetílico do dipeptídeo aspartilfenilalanina. Em decorrência da instabilidade da ligação éster sob condições desfavoráveis de umidade, pH e temperatura pode haver hidrólise do aspartame a aspartilfenilalanina (AP) e / ou a dicetopiperazina (DKP), que por fim pode se hidrolisar até seus compostos aminoácidos (Fernández, 1990; Homler, 1984; NutraSweet,

1986). Nenhum desses produtos de conversão são doces, mas não conferem sabor desagradável ao produto (Homler, 1984; Vallejo *et al.*, 1990).

A estabilidade do aspartame em solução depende de 3 fatores primários: tempo, temperatura e pH. Como a maioria das reações químicas, a hidrólise do aspartame é mais rápida em temperaturas altas, isto limita o potencial para uso nos produtos que são cozidos, fritos ou assados, ou em processos que precisam de altas temperaturas em tempo prolongados. Em alguns casos, adiciona-se aspartame extra para compensar a diminuição durante o processo de confecção e/ou armazenamento do alimento (Homler, 1984).

Pode ser utilizado em praticamente em todos os tipos de alimentos, incluindo: adoçantes de mesa, assados, misturas em pó, cereais, gomas de mascar, balas duras e moles, sobremesas, bebidas, congelados, refrigerados, geléias, coberturas, xaropes, produtos lácteos e produtos farmacêuticos (Almeida, 1991).

A estabilidade a seco do aspartame (com 4,0 a 4,5% de umidade) é excelente. Em condições adequadas de armazenagem, o produto dura mais de 5 anos sem apresentar qualquer alteração significativa (NutraSweet, 1986). Em solução a estabilidade depende do tempo de estocagem, temperatura, pH e umidade livre (NutraSweet, 1986; Prodolliet & Bruehlhart, 1993; Kim *et al.*, 1997; Homler, 1984). É estável no intervalo de pH de 3 a 5, tendo a melhor estabilidade em temperatura de 20 - 25°C e pH igual a 4,3.

Prudel & Davidkova (1981), mostraram que o aspartame em solução tampão citrato – fosfato foi muito estável em pH 4 – 5 e menos estável abaixo e acima desses valores, similarmente Stamp (1989) demonstrou uma ótima estabilidade do aspartame em solução tampão fosfato com pH 4 e 5. A estabilidade do aspartame é maior em sistemas com atividade de água menor que 0,99 (Graves & Luo, 1987; Bell & Labuza, 1991). A temperatura também é um importante fator da estabilidade do aspartame durante o armazenamento. Com o aumento da temperatura em um dado tempo de armazenagem, a quantidade de aspartame restante é diminuída (Holmer, 1984; Prudel *et al.*, 1985; Fellows *et al.*, 1986; Tsoubeli & Labuza, 1991).

Segundo Wells (1989) refrigerantes armazenados por 8 semanas, 11 – 16% e 28% do aspartame foram perdidos quando mantidos a 20 e 30°C, respectivamente. Estudos realizados pela G. D. Searle, relacionados com a estabilidade do aspartame, indicaram que 50% do aspartame inicial se degradam nos refrigerantes a base de cola, após estocagem por

seis meses a 30°C. Em xaropes de cola (pH 2,4), 75% do aspartame inicial permaneceram depois de aproximadamente duas semanas de armazenamento a 30°C.

Stempfl & Lotz (1996) pesquisaram a estabilidade de várias edulcorantes em bebidas sabor cola e constataram que refrigerantes adoçados com aspartame e conservados a temperatura ambiente apresentavam 80% da quantidade inicial após 10 semanas, ao término do teste, 1 ano, o refrigerante adoçado com aspartame apresentava 40% do conteúdo inicial.

Neiryneck & Nollet (1988) estudaram os efeitos da temperatura, tempo de armazenagem e pH na decomposição do aspartame em bebidas não alcoólicas, depois de um período de 180 dias a temperatura ambiente 60% do aspartame é decomposto em pH 2,5 e somente 35% com pH 4,5.

O método mais utilizado para a determinação do aspartame e seus produtos de decomposição é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Prodolliet & Bruehlhart, 1993; Neiryneck & Nollet, 1988; Kim *et al.*, 1997; Graves & Luo, 1987; Bell & Labuza, 1991; Lotz *et al.*, 1992; Stempfl & Lotz, 1996; Bell & Wetzel, 1995; NutraSweet, 1986; Prudel & Davidková, 1985; Lawrence, 1987; Pietra *et al.*, 1990; Gibbs *et al.*, 1996; Mello, 1999).

Mello, (1999) desenvolveu e validou uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência, que permitiu a separação e a quantificação do aspartame e seus produtos de decomposição aspartilfenilalanina, dicetopiperazina e fenilalanina em uma única corrida cromatográfica, utilizando eluição por gradiente.

Este trabalho teve como objetivo determinar o aspartame e seus principais produtos de decomposição aspartilfenilalanina, dicetopiperazina e fenilalanina em refrigerantes dietéticos através de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) durante o prazo de validade dos mesmos, armazenados em várias temperaturas e embalagens diferentes.

## 2.2 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 - Materiais

As amostras de refrigerantes dietético analisadas neste trabalho foram coletadas diretamente nas respectivas fábricas, imediatamente após sua fabricação de modo a garantir o tempo "zero" de adição do aspartame. Foram utilizadas quatro marcas de refrigerantes sendo duas colas, uma em sabor guaraná e uma em sabor limão. Todas as amostras foram acondicionadas em dois tipos de embalagem: lata e PET.

Os refrigerantes foram armazenados nas temperaturas de refrigeração (0°C) em refrigeradores, ambiente (24,5°C) e estufa (38°C) a fim de tentar simular as condições utilizadas nos diversos tipos de transportes e armazenamento em todo o Brasil.

As amostras foram analisadas no começo, meio e final da validade estabelecida pelos fabricantes, conforme Tabela 2.1.

A amostragem foi através da mistura de duas unidades de refrigerantes do mesmo lote para cada marca / sabor e embalagem.

**Tabela 2.1:** Informações obtidas dos rótulos sobre os edulcorantes adicionados nas amostras de refrigerantes em mg/100mL.

Sabores	Acesulfame	Aspartame	Ciclamato	Sacarina	Validade (meses)
Cola 1	8,99	34,96	Ausente	Ausente	4
Cola 2	Ausente	12,00	31,70	5,80	3
Guaraná	17,00	17,00	17,00	Ausente	6
Limão	8,95	34,92	Ausente	Ausente	4

Nas determinações analíticas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizados os padrões N-L- $\alpha$ -aspartil-L-fenilalanina-1-metil éster (aspartame, APM), N-L- $\alpha$ -aspartil-L-fenilalanina (aspartilfenilalanina, AP), L-fenilalanina (fenilalanina, PHE) da Sigma Chemical Company e ácido (2S-cis)-(-)-5-benzil-3,6-dioxo-2-piperazina etanóico (dicetopiperazina, DKP) da Aldrich Chemical Company. As soluções estoque dos padrões foram preparados dissolvendo-se em água deionizada. Os padrões



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

A fase móvel foi constituída de acetonitrila (Omnisolv – EM SCIENSE) de grau cromatográfico, e de solução tampão com concentração de  $0,0125 \text{ mol}^{-1}$  de diidrogenofosfato ácido de potássio,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  P.A. (Merck), com pH ajustado a 3,50 com ácido fosfórico,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  P.A (Merck).

A água utilizada nas soluções e na fase móvel foi destilada e deionizada no sistema de água ultrapura Milli-Q Plus.

A água e a solução tampão foram filtradas 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. Acetonitrila 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.

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido, composto de bomba ternária modelo 9010 (Varian, Harbor City, CA) com um injetor manual tipo Rheodyne Inc. modelo 7125 (Cotati, CA) com alça de amostragem de  $20 \mu\text{L}$ , detector policromático por arranjo de diodos (DAD) modelo 9065 (Varian, Harbor City, CA), operando com comprimento de onda a  $210 \text{ nm}$ ,  $0,1 \text{ AUFS}$ , integrador modelo 4400 (Varian, Harbor City, CA) com atenuação 8. Utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 (Supelco, Inc., Bellefonte, PA),  $250 \times 4,6 \text{ mm}$ , empacotada com Spherisorb<sup>TM</sup> ODS-2 (Phase Separations, Ltd.) de  $5 \mu\text{m}$  e coluna de guarda C18  $10 \times 4,6 \text{ mm}$ , empacotada com Bondesil no próprio laboratório.

Além do cromatógrafo, foram utilizados: aparelho de filtração para as fases móveis, todo em vidro (Millipore Corporation, Bedford, MA), aparelho de filtração das amostras, em aço inox AA-Millipore (Millipore Corporation, Bedford, MA), banho ultra-som, Microsonic SX20, 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.



## 2.2.2 - Métodos

**Preparo da Amostra:** Os refrigerantes foram homogeneizados e colocados em banho ultra-som para desgaseificação por 40 minutos e filtrados em filtros de celulose de  $0,45\mu\text{m}$  antes da injeção no cromatógrafo, após a homogeneização foi realizada a determinação pH destas amostras.

**Análise Cromatográfica:** Foi utilizado a metodologia desenvolvida por Mello, (1999) O método analítico usado para determinação do aspartame e seus produtos de decomposição em refrigerantes dietéticos foi a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de fase reversa. O uso deste método dispensa o processo de extração do aspartame e de seus produtos de decomposição.

Foram injetados uma alíquota de  $20\ \mu\text{L}$  das amostras filtradas no sistema cromatográfico. A eluição foi feita com um gradiente de fase móvel composto por tampão ácido dihidrogenofosfato de potássio/ácido fosfórico  $0,0125\ \text{M}$  pH 3,50: acetonitrila (95:5, v/v). A concentração de acetonitrila aumentou linearmente até 25% aos 40 minutos de corrida cromatográfica. A vazão da fase móvel foi de  $0,8\ \text{mL min}^{-1}$  e a detecção foi em 210 nm. Após a corrida cromatográfica foram necessários 20 minutos para o condicionamento da coluna com a fase móvel inicial antes da próxima injeção.

**Identificação e Quantificação:** A identificação dos picos do aspartame e seus produtos de decomposição foi realizada através da comparação dos tempos de retenção entre os padrões e as amostras. A confirmação das identidades foi obtida através do espectro de absorção na região do ultravioleta de cada pico registrado pelo detector de arranjo de diodo e também pela co-cromatografia. A metodologia utilizada para a quantificação do aspartame e seus produtos de decomposição foi através da padronização externa, utilizando a área do pico. Para esta quantificação foram necessárias injeções diárias dos padrões (valores dos pontos da curva analítica) juntamente com as injeções das amostras, este procedimento foi necessário para se uniformizar as condições do equipamento nas injeções das amostras e padrões. As curvas analíticas foram utilizadas para comprovar a linearidade de resposta do método, e foi estabelecida através de seis pontos, sendo que cada ponto foi representado pela média de três determinações, num intervalo de 0,8 a 40,0 mg/100 mL para aspartame e 0,2 a 10,0 mg/100 mL para dicetopiperazina, aspartilfenilalanina e fenilalanina.

**Análise Estatística:** Os resultados referentes à análise cromatográfica foram expressos em média e desvio padrão. Utilizou-se análise de variância (ANOVA), com três fontes de variação; embalagem, validade e temperatura para cada refrigerante. A primeira em dois níveis (lata e PET), a segunda, também em dois níveis (meio e final da validade) e a terceira em três níveis (0°C, 24,5°C e 38°C). A análise de variância foi complementada pelo teste de comparação múltipla de médias (teste de Tukey). Para testar-se a homogeneidade de variâncias realizou-se o teste de Cochran, Hartley e Bartlett. Quando o teste de igualdade de variâncias foi rejeitado optou-se pela transformação Box-Cox (Sokal, & Rohlf, 1981).

As análises foram realizadas utilizando-se o programa "STATISTICA" (versão 4.3, 1993) da Statsoft, Inc..

## 2.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises dos refrigerantes, através das determinações por CLAE com relação ao aspartame no tempo zero, ou seja nos refrigerantes coletados no dia de sua fabricação estão na Tabela 2.2, além da quantidade de aspartame que está declarada no rótulo dos refrigerantes. Nenhum dos produtos de decomposição foi detectado neste momento (tempo zero).

Através dos resultados exposto na tabela 2.2, podemos observar que os refrigerantes cola 1 e limão estão com a quantidade de aspartame acima do valor declarado no rótulo que é de 34,96 mg/100 mL para cola 1 e 34,92 mg/100 mL para limão. O refrigerante sabor cola 1 contém 4,93mg, para embalagem lata e 4,92 mg para a PET acima do valor declarado no rótulo. O refrigerante sabor limão contém 4,74 mg para lata e 4,85mg para PET acima das especificações do rótulo. Apesar disso, as quantidades de aspartame nestes refrigerantes não estão acima dos limites máximos permitidos pela Legislação Brasileira em vigor que é 75 mg/100 mL em bebidas dietéticas (Brasil, 1988).

**Tabela 2.2:** Quantidade de aspartame em mg/100ml encontrada nas análises cromatográficas dos refrigerantes na etapa inicial (tempo zero) comparada com a quantidade de aspartame especificada nos rótulos em mg/100ml.

Refrigerantes	Embalagem	Aspartame (mg/100 ml)		
		Declarado	Encontrado*	CV (%)
Cola 1	Lata	34,96	$39,9 \pm 0,1$	03
Cola 1	PET	34,96	$39,9 \pm 0,2$	0,4
Cola 2	Lata	12,0	$11,07 \pm 0,07$	0,64
Cola 2	PT	12,0	$11,08 \pm 0,05$	0,49
Guaraná	Lata	17,0	$16,89 \pm 0,06$	0,37
Guaraná	PET	17,0	$16,8 \pm 0,1$	0,6
Limão	Lata	34,92	$39,66 \pm 0,07$	0,18
Limão	PET	34,92	$40 \pm 2$	4

(\*) Média em triplicata.

A determinação do pH dos refrigerantes foi realizada no início, meio e final da validade em todas as amostras. No tempo zero, as amostras apresentaram valores de pH em torno de 2,7; 2,9; 3,6; e 3,5 para os refrigerantes cola 1, cola 2, guaraná e limão respectivamente, nas embalagens lata e PET. Não houve alteração nos valores de pH durante a estocagem dos refrigerantes. Segundo Bell & Labuza (1991), muitas reações químicas, incluindo degradação do aspartame são influenciadas pelo pH. Prudel e Davidkova (1981), Stamp (1989), Ozol (1986) mostraram que o aspartame em solução é mais estável em pH 4 – 5 e menos estável abaixo e acima destes valores. Segundo NutraSweet,(1986) a maior estabilidade é verificada no intervalo entre pH 3 e 5. Então, de acordo com os resultados obtidos na determinação do pH, observa-se que os sabores guaraná e limão apresentam pH mais adequado ( 3,6 e 3,5 para guaraná e limão respectivamente) dos que os sabores cola ( 2,7 e 2,9 para cola 1 e cola 2 respectivamente).

### Análise Estatística:

Os resultados da análise de variância (ANOVA) e teste de média (Tukey) dos refrigerantes estão nas tabelas 2.3 a 2.6.

### Refrigerante Cola 1

Os resultados do teste de média (Tukey) do refrigerante cola 1 com relação ao aspartame, dicetopiperazina, aspartilfenilalanina e fenilalanina estão na tabela 2.3.

**Tabela 2.3:** Resultados em mg/100 mL e desvio padrão do teste de média\* (Tukey) do refrigerante cola 1 com relação ao aspartame (APM), dicetopiperazina (DKP), aspartilfenilalanina (ASP) e fenilalanina (PHE).

Validade *	Embalagem (lata)			Embalagem (PET)		
	T 0°C	T 24,5°C	T 38°C	T 0°C	T 24,5°C	T 38°C
<b>APM</b>						
Meio (1)	37,89±0,75 <sup>a</sup>	32,89±0,44 <sup>b</sup>	10,32±0,54 <sup>e</sup>	38,19±1,00 <sup>a</sup>	35,38±1,78 <sup>ab</sup>	18,46±0,62 <sup>d</sup>
Final (2)	35,88±1,49 <sup>ab</sup>	23,51±1,42 <sup>c</sup>	5,27±0,37 <sup>f</sup>	36,89±0,84 <sup>a</sup>	25,40±2,44 <sup>c</sup>	7,81±0,62 <sup>ef</sup>
<b>DKP</b>						
Meio (1)	0,25±0,02 <sup>h</sup>	2,50±0,11 <sup>d</sup>	5,44±0,42 <sup>b</sup>	0,33±0,02 <sup>g</sup>	2,85±0,12 <sup>c</sup>	5,22±0,31 <sup>b</sup>
Final (2)	0,68±0,02 <sup>e</sup>	5,36±0,23 <sup>b</sup>	9,62±0,49 <sup>a</sup>	0,44±0,01 <sup>f</sup>	5,25±0,46 <sup>b</sup>	8,71±0,09 <sup>a</sup>
<b>ASP</b>						
Meio (1)	1,89±0,08 <sup>d</sup>	2,63±0,09 <sup>c</sup>	9,22±0,64 <sup>a</sup>	1,23±0,03 <sup>f</sup>	2,80±0,19 <sup>c</sup>	5,17±0,20 <sup>b</sup>
Final (2)	2,86±0,20 <sup>c</sup>	9,29±0,18 <sup>a</sup>	2,92±0,08 <sup>c</sup>	1,50±0,08 <sup>e</sup>	5,46±0,46 <sup>b</sup>	8,68±0,56 <sup>a</sup>
<b>PHE</b>						
Meio (1)	0,00±0,00 <sup>f</sup>	0,00±0,00 <sup>f</sup>	1,22±0,01 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>f</sup>	0,00±0,00 <sup>f</sup>	0,55±0,01 <sup>d</sup>
Final (2)	0,00±0,00 <sup>f</sup>	0,20±0,02 <sup>e</sup>	4,62±0,04 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>f</sup>	0,20±0,01 <sup>e</sup>	1,68±0,06 <sup>b</sup>

• Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as diferentes temperaturas de armazenamento e entre as diferentes embalagens (lata e PET) para APM, DKP, ASP e PHE.

♦ (1) → 2 meses / (2) → 4 meses.

\* Médias em triplicata.

### **Aspartame - APM**

Através dos resultados da ANOVA constatou-se pelos valores de p que todas as fontes de variação (temperatura, embalagem e validade) e suas respectivas correlações tiveram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

As quantidades de aspartame diminuíram com o aumento da temperatura de estocagem e com aumento do prazo de validade para as duas embalagens, lata e PET. Na embalagem lata já houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre 0°C e 24,5°C no meio da validade, enquanto que na embalagem PET a diferença só foi significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre 0°C e 24,5°C na validade final. A maior perda ocorreu a 38°C na validade final da embalagem lata, com variação de 39,89 a 5,27 mg aspartame/100 mL.

### **Dicetopiperazina - DKP**

Através dos resultados da ANOVA constatou-se pelos valores de p que todas as fontes de variação (temperatura, embalagem e validade) e suas respectivas correlações diferiram significativamente a ( $p \leq 0,05$ ).

A dicetopiperazina foi detectada em todas as condições de estocagem analisadas. Houve um aumento na formação do DKP com o aumento da temperatura e do prazo de validade para as duas embalagens. Não houve diferença significativa a  $p \leq 0,05$  entre as embalagens lata e PET para as condições mais drásticas como a 24,5°C no final da validade, a 38°C no meio e final da validade.

### **Aspartilfenilalanina - ASP**

Através dos resultados da ANOVA constatou-se pelos valores de p que todas as fontes de variação (temperatura, embalagem e validade) e suas respectivas correlações tiveram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Houve um aumento na formação de aspartilfenilalanina com o aumento da temperatura e do prazo de validade nas duas embalagens, com exceção a 38°C no final da validade para a embalagem lata. A possível explicação para este fato, seria a decomposição deste composto em outros produtos como a dicetopiperazina e/ou ácido aspártico + fenilalanina. Portanto, a maior quantidade de aspartilfenilalanina foi a 24,5°C no final da validade na embalagem lata (9,29 mg/100 mL), a 38°C no meio da validade na embalagem

lata (9,22 mg/100 mL) e a 38°C no final da validade na embalagem PET (8,68 mg/100 mL) que não diferiram significativamente a  $p \leq 0,05$ .

### **Fenilalanina - PHE**

Através dos resultados da ANOVA constatou-se pelos valores de  $p$  que todas as fontes de variação (temperatura, embalagem e validade) e suas respectivas correlações tiveram diferença significativa a  $p \leq 0,05$ .

A fenilalanina só se formou na cola 1 a 24,5°C no final da validade e a 38°C nos dois prazos de validade nas duas embalagens. A diferença entre as duas embalagens só ocorreu a 38°C. A maior quantidade encontrada foi a 38°C no final da validade na embalagem lata, que diferiu significativamente  $p \leq 0,05$  das outras temperaturas de armazena

## Refrigerante – Cola 2

Os resultados do teste de média (Tukey) do refrigerante cola 2 com relação ao aspartame, dicetopiperazina, aspartilfenilalanina e fenilalanina estão na tabela 2.4.

**Tabela 2.4:** Resultados em mg/100 mL e desvio padrão do teste de média\* (Tukey) do refrigerante cola 2 com relação a aspartame (APM), dicetopiperazina (DKP), aspartilfenilalanina (ASP) e fenilalanina (PHE).

Validade *	Embalagem (lata)			Embalagem (PET)		
	T 0°C	T 24,5°C	T 38°C	T 0°C	T 24,5°C	T 38°C
<b>APM</b>						
Meio (1)	10,97±0,19 <sup>a</sup>	9,73±0,06 <sup>b</sup>	4,41±0,12 <sup>c</sup>	10,74±0,29 <sup>a</sup>	9,77±0,09 <sup>b</sup>	5,20±0,08 <sup>d</sup>
Final (2)	10,70±0,35 <sup>a</sup>	9,13±0,05 <sup>c</sup>	2,28± 0,02 <sup>g</sup>	10,49±0,12 <sup>a</sup>	8,96±0,21 <sup>c</sup>	3,87±0,05 <sup>f</sup>
<b>DKP</b>						
Meio (1)	0,23±0,02 <sup>g</sup>	0,66±0,02 <sup>f</sup>	2,05±0,04 <sup>b</sup>	0,26±0,01 <sup>g</sup>	0,80±0,06 <sup>c</sup>	2,17±0,08 <sup>b</sup>
Final (2)	0,26±0,01 <sup>g</sup>	0,94±0,01 <sup>d</sup>	2,46± 0,01 <sup>a</sup>	0,24±0,02 <sup>g</sup>	1,14±0,05 <sup>c</sup>	2,43±0,03 <sup>a</sup>
<b>ASP</b>						
Meio (1)	0,44±0,04 <sup>f</sup>	1,25±0,01 <sup>c</sup>	1,46±0,04 <sup>b</sup>	0,26±0,01 <sup>h</sup>	1,21±0,09 <sup>c</sup>	1,88±0,01 <sup>a</sup>
Final (2)	0,53±0,02 <sup>e</sup>	1,96±0,02 <sup>a</sup>	0,84± 0,02 <sup>d</sup>	0,29±0,01 <sup>g</sup>	1,49±0,03 <sup>b</sup>	1,25±0,03 <sup>c</sup>
<b>PHE</b>						
Meio (1)	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,20± 0,01 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>
Final (2)	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	1,01± 0,04 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,57±0,02 <sup>b</sup>

• Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as diferentes temperaturas de armazenamento e entre as diferentes embalagens (lata e PET) para APM, DKP, ASP e PHE.

♦ (1) → 1 mês e meio / (2) → 3 meses.

\* Médias em triplicata.

### Aspartame - APM

Através dos resultados da ANOVA constatou-se pelos valores de  $p$  que todas as fontes de variação (temperatura, embalagem e validade) e suas respectivas correlações tiveram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

As perdas de aspartame na cola 2 aumentaram com o aumento de temperatura nas duas embalagens, mas a diferença nessas perdas foi significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as validades meio e final e somente para as temperaturas 24,5°C e 38°C. A maior



decomposição do aspartame ocorreu a 38°C, no final da validade na embalagem lata (inicialmente de 11,07 mg para 2,28 mg/100 mL), que diferiu significativamente dos demais valores de aspartame.

### **Dicetopiperazina - DKP**

Através dos resultados da ANOVA constatou-se pelos valores de  $p$  que todas as fontes de variação (temperatura, embalagem e validade) e suas respectivas correlações tiveram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Nas duas embalagens, a dicetopiperazina formou-se em todas as condições analisadas e elevou-se com o aumento de temperatura. O aumento em relação ao prazo de validade foi maior do meio para o final, somente nas temperaturas 24,5°C e 38°C nas duas embalagens. A diferença entre as embalagens foi significativa ( $p \leq 0,05$ ) nos dois prazos de validade a 24,5°C. Na temperatura de 38°C não houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as embalagens nas duas validade. A maior concentração encontrada do composto foi na temperatura de 38°C no final da validade, tanto para lata como para PET (2,46 e 2,43 mg/100 mL respectivamente).

### **Aspartilfenilalanina - ASP**

Através dos resultados da ANOVA constatou-se pelos valores de  $p$  que todas as fontes de variação (temperatura, embalagem e validade) e suas respectivas correlações tiveram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

As diferenças na concentração de aspartilfenilalanina foram significativas ( $p \leq 0,05$ ) com o aumento das temperaturas de estocagem e do prazo de validade para as duas embalagens. Houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as embalagens em praticamente todas condições, e a maior formação deste composto foi na embalagem lata a 24,5°C no final da validade (1,96 mg/100 mL) e na PET na temperatura 38°C no meio da validade (1,88 mg/100 mL) que não diferiram entre si a  $p \leq 0,05$ . Na condição mais drástica a 38°C no final da validade houve uma diminuição do composto nas duas embalagens, devido a possível decomposição a dicetopiperazina e / ou ácido aspártico + fenilalanina.



final da validade (1,96 mg/100 mL) e na PET na temperatura 38°C no meio da validade (1,88 mg/100 mL) que não diferiram entre si a  $p \leq 0,05$ . Na condição mais drástica a 38°C no final da validade houve uma diminuição do composto nas duas embalagens, devido a possível decomposição a dicetopiperazina e / ou ácido aspártico + fenilalanina.

### **Fenilalanina - PHE**

Através dos resultados da ANOVA constatou-se pelos valores de p que todas as fontes de variação (temperatura, embalagem e validade) e suas respectivas correlações tiveram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

A fenilalanina só foi detectada na embalagem PET a 38°C no final da validade e na embalagem lata a 38°C no meio e final da validade, sendo o maior valor encontrado nesta última condição (1,01 mg/100 mL), sendo diferente significativamente a  $p \leq 0,05$  dos demais valores.

## Refrigerante guaraná

**Tabela 2.5:** Resultados em mg/100 mL e desvio padrão do teste de média\* (Tukey) do refrigerante guaraná com relação ao aspartame (APM), dicetopiperazina (DKP), aspartilfenilalanina (ASP) e fenilalanina (PHE).

Validade *	Embalagem (lata)			Embalagem (PET)		
	T 0°C	T 24,5°C	T 38°C	T 0°C	T 24,5°C	T 38°C
<b>APM</b>						
Meio (1)	16,89±0,27 <sup>a</sup>	14,83±0,60 <sup>c</sup>	4,85±0,31 <sup>g</sup>	16,25±0,81 <sup>a</sup>	13,58±0,03 <sup>d</sup>	8,12±0,04 <sup>e</sup>
Final (2)	16,09±0,56 <sup>abc</sup>	11,38±0,21 <sup>f</sup>	1,18± 0,04 <sup>i</sup>	15,00±0,12 <sup>ab</sup>	12,64±0,10 <sup>d</sup>	4,18±0,18 <sup>h</sup>
<b>DKP</b>						
Meio (1)	0,00±0,00 <sup>i</sup>	0,84±0,05 <sup>e</sup>	2,74±0,06 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>i</sup>	0,74±0,01 <sup>f</sup>	1,83±0,04 <sup>c</sup>
Final (2)	0,34±0,03 <sup>g</sup>	1,84±0,07 <sup>c</sup>	4,16± 0,09 <sup>a</sup>	0,21±0,02 <sup>h</sup>	1,21±0,01 <sup>d</sup>	2,73±0,21 <sup>b</sup>
<b>ASP</b>						
Meio (1)	0,29±0,01 <sup>e</sup>	1,03±0,09 <sup>b</sup>	0,98±0,03 <sup>bc</sup>	0,31±0,01 <sup>c</sup>	0,90±0,01 <sup>c</sup>	1,10±0,04 <sup>b</sup>
Final (2)	0,67±0,04 <sup>d</sup>	1,53±0,09 <sup>a</sup>	0,63± 0,01 <sup>d</sup>	0,38±0,01 <sup>e</sup>	1,07±0,60 <sup>b</sup>	0,62±0,02 <sup>d</sup>
<b>PHE</b>						
Meio (1)	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,52±0,01 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>
Final (2)	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	1,32± 0,08 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,62±0,02 <sup>b</sup>

• Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as diferentes temperaturas de armazenamento e entre as diferentes embalagens (lata e PET) para APM, DKP, ASP e PHE.

♦ (1) → 3 meses / (2) → 6 meses.

\* Médias em triplicata.

### Aspartame - APM

Através dos resultados da ANOVA constatou-se pelos valores de  $p$  que todas as fontes de variação (temperatura, embalagem e validade) e suas respectivas correlações tiveram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Nas duas embalagens houve perda significativa ( $p \leq 0,05$ ) do aspartame com o aumento de temperatura. A diferença foi significativa a  $p \leq 0,05$  principalmente na temperatura de 38°C no decorrer do prazo de validade, e a maior perda foi a 38°C no final da validade na embalagem lata (inicialmente de 16,89 mg para 1,18 mg/100 mL).

### **Dicetopiperazina -DKP**

Através dos resultados da ANOVA constatou-se pelos valores de p que todas as fontes de variação (temperatura, embalagem e validade) e suas respectivas correlações tiveram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

A dicetopiperazina não foi detectado a 0°C no meio da validade e sua concentração aumentou com a elevação da temperatura e dos prazos de validade nas duas embalagens. A lata apresentou as maiores concentrações em todas as condições (validade e temperatura) em relação ao PET, e a maior formação foi a 38°C, no final da validade, diferindo significativamente dos demais valores.

### **Aspartilfenilalanina -ASP**

Através dos resultados da ANOVA constatou-se pelos valores de p que todas as fontes de variação (temperatura, embalagem e validade) e suas respectivas correlações tiveram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Houve formação de aspartilfenilalanina em todas as condições estudadas, sendo que a máxima concentração ocorreu a 24,5°C no final da validade na embalagem lata (1,53 mg/100 mL), que diferiu significativamente a  $p \leq 0,05$  das demais concentrações.

A diminuição da concentração de ASP na embalagem lata a 38°C, no meio e final da validade e também na embalagem PET a 38°C no final da validade, é devido a decomposição deste produto em dicetopiperazina e/ou ácido aspártico + fenilalanina.

### **Fenilalanina**

Através dos resultados da ANOVA constatou-se pelos valores de p que todas as fontes de variação (temperatura, embalagem e validade) e suas respectivas correlações tiveram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

A fenilalanina só foi detectada a 38°C no meio e final da validade para a embalagem lata e na PET somente foi encontrado na temperatura 38°C no final da validade. Houve aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) entre 38°C com o decorrer da validade na embalagem lata em relação a PET, sendo a maior concentração encontrada na embalagem lata (1,32 mg/100 mL).

## Refrigerante limão

**Tabela 2.6:** Resultados em mg/100 mL e desvio padrão do teste de média\* (Tukey) do refrigerante limão com relação ao aspartame (APM), dicetopiperazina (DKP), aspartilfenilalanina (ASP) e fenilalanina (PHE).

Validade *	Embalagem (lata)			Embalagem (PET)		
	T 0°C	T 24,5°C	T 38°C	T 0°C	T 24,5°C	T 38°C
<b>APM</b>						
Meio (1)	38,97±0,52 <sup>a</sup>	22,73±0,18 <sup>c</sup>	9,30±0,05 <sup>g</sup>	39,61±0,49 <sup>a</sup>	35,24±0,70 <sup>b</sup>	18,18±0,30 <sup>e</sup>
Final (2)	36,55±0,84 <sup>b</sup>	20,19±0,38 <sup>d</sup>	5,16± 0,35 <sup>h</sup>	37,20±1,02 <sup>ab</sup>	23,14±0,29 <sup>c</sup>	10,86±0,10 <sup>f</sup>
<b>DKP</b>						
Meio (1)	0,22±0,01 <sup>i</sup>	1,19±0,03 <sup>f</sup>	4,43±0,04 <sup>b</sup>	0,20±0,01 <sup>i</sup>	0,51±0,01 <sup>g</sup>	2,79±0,02 <sup>c</sup>
Final (2)	0,29±0,02 <sup>h</sup>	2,31±0,06 <sup>e</sup>	9,40± 0,27 <sup>a</sup>	0,26±0,02 <sup>h</sup>	2,54±0,01 <sup>d</sup>	9,52±0,23 <sup>a</sup>
<b>ASP</b>						
Meio (1)	0,52±0,02 <sup>h</sup>	1,74±0,08 <sup>d</sup>	1,87± 0,05 <sup>d</sup>	0,404±0,005 <sup>i</sup>	0,72±0,01 <sup>f</sup>	2,21±0,05 <sup>c</sup>
Final (2)	0,56±0,01 <sup>g</sup>	2,74±0,04 <sup>a</sup>	1,45± 0,06 <sup>e</sup>	0,60±0,01 <sup>g</sup>	2,46±0,02 <sup>b</sup>	2,19±0,03 <sup>c</sup>
<b>PHE</b>						
Meio (1)	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,518±0,002 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>
Final (2)	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	1,32± 0,08 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>d</sup>	0,62±0,02 <sup>b</sup>

• Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as diferentes temperaturas de armazenamento e entre as diferentes embalagens (lata e PET) para APM, DKP, ASP e PHE.

♦ (1) → 2 meses / (2) → 4 meses.

\* Médias em triplicata.

### Aspartame - APM

Através dos resultados da ANOVA constatou-se pelos valores de  $p$  que todas as fontes de variação (temperatura, embalagem e validade) e suas respectivas correlações tiveram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

No refrigerante sabor limão a decomposição do aspartame também aumentou com a elevação da temperatura de armazenagem e com aumento do prazo de validade nas duas embalagens, sendo as maiores perdas encontradas sempre na lata, principalmente a 38°C e no final da validade (inicialmente de 39,89 para 5,16 mg/100 mL), diferindo significativamente a  $p \leq 0,05$  das demais concentrações.

### **Dicetopiperazina - DKP**

Através dos resultados da ANOVA constatou-se pelos valores de p que todas as fontes de variação (temperatura, embalagem e validade) e suas respectivas correlações tiveram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

A dicetopiperazina foi detectada em todas as condições estudadas, com o aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) elevando-se a temperatura e prazo de validade para as duas embalagens. A maior concentração foi encontrada na temperatura de 38°C e no final da validade tanto na lata quanto no PET (9,40 mg/100 mL e 9,52 mg/100 mL respectivamente).

### **Aspartilfenilalanina - ASP**

Através dos resultados da ANOVA constatou-se pelos valores de p que todas as fontes de variação (temperatura, embalagem e validade) e suas respectivas correlações tiveram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Este produto de decomposição também foi encontrado em todas as condições estudadas. Nas duas embalagens na validade final, a concentração foi maior a 24,5°C em vez de 38°C, devido a possível decomposição deste composto em dicetopiperazina e / ou ácido aspártico + fenilalanina. A maior concentração ocorreu na embalagem lata (2,74mg/100mL).

### **Fenilalanina - PHE**

Através dos resultados da ANOVA constatou-se pelos valores de p que todas as fontes de variação (temperatura, embalagem e validade) e suas respectivas correlações tiveram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Este composto só foi detectado a 38°C, no final da validade para a embalagem PET e meio e final da validade para lata. A maior concentração ocorreu a 38°C no final da validade para a embalagem lata (1,32 mg/100 mL), que diferiu significativamente a  $p \leq 0,05$  das demais concentrações.

Os dados da porcentagem de perdas do aspartame no meio e final da validade em relação as três temperaturas (0°C, 24,5°C e 38°C) e aos quatro refrigerantes (cola 1, cola 2, guaraná e limão) estão apresentados na Tabela 2.7 e 2.8.

**Tabela 2.7:** Percentuais de perda de aspartame com relação a quantidade inicial nas diferentes temperaturas de armazenamento (0°C, 24,5°C e 38°C) e embalagens (lata e PET) realizada no meio do prazo de validade dos refrigerantes.

Temp.	Cola 1 Lata (%)	Cola 1 PET (%)	Cola 2 Lata (%)	Cola 2 PET (%)	Guar. Lata (%)	Guar. PET (%)	Limão Lata (%)	Limão PET (%)
0°C	5,0	4,2	0,9	3,1	0,0	3,5	1,7	0,5
24,5°C	17,6	11,3	12,1	11,8	12,2	19,4	42,7	11,5
38°C	74,1	53,7	60,2	53,1	71,3	51,8	76,5	54,3

O refrigerante guaraná em lata na temperatura de 0°C não teve perda de aspartame, os refrigerantes limão PET e cola 2 PET tiveram perdas mínimas (0,5 e 0,9% respectivamente). O refrigerante que mais perdeu foi cola 1 lata (5,0 %).

Na temperatura de 24,5°C, os refrigerantes que tiveram as menores perdas foram, cola 1 PET (11,3%) seguido pelo limão PET (11,5%). A maior perda foi no limão lata com 42,7%.

O refrigerante que menos perdeu aspartame na temperatura de 38°C foi o guaraná PET (51,8%) e o que mais perdeu foi o limão em lata ( 76,5%).

**Tabela 2.8:** Percentuais de perda de aspartame com relação a quantidade inicial nas diferentes temperaturas de armazenamento (0°C, 24,5°C e 38°C) e embalagens (lata e PET) realizada no final do prazo de validade dos refrigerantes.

Temp.	Cola 1 Lata (%)	Cola 1 PET (%)	Cola 2 Lata (%)	Cola 2 PET (%)	Guar. Lata (%)	Guar. PET (%)	Limão Lata (%)	Limão PET (%)
0°C	10,1	7,5	3,3	5,3	4,7	10,9	7,8	6,6
24,5°C	41,1	36,3	17,5	19,1	32,6	24,9	49,1	41,2
38°C	86,8	80,4	79,4	65,1	93,0	75,2	87,0	72,7

A amostra de refrigerante que menos perdeu aspartame no final da validade nas temperaturas de 0°C e 24,5°C foi cola 2 em lata (3,3% e 17,5%) e na temperatura 38°C foi a cola 2 na embalagem PET (65,1%).

O refrigerante que mais perdeu aspartame no final da validade na temperatura de 0°C foi o guaraná na embalagem PET ( 10,9%), na temperatura de 24,5°C foi o limão lata ( 49,1%) e á 38°C foi o, guaraná em lata ( 93,0%).

De um modo geral os refrigerantes com embalagem em lata na temperatura de 38°C, apresentaram maior porcentagem de perda de aspartame, provavelmente devido as características da lata que acelera o processo de aumento da temperatura. No prazo final de validade as perdas do aspartame na cola 2 foram menores, principalmente a 38°C em relação aos outros refrigerantes, devido ao seu menor prazo de validade (3 meses) em relação a cola 1 e limão (4 meses) e guaraná (6 meses).

A temperatura é um importante fator da estabilidade do aspartame durante estocagem (Kim et al, 1997). Com o aumento da temperatura por um dado tempo de armazenagem, a quantidade de aspartame restante é diminuída, segundo Holmer (1984); Prudel et al (1986); Fellows et al (1991); Tsoubeli e Labuza (1991) e concordando com os dados obtidos neste estudo.

O cromatograma dos padrões e os seus respectivos espectros de absorção no UV estão representados nos anexos de 2.1 a 2.5 e os cromatogramas das amostras dos refrigerantes estão representados nos anexos 2.6 a 2.9. A linearidade do método ou resposta linear do detector foi obtida através das curvas analíticas (anexos 2.10 a 2.13), para o aspartame as concentrações variam de 0,8 a 40,0 mg/100 mL (coeficiente de correlação,  $r = 0,9997$ ), para DKP, AP e PHE as concentrações variam de 0,2 a 10,0 mg/100 mL (coeficiente de correlação,  $r = 0,9996$ ,  $r = 0,9991$ ,  $r = 0,9997$ , respectivamente).

## 2.4 - CONCLUSÃO

A quantidade de aspartame medido no tempo zero foi maior do que o declarado no rótulo em dois dos quatro refrigerantes analisados, mas menor que o limite permitido na legislação brasileira.

Nenhum produto de decomposição foi encontrado no tempo zero da análise.

O pH dos refrigerantes não modificou em nenhuma das condições estudadas, temperatura, embalagem e prazo de validade.

Nos quatro refrigerantes a decomposição do aspartame aumentou com a elevação da temperatura de estocagem e o aumento do prazo de validade.

A dicetopiperazina e aspartilfenilalanina foram encontradas em praticamente todas as condições de armazenamento estudadas para os quatro refrigerantes, enquanto que fenilalanina apareceu somente nas condições mais drásticas, a 38°C no meio e final da validade, com exceção do refrigerante cola 1 (lata e PET) onde foi detectada na temperatura 24,5°C no final da validade. Nesta condição mais drástica, a decomposição do aspartame foi maior, as concentrações de DKP e PHE também foram maiores, enquanto que as quantidades de aspartilfenilalanina diminuíram devido a provável decomposição deste produto a DKP e / ou ácido aspártico + fenilalanina.

A perda do aspartame e aumento dos produtos de decomposição foi geralmente maior na embalagem lata do que na PET, principalmente nas temperaturas 24,5°C e 38°C, provavelmente devido as características da lata que aceleram o processo de aumento de temperatura.

O refrigerante que teve menores porcentagens de perdas no final da validade foi a cola 2 (validade - 3 meses), enquanto que as maiores porcentagens de perdas variaram entre os outros três refrigerantes, dependendo da temperatura e tipo de embalagem. A maior porcentagem de perda ocorreu no guaraná em lata a 38°C com 93% de perda no final da validade (validade - 6 meses).



## 2.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L. G. A responsabilidade dos dietéticos. **Superhiper**, São Paulo, n.3, p.58-76, mar. 1991.
- ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; PENTEADO, M.V.C. Edulcorantes em alimentos – Uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n. 1 / 2, jan.-jun., p. 1-11,1990.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABIA. **Compêndio da Legislação de Alimentos**. São Paulo: ABIA, 1988.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABIA. **Compêndio da Legislação de Alimentos**: consolidação das normas e padrão de alimentos, v.1, cap.3, p. 3-36; cap.5, p.5.1-15,1991.
- BELL, L. N.; LABUZA, T. P. Aspartame degradation kinetics as affected by pH in intermediate and low moisture food systems. **Journal of Food Science**, v. 56, n.1, p. 17-20, 1991.
- BELL, L.N.; WETZEL, C.R. Aspartame degradation in solution as impacted by buffer type and concentration. **Journal Agric. Food Chem.**, n.43, p .2608-2612, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 122, de 24 de novembro de 1995. Aprova as Normas Técnicas referentes a Alimentos para Fins Especiais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, nº 229, p. 19788-19790, 30 nov. 1995 a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 41, de 12 de maio de 1995. Aprova as Normas Técnicas referentes a Alimentos para Fins Especiais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, nº 91, p. 6886-6887, 15 maio 1995 b.
- CANDEBAT, Z. E. V.; ROCHÉ, M. O . G. Acción, uso, análisis y toxicidad de los edulcorantes sintéticos de empleo actual y potencial en Cuba. **Alimentaria**, n.204, p. 47-52, julio-agosto,1989.
- DI PIETRA, A . M.; CAVRINI, V.; BONAZZI, D.; BENFENATI, L. HPLC analysis of aspartame and saccharin in pharmaceutical and dietary formulations. **Chromatographia**, n.3 / 4, v.30, p. 215-219, august, 1990.
- DZIEZAK, J. D. Sweeteners and product development. **Food Technology**, Chicago, v. 40, n. 1, p. 112-130, Jan. 1986.
- FELLOWS, J.B.; CHANG, S. W.; SHAZER, W. H. Stability of aspartame in fruit preparations used in yogurt. **Journal of Food Science**, Chicago, v.40,n.1,p.112-130, jan. 1986.

- FERNÁNDEZ, L. A.R. Edulcorantes intensos en la Comunidad Europea. **Alimentaria**, Madrid, v.27,n.216, p. 17-21,1990.
- GIBBS, B. F.; ALLI, I.; MULLIGAN, C.N. Simple and rapid-performace liquid chromatographic method for the determination of aspartame and its metabolites in foods. **Journal of Cromatography A**, n. 725, p. 372-377, 1996.
- GIESE, J. H. (Ed.). Hitting the spot: beveranges and beverage technology. **Food Technology**, Chicago, v.46, n.7, p.70-80, july,1992.
- GRAVES, D. J.; LUO, S. Decomposition of aspartame caused by heat in the acidified and dried state. **Journal Agric. Food Chem.**, v. 35, n.3, p. 439-442,1987.
- HOMLER, B. E. Properties and stability of aspartame. **Food Technology**, Chicago, v.38,n.7, p. 50-55, july,1984.
- KIM, S.K.; JUNG, M.Y.; KIM, S.Y. Photodecomposition of aspartame in aqueous solutions . **Food Chemistry**, v.59, n.2, p.273-278,1997.
- LAWRENCE, J. F. Use of post-column ion-pair extraction with absorbance detection for the liquid chromatographic determination of cyclamate and other artificial sweeteners in diet beverages. **Analyst**, v.112, p. 879-881, june, 1987.
- LAWRENCE, J.F.; CHARBONNEAU,C. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse – phase liquid chromatography with absorbance detection. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**. Arlington, v.71, n.5, p.934-937, may, 1988.
- LOTZ, C.K.; KREUDER, K. Sweetener stability. **Dairy Industries International**, v. 57, n. 2, p. 27-28, february,1992.
- MELLO, M. A . Metodologia analítica para determinação do aspartame e seus produtos de decomposição em refrigerantes por cromatografia líquida de alta eficiência. Campinas, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- NEIRYNCK, W.; 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
- 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.
- PRODOLLIET, J.; BRUELHART, M. Determination of acessulfam-K in food. **Journal of AOAC International**, v.76, n.2, p. 268-274,1993.

- 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*, v. 29, n. 4, p. 381-389, 1985.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **The principles and practice of statistics in biological research**. New York: W. H. Freeman and Co, 1981, pp.400-453.
- 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, 1989.
- STEMPFL, W.; LOTZ, A. Stabilità nelle bevande alla cola con dolcificanti. *Industrie delle Bevande*, n. XXV, p.11-16, febbraio, 1996.
- TSOUBELI, M. N.; LABUZA, T. P. Accelerated kinetic study of aspartame degradation in the neutral pH range. *Journal of Food Science*, v. 56, n. 6, p. 1671-1675, 1991.
- UMA VISÃO TÉCNICA DO NUTRASWEET. Skokie: **NutraSweet**, 1986, 12p, Publicação Técnica.
- VALLEJO, R. B. B. *ET AL.* Edulcorante artificial: Aspartame. *Alimentaria*, n.23, p. 23-25, outubro, 1990.
- WELLS, A.G. The use of intense sweeteners in soft drinks. In : GRENBY, T.H. (Ed.). **Progress in sweeteners**. London: Elsevier Applied Science, 1989, p.169-214.

## Capítulo 3

# **ANÁLISE SENSORIAL DA PERDA DA DOÇURA EM REFRIGERANTES DIETÉTICOS ADOÇADOS COM ASPARTAME**

## RESUMO

A perda de doçura de refrigerantes dietéticos adoçados com aspartame, devido à degradação deste edulcorante em condições desfavoráveis de umidade, pH e temperatura, foi determinada através de testes sensoriais.

As amostras analisadas neste trabalho foram coletadas imediatamente após sua fabricação, para assegurar a quantidade inicial de aspartame. Foram utilizadas quatro marcas de refrigerantes e três sabores, sendo duas colas, um guaraná e um limão e dois tipos de embalagem, lata e PET. Os refrigerantes foram armazenados em três temperaturas (0°C, 24,5°C e 38°C) e analisados em dois momentos meio e final da validade. Os refrigerantes armazenados a 0°C foram considerados controle devido a baixa decomposição do aspartame nesta temperatura.

Foram selecionados 13 provadores através do teste seqüencial. Estes provadores foram utilizados em todos os testes dos refrigerantes, como o teste triangular no meio e final da validade e o teste diferença-do-controle no final da validade dos refrigerantes.

Na metade da validade as amostras cola 2 (lata e PET), guaraná (PET) e limão (PET), não apresentaram diferença significativa a  $p \leq 0,05$  em relação ao controle e no final da validade todas as amostras apresentaram diferença significativa a  $p \leq 0,05$  com relação ao teste triangular.

No teste diferença-do-controle realizado no final da validade dos refrigerantes o objetivo foi estimar o grau da diferença a  $p \leq 0,05$ . Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de média de Dunnett.

As fontes de variações e interações utilizadas na ANOVA foram: REFRIGERANTES, TEMPERATURA, EMBALAGENS, REPETIÇÕES, REFR X TEMP, REFR X EMBAL, TEMP X EMBAL, REFR X TEMP X EMBAL. Somente a variável TEMPERATURA e a interação REFR X TEMP apresentou diferença significativa a  $p \leq 0,05$ .

Com exceção do refrigerante cola 2 na temperatura 24,5°C, todas as amostras apresentaram diferença significativa a  $p \leq 0,05$  do controle. Os refrigerantes armazenados na temperatura de 38°C diferiram em maior grau do que os armazenados na temperatura de 24,5°C.

## SUMMARY

The loss of sweetness in diet soft drinks containing aspartame, due to its degradation under certain conditions, was determined in a sensory test.

The samples analyzed in this study were collected immediately after production, to assure the initial amount of aspartame. Four different soft drink brands and three flavors were used: two colas, one guaraná and one lemon, and two types of container; can and PET. The soft drinks were stored at three different temperatures (0°C, 24.5°C and 38°C) and analyzed at two different moments, middle and end of the validity. The soft drinks stored at 0°C were considered as the control, due to low decomposition of aspartame at this temperature.

The thirteen panelists were selected using the sequential test. These panelists were used in all the tests of the soft drinks, including the triangle test in the middle and end of the validity and the difference from control test at the end of the soft drink validity.

In the middle of the validity, the samples of cola 2 (can and PET), guaraná (PET) and lemon (PET), showed no significant differences at  $p \leq 0.05$  in relation to the control. At the end of the validity all the samples showed significant differences at  $p \leq 0.05$ .

In the difference from control test, the aim was to verify if there were any significant differences at  $p \leq 0.05$  between the control sample (0°C) and the other samples and to estimate the degree of difference. The results were submitted to an analysis of variance (ANOVA) and the Dunnett test.

The sources of variation and interaction used in the ANOVA were: SOFT DRINKS, TEMPERATURE, CONTAINER, REPETITIONS, SOFTD X TEMP, SOFTD X CONT., TEMP X CONT., SOFTD X TEMP X CONT. Only the TEMPERATURE variable and the interaction SOFTD X TEMP showed significant differences at  $p \leq 0.05$ .

Except for the soft drink cola 2 at the temperature of 24.5°C, all the samples showed significant differences at  $p \leq 0.05$  of the control. The soft drinks stored at the temperature of 38°C differed to a greater degree than those stored at a temperature of 24.5°C.

### 3.1 - INTRODUÇÃO

O aspartame é um dos edulcorante mais utilizado no momento. Descoberto em 1965, é resultado da combinação de dois aminoácidos – L-fenilalanina e L-aspartico.. Apresenta algumas vantagens em relação aos demais edulcorantes, tem sabor idêntico ao do açúcar, é totalmente metabolizado pelo organismo, não contém sódio e por isso pode ser consumido por pessoas hipertensas e quando usados em misturas com outros edulcorantes diminuí o sabor amargo. Mas, o aspartame pode apresentar algumas desvantagens em relação aos demais edulcorantes, tem pouca estabilidade em solução aquosa e não resiste a altas temperaturas.

Em 1990, o mercado de produtos dietéticos movimentava US\$300milhões anuais, sendo este montante dividido da seguinte forma entre os diferentes produtos: 22% para adoçantes de mesa, 74% para refrigerantes, bebidas e refrescos e 2% para outros produtos – compotas, sorvetes, chocolates, etc (Almeida-Muradian & Penteado, 1990).

Os edulcorantes ou adoçantes podem pertencer as diversas classes químicas. Devido a esta diversidade estrutural, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de conhecer a relação existente entre suas propriedades físico-químicas e o sabor doce apresentado por essas substâncias.

O aspartame pode apresentar efeito sinérgico com outros adoçantes, inclusive com os convencionais como a sacarose, frutose e glicose e a sua utilização pode diminuir o emprego destes últimos. O aspartame apresenta efeito potenciador de alguns sabores, particularmente nas frutas ácidas, como goiaba, limão, morango e laranja, mas pode também potencializar sabores amargos (Rodríguez-Palacios *et al*, 1986).

O aspartame apresenta uma doçura de 120-220 vezes em relação á sacarose e para refrigerantes pode-se considerar o valor de 180. É geralmente mais potente a baixas concentrações e em produtos à temperatura ambiente do que em produtos gelados ou quentes (Almeida- Muradian & Penteado, 1990).

A percepção da doçura de um adoçante é influenciada por uma série de fatores como: tipo e concentração do adoçante; meio de dispersão (solução aquosa, lipídica ou outros ingredientes alimentícios); efeitos sinérgicos; viscosidade; temperatura; pH; aroma; textura; aparência; diferenças pessoais inatas e individuais; grau de hidrólise do açúcar, sua configuração e outras propriedades (Wells, 1989; Wiet & Beyts, 1992).



A doçura pode ser avaliada através das sensações humanas utilizando-se técnicas de análises sensoriais. Os métodos empregados são classificados de diferentes formas, por diferentes autores, baseando-se nos objetivos da avaliação (O' Mahony, 1990).

Segundo Lawless e Claasen (1993) a escolha de um método de análise sensorial está baseado na resposta em três questionamentos: existência de diferença perceptível entre o produto em estudo e algum produto convencional similar, a aceitação do produto pelos consumidores, especificação dos pontos de diferença e o seu grau de intensidade. As respostas a estes três questionamentos permitem classificar os métodos sensoriais em testes discriminativos (ou de diferença), de aceitação e análise descritivas, respectivamente.

Os testes de diferença são de fácil interpretação, necessitam um painel treinado e selecionado relativamente pequeno, e são relativamente baratos (Jackson *et al.*, 1987). A ABNT conceitua-se como sendo métodos que estabelecem diferenciação qualitativa e / ou quantitativa entre amostras.

O teste triangular é o método discriminativo mais utilizado na indústria de alimentos, através do qual o julgador deve determinar qual amostra codificada, entre três (duas iguais e uma diferente), é diferente (Jackson *et al.*, 1987; Meilgaard *et al.*, 1987; O' Mahony, 1990). A ABNT recomenda que o teste triangular seja utilizado para detectar pequenas diferenças entre amostras, e selecionar e treinar julgadores. As vantagens atribuídas ao teste são: ter menor probabilidade de acertar ao acaso, e diferenciar as amostras de maneira global (Cândido & Campos, 1996).

O teste de diferença-do-controle ou comparação múltipla é um método discriminativo que verifica se existe diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre várias amostras e uma amostra padrão ou controle e estima o grau dessa diferença (Meilgaard *et al.*, 1987). Pelo método de comparação múltipla, como o próprio nome indica, não há limites sobre o número mínimo de amostras que podem ser avaliadas por grupo, nem sobre o tipo de informação que pode ser obtida. Os resultados dos testes de comparação múltipla podem indicar não somente se há uma diferença, mas também medida da magnitude da diferença, assim como se é um aperfeiçoamento ou uma deterioração (Chaves, 1980).

Uma avaliação sensorial foi realizada com duas marcas de refrigerantes sabor cola fabricados no Canadá (marca A e marca B). Nesta avaliação foi analisado a perda de doçura dos refrigerantes adoçados com aspartame e armazenados a 27°C. Utilizou-se uma escala de 8 pontos sendo 0 = “nenhuma doçura” e 8 = “muito doce”. Resultados mostraram que

depois de 6 semanas de armazenamento a marca A passou da nota 7.0 (tempo zero) para 1.0 e a marca B da nota 4.0 para 1.0. Esta perda provavelmente será detectada pelo consumidor após a compra, se o produto for armazenado por um período prolongado e em temperaturas elevadas (Bakal, 1986).

Ripper *et al.*, 1986 relatou um estudo de análise sensorial de refrigerantes dietético que ilustra a perda de doçura como um fator limitante na aceitabilidade desses refrigerantes. Neste estudo, aspartame foi arbitrariamente reduzido para simular os efeitos de armazenamento. Os refrigerantes (sabor cola) adoçados com aspartame tiveram as concentrações de 85% (doçura equivalente ao refrigerante controle adoçado com açúcar), 70%, 55% e 40% , utilizou-se também como controle um refrigerante comercial, também sabor cola, adoçado com sacarina. Os resultados mostraram que as concentrações 85 e 70% tiveram notas de aceitabilidade semelhantes com o do refrigerante adoçado com açúcar (nota = 6, em uma escala de 1 a 9, sendo que 1= “não gosto” 5 = “neutro” e 9 = “gosto”) e a concentração 55% teve uma aceitabilidade semelhante ao do refrigerante comercial adoçado com sacarina (nota = 5) e inferior ao dos demais refrigerantes (açúcar, 85 e 70%).

Homler, (1984) descreveu uma análise sensorial de refrigerantes tipo cola adoçados de maneiras diferentes, com 100% de aspartame, uma mistura de aspartame e sacarina, exclusivamente de sacarina e exclusivamente de açúcar que foram armazenados por 40 semanas em várias temperaturas. Colas adoçadas com aspartame foram armazenadas a 5°C e 20°C, colas adoçadas com a mistura aspartame e sacarina foram armazenadas a 20°C e as adoçadas exclusivamente com açúcar e sacarina foram estocadas a temperatura ambiente. Utilizou-se uma escala não estruturada de 0 a 100 pontos (0 = “não gosto” e 100 = “gosto”). Depois de 40 semanas de armazenamento a cola adoçada com aspartame a 20°C foi o único refrigerante que apresentou alteração significativa na média.

O objetivo deste trabalho foi determinar a perda de doçura em refrigerantes dietéticos adoçados com aspartame através da análise sensorial utilizando os testes de diferença (triangular e diferença-do-controle) durante o prazo de validade dos mesmos , armazenados em várias temperaturas e embalagens.

## 3.2 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 - Materiais

As amostras de refrigerantes dietéticos analisadas neste trabalho foram coletadas diretamente nas respectivas fábricas, imediatamente após sua fabricação de modo a garantir o tempo "zero" de adição do aspartame. Foram analisadas quatro marcas de refrigerantes em três diferentes sabores, sendo duas colas, um guaraná e um limão e em dois tipos de embalagem, lata e PET.

As amostras foram armazenadas nas temperaturas de refrigeração (0°C), ambiente (24,5°C) e em estufa (38°C). A amostra armazenada a 0°C foi considerada controle devido à pequena decomposição do aspartame a baixas temperaturas. O armazenamento dos refrigerantes nas temperaturas 24,5°C e 38°C tiveram a finalidade de simular as condições utilizadas nos diversos tipos de transportes e armazenamento em todo o Brasil.

Os refrigerantes foram analisados no meio e final da validade estabelecidas pelos fabricantes de acordo com a Tabela 3.1.

**Tabela 3.1:** Informações obtidas dos rótulos sobre edulcorantes adicionados as amostras de refrigerante em mg/100mL.

Refrigerantes	Acesulfame	Aspartame	Ciclamato	Sacarina	Validade (meses)
Cola 1	8,99	34,96	Ausente	Ausente	4
Limão	8,95	34,92	Ausente	Ausente	4
Cola 2	Ausente	12,00	31,70	5,80	3
Guaraná	17,00	17,00	17,00	Ausente	6

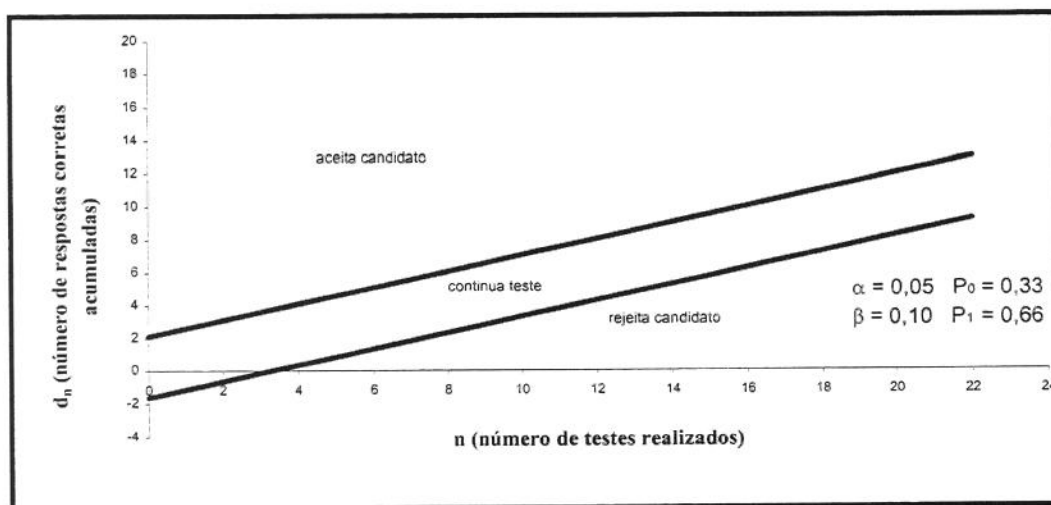
### 3.2.2 - Métodos

#### Seleção de Provadores

Para a seleção de provadores foram inicialmente recrutados 30 provadores, sendo 10 do sexo masculino e 20 do sexo feminino. A faixa etária dos membros variou entre 20 e 40 anos.

Os provadores foram selecionados através do teste seqüencial, que utilizou uma série de testes triangular, que além de selecionar os provadores, serviram para familiarizá-los com os procedimentos do teste. Nesta etapa, os provadores foram solicitados a discriminar, através do teste triangular, um refrigerante dietético tipo cola do mesmo refrigerante adicionado com 5,0 mg/L de aspartame.

A Figura 3.1 mostra as regiões de aceitação e rejeição de provadores, bem como especificações dos valores de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $P_0$  e  $P_1$  associados à análise seqüencial, segundo Meilgaard *et al.*(1987).



**Figura 3.1:** Gráfico do teste seqüencial utilizado para selecionar provadores.

As equações utilizadas para estabelecer as áreas de aceitação e rejeição de provadores do gráfico 3.1 foram as seguintes:

$$L_0: d_0 = \frac{\log \beta - \log (1-\alpha) - n \cdot \log (1-p_1) + n \cdot \log (1-p_0)}{\log p_1 - \log p_0 - \log (1-p_1) + \log (1-p_0)}$$

$$L_1: d_1 = \frac{\log (1-\beta) - \log \alpha - n \cdot \log (1-p_1) + n \cdot \log (1-p_0)}{\log p_1 - \log p_0 - \log (1-p_1) + \log (1-p_0)}$$

$p_0$  = Proporção esperada de decisões corretas em amostras idênticas.

$p_1$  = Proporção esperada de decisões corretas quando a diferença entre as amostras é detectável (sem acertos ao acaso) na metade do número total de casos.

$\alpha$  = Erro do tipo I (Probabilidade de rejeitar um bom provador).

$\beta$  = Erro do tipo II (Probabilidade de aceitar um mal provador).

$L_0, L_1$  = Limites (superior e inferior, respectivamente) indicados pelas linhas paralelas no gráfico 1. Essas linhas mostram as zonas de aceitação, rejeição e indefinições associados a cada provador, cujos limites são determinados pelos valores de  $p_0$ ,  $p_1$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ .

$n$  = Total de provas efetuadas

$d$  = Número acumulado de respostas corretas para cada provador.

No teste seqüencial foram selecionados 13 provadores, sendo 5 do sexo masculino e 9 do sexo feminino com a faixa etária variando entre 24 a 40 anos.

### **Análise Sensorial**

Após coleta dos refrigerantes e armazenamento até metade do tempo de validade (2 meses para cola 1 e limão, 1 mês e meio para cola 2 e 3 meses para guaraná) os mesmos foram submetidos à primeira etapa de avaliação de estabilidade sensorial. A segunda etapa foi realizada no final do tempo de validade dos mesmos (4 meses para cola 1 e limão, 3 meses para cola 2 e 6 meses para o guaraná).

Para cada um dos refrigerantes avaliados (cola 1, cola 2, guaraná e limão), a estabilidade dos produtos embalados em lata e em PET nas duas condições de armazenamento (24°C e 38°C) foram testados com relação à amostra controle (0°C) através do teste Triangular.

Desta forma, a estabilidade do refrigerante cola 1, embalado em lata e armazenado a 24°C, foi testada realizando-se um teste triangular deste refrigerante comparando com o mesmo refrigerante embalado em lata armazenado a 0°C. Este procedimento foi seguido para as demais amostras. Assim, nesta primeira etapa de estudo, 16 testes Triangular foram realizados e na segunda etapa mais 16 testes conforme apresentado na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2:** Ilustração dos testes Triangular realizado para cada refrigerante (cola 1, cola 2, guaraná e limão) no meio e final da validade nas várias condições de embalagem e temperatura de armazenamento.

Série de Testes Triangular	Tempo de Armazenamento	Tipo de Embalagem	Comparações Entre Amostras
1	Meio da validade *	Lata	0°C X 24,5°C
2	Meio da validade *	Lata	0°C X 38,0°C
3	Meio da validade *	PET	0°C X 24,5°C
4	Meio da validade *	PET	0°C X 38,0°C
5	Final da validade **	Lata	0°C X 24,5°C
6	Final da validade **	Lata	0°C X 38,0°C
7	Final da validade **	PET	0°C X 24,5°C
8	Final da validade **	PET	0°C X 38,0°C

\*Cola 1 e limão→ 2 meses; Cola 2→ 1 mês e meio; Guaraná→ 3 meses.

No teste Triangular cada provador recebeu três amostras codificadas e foi informado que duas amostras são iguais e uma é diferente, em seguida, foi solicitado a provar as amostras da esquerda para a direita e identificar a amostra diferente. Neste teste o provador utilizou ficha apropriada (Figura 3.2).

Os resultados foram avaliados através do teste do  $\chi^2$  sendo que diferenças significativas a  $p \leq 0.05$  entre cada amostra e controle indicaram alteração sensorial de perda de doçura da amostra avaliada.

Um teste de Diferença-do-Controle foi realizado no final do prazo de validade de cada refrigerante (4 meses para cola 1 e limão, 3 meses para cola 2 e 6 meses para guaraná) com o objetivo de estimar o grau de diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre a amostra controle e as demais amostras. Desta forma para cada condição (sabor/embalagem) cada provador recebeu uma

amostra controle e três amostras codificadas (controle a 0°C, 24,5°C e 38°C). Os provadores foram solicitados a compararem as amostras codificadas com o controle e avaliar o grau de diferença usando a ficha apresentada na Figura 3.3. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de média de Dunnett.

Os resultados obtidos através dos testes de Diferença-do-Controle foram analisados por uma ANOVA com as seguintes fontes de variações e interações: refrigerantes (REFR), temperaturas (TEMP), embalagens (EMBAL), repetições, REFR X TEMP, REFR X EMBAL, TEMP X EMBAL, REFR X TEMP X EMBAL.

Para se verificar quais amostras diferiram do padrão, utilizou-se o teste de média de Dunnett a  $p \leq 0,05$ .

As condições dos testes foram cuidadosamente controladas para que as amostras fossem homogêneas em todos os aspectos. Os testes foram realizados em cabines individuais isoladas de ruídos e providas de luz colorida para mascarar diferenças visuais entre as amostras. A ordem de apresentação das amostras foram balanceadas. Características de aparência das amostras foram mascaradas em todos os testes servindo as amostras em recipientes opacos e com tampa. Foram servidas na mesma temperatura (10°C) e no mesmo volume (25mL). Para evitar a fadiga sensorial em cada sessão de degustação foram realizados no máximo 2 testes triangular..

Nome: _____ Idade: _____
Data: ____/____/____
<p>Por favor, prove as amostras codificadas de refrigerante light da esquerda para a direita . Duas amostras são iguais e uma é diferente. Identifique com um círculo a amostra diferente.</p> <p>_____</p>
Obrigada!

**Figura 3.2:** Ficha aplicada no teste Triangular.



FICHA DE APLICAÇÃO DO TESTE DE DIFERENÇA -DO-CONTROLE PARA  
REFRIGERANTE LIGHT

Nome: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Você está recebendo uma amostra padrão (P) e 3 amostras codificadas. Prove a amostra padrão e em seguida, prove cada uma das amostras codificadas e avalie, na escala abaixo, o quanto cada amostra codificada difere, em termos globais, da amostra padrão.

0= nenhuma diferença (igual ao padrão)

1

2= ligeiramente diferente do padrão

3

4= moderadamente diferente do padrão

5

6= muito diferente do padrão

7

8= extremamente diferente do padrão

Amostra

Grau de Diferença

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Comentários: \_\_\_\_\_

**Figura 3.3:** Ficha aplicada no teste Diferença-do-Controle

### 3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste Triangular dos refrigerantes nas embalagens lata e PET, nas temperaturas 24,5°C e 38°C, no meio e final da validade estão apresentados nas Tabelas 3.3 e 3.4.

**Tabela 3.3:** Diferenças sensíveis encontradas em refrigerantes dietéticos armazenados em diferentes temperaturas através do teste Triangular.

Tipos de Refrigerantes	Prazos de Validade	Tipos de Embalagens	Temperatura de Armazenamento (°C)
Cola 1	Meio (2meses)	Lata	24,5*
			38,0***
		PET	24,5**
			38,0**
Cola 2	Meio (1 mês e meio)	Lata	24,5n.s.
			38,0**
		PET	24,5n.s.
			38,0**
Guaraná	Meio (3 meses)	Lata	24,5*
			38,0***
		PET	24,5n.s.
			38,0**
Limão	Meio (2 meses)	Lata	24,5**
			38,0**
		PET	24,5n.s.
			38,0**

\* Difere do padrão a  $p \leq 0,05$

\*\* Difere do padrão a  $p \leq 0,01$

\*\*\* Difere do padrão a  $p \leq 0,001$

n.s. Não difere do padrão a  $p \leq 0,05$

**Tabela 3.4:** Diferenças sensíveis encontradas em refrigerantes dietéticos armazenados em diferentes temperaturas através do teste Triangular.

<b>Tipos de Refrigerantes</b>	<b>Prazos de Validade</b>	<b>Tipos de Embalagens</b>	<b>Temperatura de Armazenamento (°C)</b>
Cola 1	Final (4 meses)	Lata	24,5* 38,0***
		PET	24,5*** 38,0***
Cola 2	Final (3 meses)	Lata	24,5* 38,0***
		PET	24,5* 38,0***
Guaraná	Final (6 meses)	Lata	24,5** 38,0***
		PET	24,5** 38,0***
Limão	Final (4 meses)	Lata	24,5* 38,0**
		PET	24,5** 38,0**

\* Difere do padrão a  $p \leq 0,05$

\*\* Difere do padrão a  $p \leq 0,01$

\*\*\* Difere do padrão a  $p \leq 0,001$

n.s. Não difere do padrão a  $p \leq 0,05$ .

As amostras que não apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) foram cola 2 (lata e PET) após 1 mês e meio de armazenamento, guaraná (PET) após 3 meses de armazenamento e limão (PET) após 2 meses de armazenamento, armazenadas a 24,5°C conforme Tabela 3.3.

No teste Diferença-do-Controle os resultados da ANOVA mostraram que o efeito “refrigerante” foi significativo ( $p \leq 0,001$ ) indicando que existe diferença entre pelo menos um refrigerante e o padrão. A temperatura também revelou ser um efeito significativo ( $p \leq 0,001$ ) indicando que ela influenciou sobre a decomposição do aspartame e conseqüente

perda de doçura do refrigerante. Por outro lado, a embalagem não produziu efeito significativo ( $p \leq 0.05$ ) sobre as características sensoriais desses refrigerantes.

A interação REFR X TEMP foi significativo ( $p \leq 0.001$ ) indicando que a temperatura influenciou de formas diferentes em cada um dos refrigerantes, ou seja, a temperatura atuou de maneira diferente sobre a decomposição do aspartame e conseqüente perda de doçura de cada refrigerante analisado. Os efeitos das interações REFR X EMBAL, TEMP X EMBAL e REFR X EMBALX TEMP não foram significativos ( $p \leq 0.05$ ).

A Tabela 3.5 mostra os resultados do teste de média de Dunnett dos refrigerantes com relação à temperatura de armazenamento e tipo de embalagem.,

**Tabela 3.5:** Médias<sup>1</sup> do teste diferença-do-controle com relação a variável temperatura dos refrigerantes cola 1, cola 2, guaraná e limão, nas embalagens lata e PET.

	Cola 1	Cola 1	Cola 2	Cola 2	Guaraná	Guaraná	Limão	Limão
Temperatura	Lata	PET	Lata	PET	Lata	PET	Lata	PET
0°C	1,15 <sup>a</sup>	0,69 <sup>a</sup>	1,38 <sup>a</sup>	1,31 <sup>a</sup>	0,46 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	0,92 <sup>a</sup>	0,69 <sup>a</sup>
24,5°C	4,23 <sup>b</sup>	3,38 <sup>b</sup>	2,31 <sup>a</sup>	3,08 <sup>b</sup>	3,00 <sup>b</sup>	3,31 <sup>b</sup>	3,85 <sup>b</sup>	3,61 <sup>b</sup>
38,0°C	7,85 <sup>c</sup>	7,08 <sup>c</sup>	5,15 <sup>b</sup>	5,46 <sup>c</sup>	7,54 <sup>c</sup>	7,23 <sup>c</sup>	7,69 <sup>c</sup>	7,69 <sup>c</sup>

Na mesma coluna médias com letras em comum não diferem significativamente entre si a  $p \leq 0.05$ .

<sup>1</sup> 0 = nenhuma diferença do controle; 4 = moderadamente diferente do controle; 8 = extremamente diferente do controle.

Através dos resultados apresentados na Tabela 3.5, pode-se observar que todos os refrigerantes nas embalagens lata e PET, tiveram diferença significativa do seu respectivo padrão a  $p \leq 0,05$ , com exceção do refrigerante sabor cola 2 na embalagem lata que não apresentou diferença significativa a  $p \leq 0,05$  na temperatura 24,5°C em relação ao controle (0°C).

Pode-se observar também, que os refrigerantes armazenados a 38,0°C diferiram em maior grau do que os armazenados a 24,5°C em relação ao controle (0°C).

Comparando estes resultados com os da literatura, pode-se verificar que a perda de doçura encontrada devido ao aumento de temperatura também foi detectada por outros autores.

Bakal (1986) numa avaliação sensorial de intensidade de doçura, realizada com duas marcas de refrigerantes sabor cola, fabricados no Canadá, constatou perda de doçura nos refrigerantes adoçados com aspartame e armazenados a 27°C, depois de 6 semanas de armazenamento.

Homler, (1984) também trabalhando com refrigerantes tipo cola adoçados de maneiras diferentes (com 100% de aspartame, uma mistura de aspartame e sacarina, exclusivamente de sacarina e exclusivamente de açúcar) armazenados por 40 semanas em várias temperaturas, verificou que no final do período de armazenamento as colas adoçadas somente com aspartame e armazenadas na maior temperatura (20°C) apresentaram um decréscimo na aceitabilidade.

Ripper *et al.*, 1986 relatou um estudo de aceitabilidade de refrigerantes dietéticos que ilustra a perda de doçura como um fator limitante na aceitação desses refrigerantes. Neste estudo, aspartame foi arbitrariamente reduzido para simular os efeitos de armazenamento. Com a diminuição da concentração do aspartame (55%) na composição do refrigerante, houve um decréscimo na aceitabilidade do mesmo.

Durante a realização dos testes (Triangular e Diferença-do-Controle) alguns provadores fizeram comentários nas fichas de testes (Figuras 3.2 e 3.3) e os resultados foram os seguintes: 90% dos provadores que opinaram relataram que a diferença perceptível era perda de doçura dos refrigerantes e 10% relataram que sentiram gosto residual, gosto amargo e perda de gás nos refrigerantes.

Constatou-se, através de testes cromatográficos, que as amostras controle dos refrigerantes sofreram uma pequena variação na quantidade de aspartame durante o prazo de validade dos mesmos (cola 1 → 8,8% ou 3,1mg/100mL, cola 2 → 4,3% ou 0,5mg/100mL, guaraná → 7,8% ou 1,3mg/100mL, limão → 7,2% ou 2,5mg/100mL, em média). Mas analisando os testes sensoriais que não tiveram diferença significativas (teste Triangular) e os resultados dos testes cromatográficos pode-se considerar que tal diferença cromatográfica não gerou uma diferença na análise sensorial.

Através dos resultados obtidos neste trabalho pode-se constatar que com o aumento do tempo e temperatura de armazenamento, refrigerantes adoçados com aspartame tem uma diminuição no teor de doçura. Segundo Stempfl & Lotz, (1996), a estabilidade do edulcorante é um requisito muito importante na qualidade do refrigerante dietético, pois a

diminuição do sabor doce pode influenciar negativamente na aceitação do produto pelos consumidores.

### 3.4 – CONCLUSÃO

No teste Triangular na metade da validade e temperatura a 24,5°C todos os refrigerantes apresentaram diferença significativa a  $p \leq 0,05$  com relação a amostra controle (0°), com exceção dos refrigerantes cola 2, guaraná e limão na embalagem PET. Na temperatura 38°C todas as amostras apresentaram diferença significativa a  $p \leq 0,05$  em relação ao controle.

No final da validade dos refrigerantes o teste triangular apresentou diferença significativa  $p \leq 0,05$  em todas as amostras de refrigerantes quando comparados a amostra controle.

No teste de comparação múltipla realizado no final da validade dos refrigerantes concluiu-se que houve diferença sensorial entre as temperaturas 24,5°C e 38°C e em relação ao controle (0°C). Os refrigerantes armazenados na temperatura 24,5°C obtiveram, conforme classificação da ficha do teste (Figura 3.3) a avaliação de moderadamente diferente do controle, enquanto as amostras armazenadas na temperatura de 38°C obtiveram a classificação de muito diferente da amostra controle.

As diferenças sensoriais detectadas foram, na sua maioria, relatadas como perda de doçura, mas relatou-se também a existência de outros sabores (residual, amargo e refrigerante sem gás), tais sabores podem realmente estar presentes devido a degradação de outros componentes dos refrigerantes além do desequilíbrio do sinergismo com outros edulcorantes.

### 3.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-MURADIAN, L. B., PENTEADO, M. D. V. C. Edulcorantes em alimentos: uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1/2, p. 1-11, jan/jun. 1990.
- BAKAL, A.I. Mixed sweetener functionality. In: O'BRIEN, N.; GELARDI, R. C. **Alternative Sweeteners**. New York: Marcel Dekker Inc. 1986, p.325 - 346.
- BUSSIÈRE, G. Edulcorantes de alto poder edulcorante. In: MULTON, J-L. **Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias**. Zaragoza: Acribia, 1988. P. 257-273.
- CÂNDIDO, L. M. B., CAMPOS, A. M. **Alimentos para fins especiais: dietéticos**. São Paulo: Varela. 423p, 1996.
- CHAVES, J. B. P.; Avaliação Sensorial de Alimentos (Métodos de Análise). Universidade de Viçosa. Centro de Ciência Exatas e Tecnológicas. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Viçosa - Minas Gerais, v. 37, 1980.
- FATIBELO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C.; GOUVEIA, S. T. G.; CALAFATTI, S. A.; GUARITÁ-SANTOS, A. J. M.; Adoçantes artificiais. **Química Nova**. Vol. 19, n. 3, p. 248 - 260, 1996.
- HOMLER, B. E. Properties and stability of aspartame. *Food Technology*, Chicago, v. 38, n. 7, p. 50 - 55, July, 1984.
- JACKSON, K. G.; HOWELLS, J.; ARMSTRONG, J. Sweeteners in special foods for diabetic, slimming and medical purposes. In: GRENBY, T. H. (Ed). **Developments in Sweeteners** - 3. London: Elsevier Applied Science, 1987, p. 213 - 262.
- LAWLESS, H. T.; CLAASSEN, M. R. Application of the central dogma in sensory evaluation. **Food Technology**, Chicago, v. 47, n. 6, p. 139 -223, June, 1993.
- MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B. T. **Sensory Evaluation techniques**. Boca Raton: CRC Press, 1987 p.45.
- O'MAHONY, M. Cognitive aspects of difference testing and descriptive analyses: criterion variation and concept formation. In: McBRIDE, R.L.; MacFIE, H. J.H. **Psychological basis of sensory evaluation**. London: Elsevier Applied Science, 1990
- RODRIGUEZ-PALACIOS, F. J., ITURBE-CHIÑAS, F. A., VALLE-VEJA, P. Edulcorantes. **Revista de Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, n. 4, p. 12-18, 1986.
- RIPPER, A.; HOMLER, B. E.; MILLER, G. A. ASPARTAME. In: O'BRIEN, N.; GELARDI, R. C. **Alternative Sweeteners**. New York: Marcel Dekker Inc. 1986, p.43 - 71.

- 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.
- WIET, S. G.; BEYTS, P. K. Sensory characteristics of sucralose and other high intensity sweeteners. *Journal of Food Science*, Chicago, v.57, n. 4, p. 1014 - 1019, July/Aug, 1992.



## CONCLUSÕES GERAIS

A quantidade de aspartame medido no tempo zero foi maior do que o declarado no rótulo em dois dos quatro refrigerantes analisados, mas menor que o limite permitido na legislação brasileira. Nenhum produto de decomposição foi encontrado no tempo zero da análise.

Nos quatro refrigerantes a decomposição do aspartame aumentou com a elevação da temperatura de estocagem e o aumento do prazo de validade.

A dicetopiperazina e aspartilfenilalanina foram encontradas em praticamente todas as condições estudadas dos quatro refrigerantes, enquanto que fenilalanina apareceu somente nas condições mais drásticas, a 38°C no meio e final da validade, com exceção do refrigerante cola 1 (lata e PET) onde a decomposição do aspartame foi maior. As concentrações de DKP e PHE também foram maiores, enquanto que as quantidades de aspartilfenilalanina diminuíram devido a provável decomposição deste produto a DKP e / ou ácido aspártico + fenilalanina.

A perda do aspartame e aumento dos produtos de decomposição foi geralmente maior na embalagem lata do que na PET, principalmente nas temperaturas 24,5°C e 38°C, provavelmente devido as características da lata que aceleram o processo de aumento de temperatura.

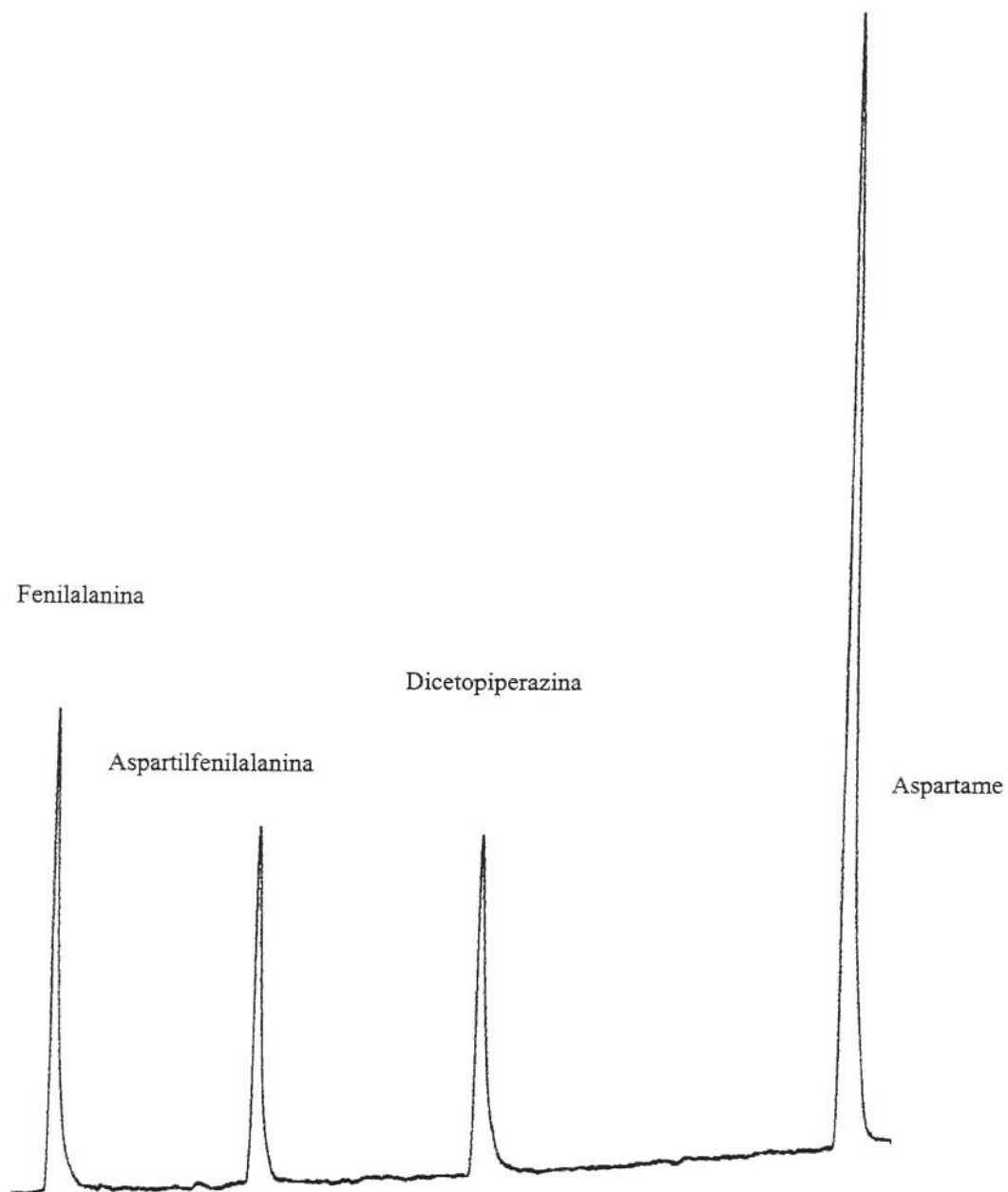
O refrigerante que teve menores porcentagens de perdas no final da validade foi a cola 2 (validade - 3 meses), enquanto que as maiores porcentagens de perdas variaram entre os outros três refrigerantes, dependendo da temperatura e tipo de embalagem. A maior porcentagem de perda ocorreu no guaraná em lata a 38°C com 93% de perda no final da validade (6 meses).

No teste triangular na metade da validade e temperatura a 24,5°C os refrigerantes cola 2, guaraná e limão na embalagem PET não apresentaram diferença significativa a  $p \leq 0.05$  com relação a amostra controle (0°C). Na temperatura 38°C todas as amostras apresentaram diferença significativa a  $p \leq 0.05$  em relação ao controle.

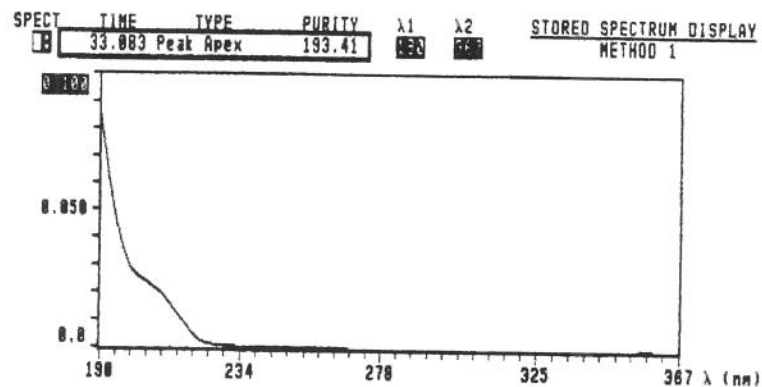
No final da validade dos refrigerantes o teste triangular apresentou diferença significativa em todas as amostras de refrigerantes com relação as temperaturas, independentes do tipo de embalagem ( lata e PET ).

No teste de diferença-do-controle realizado no final da validade dos refrigerantes concluiu-se que houve diferença sensorial entre as temperaturas 24,5°C e 38°C em relação ao controle (0°C). Os refrigerantes armazenados na temperatura 24,5°C obtiveram, conforme classificação da ficha do teste, a avaliação de moderadamente diferente do controle, enquanto as amostras armazenadas na temperatura de 38°C obtiveram a classificação de muito diferente da amostra controle.

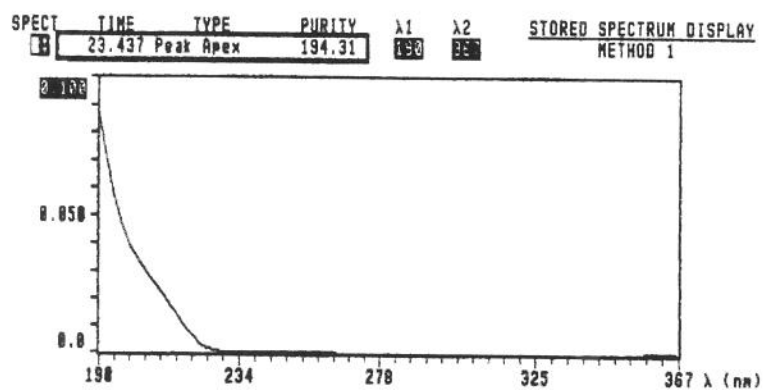
# ANEXOS



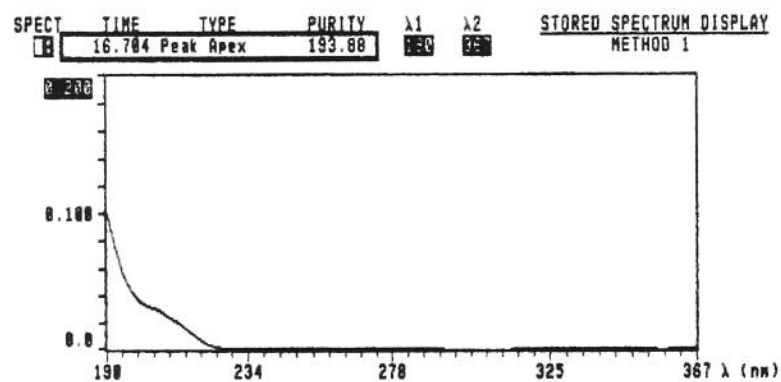
**Anexo 2.1:** Cromatograma dos padrões do aspartame, dicetopiperazina, aspartilfenilalanina e fenilalanina.



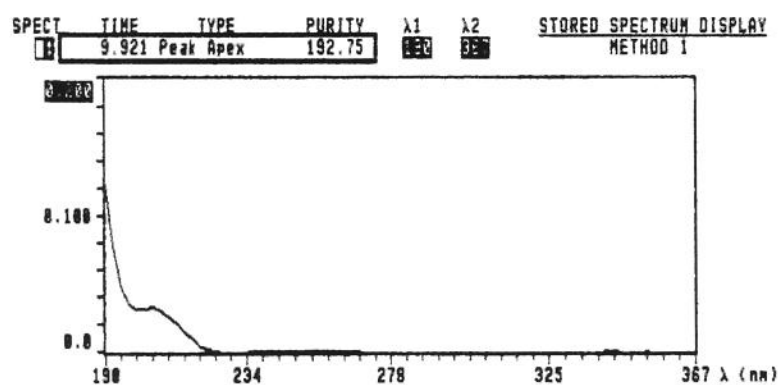
Anexo2.2: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão aspartame.



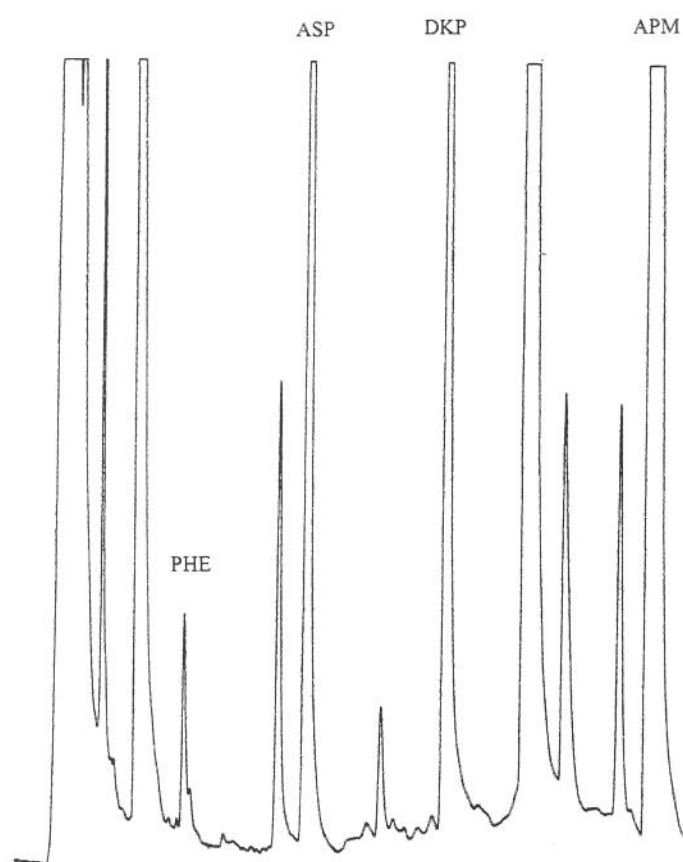
Anexo 2.3: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão dicetopiperazina.



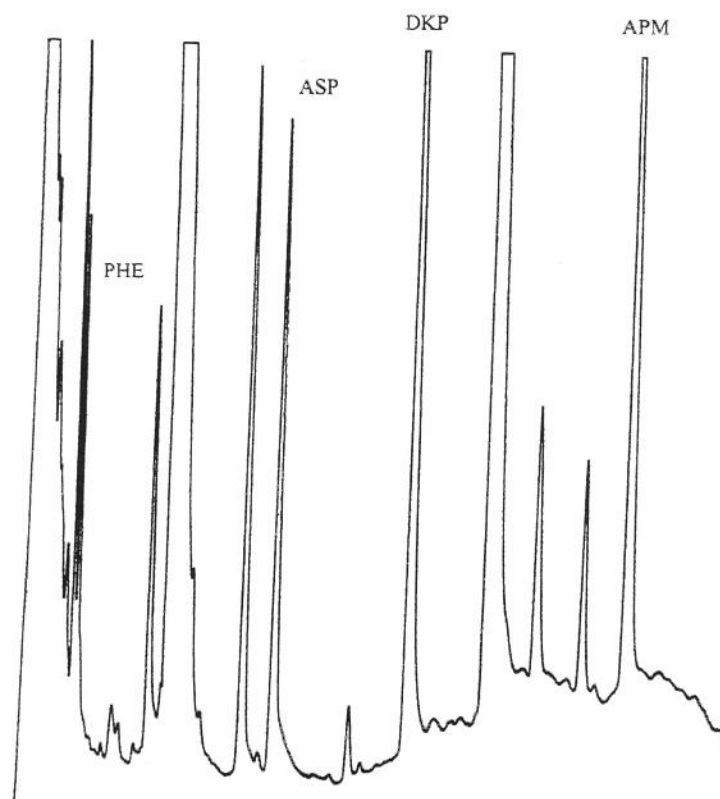
Anexo 2.4: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão aspartilfenilalanina.



Anexo 2.5: Espectro de absorção no ultravioleta do padrão fenilalanina.

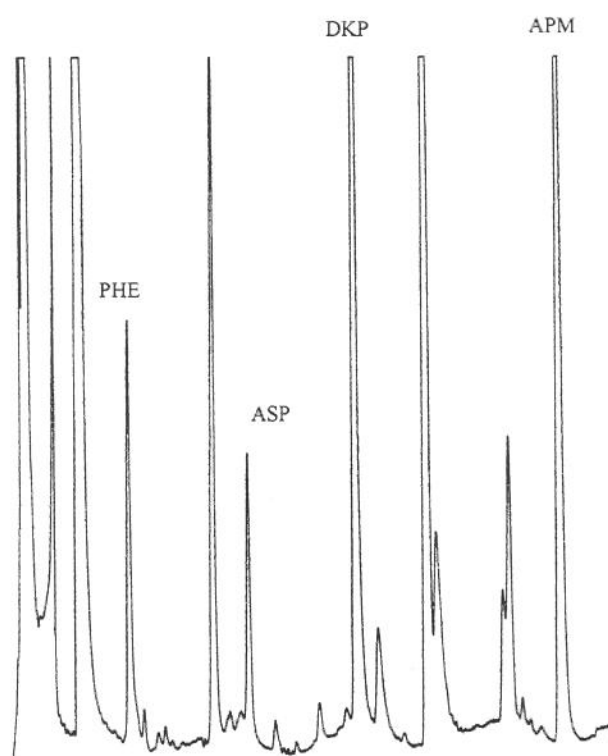


**Anexo 2.6:** Cromatograma do refrigerante sabor cola 1 a 24,5°C no final do prazo de validade (4 meses), na embalagem PET.

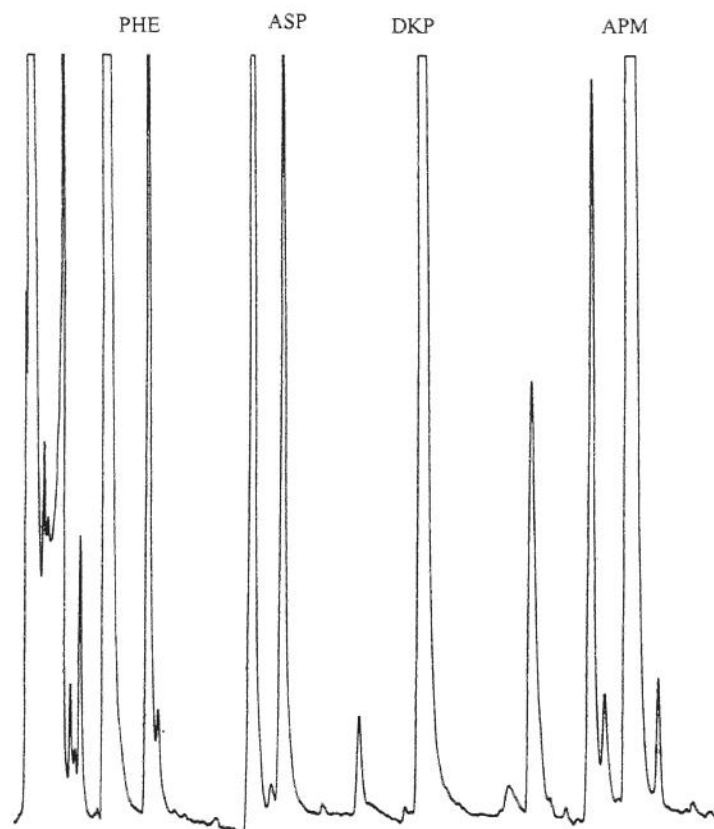


**Anexo 2.7:** Cromatograma do refrigerante sabor cola 2 a 38°C no final do prazo de validade (3 meses), na embalagem PET.

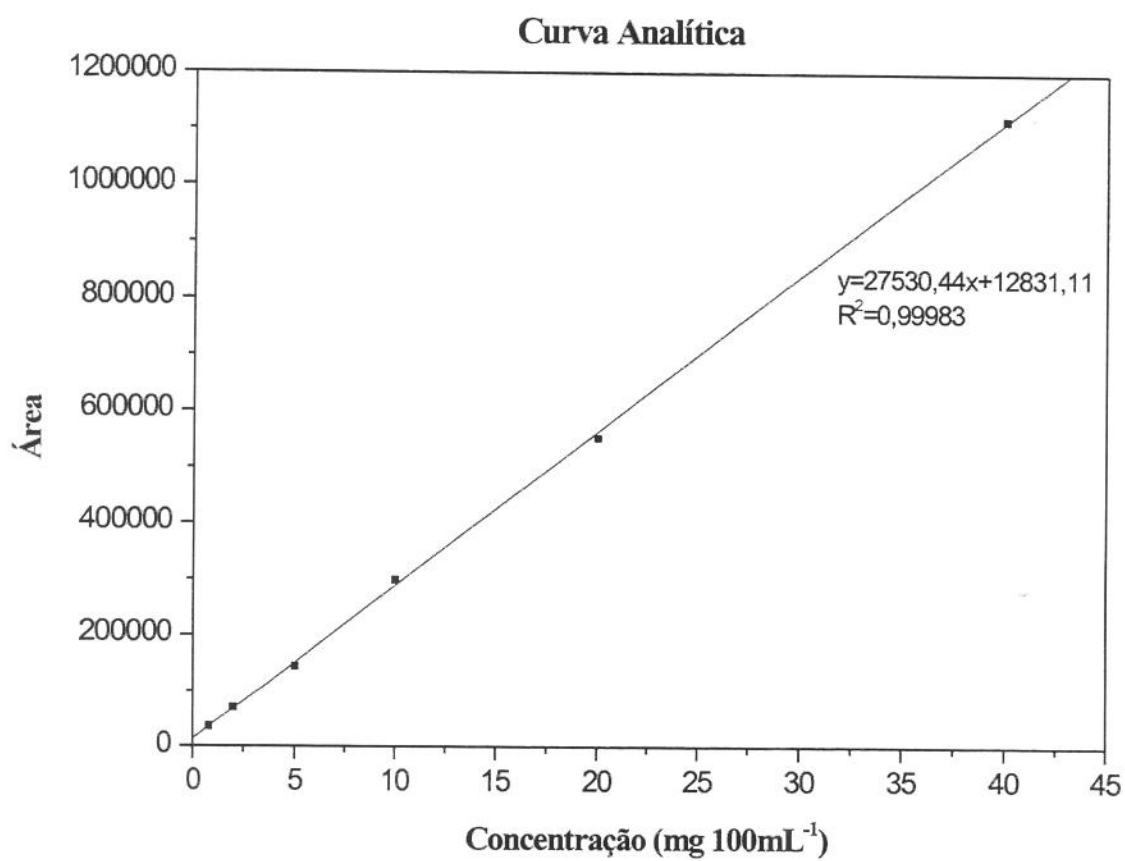




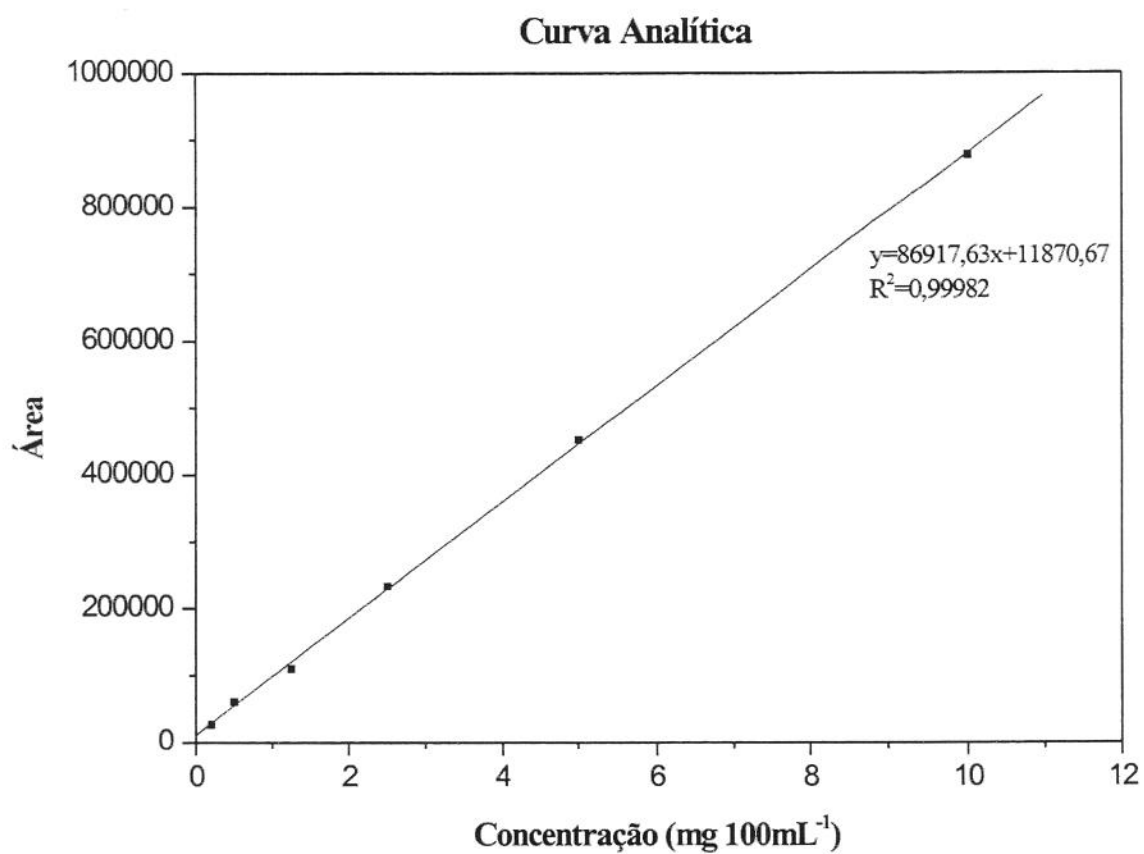
**Anexo 2.8:** Cromatograma do refrigerante sabor guaraná a 38°C no final do prazo de validade (6 meses), na embalagem PET.



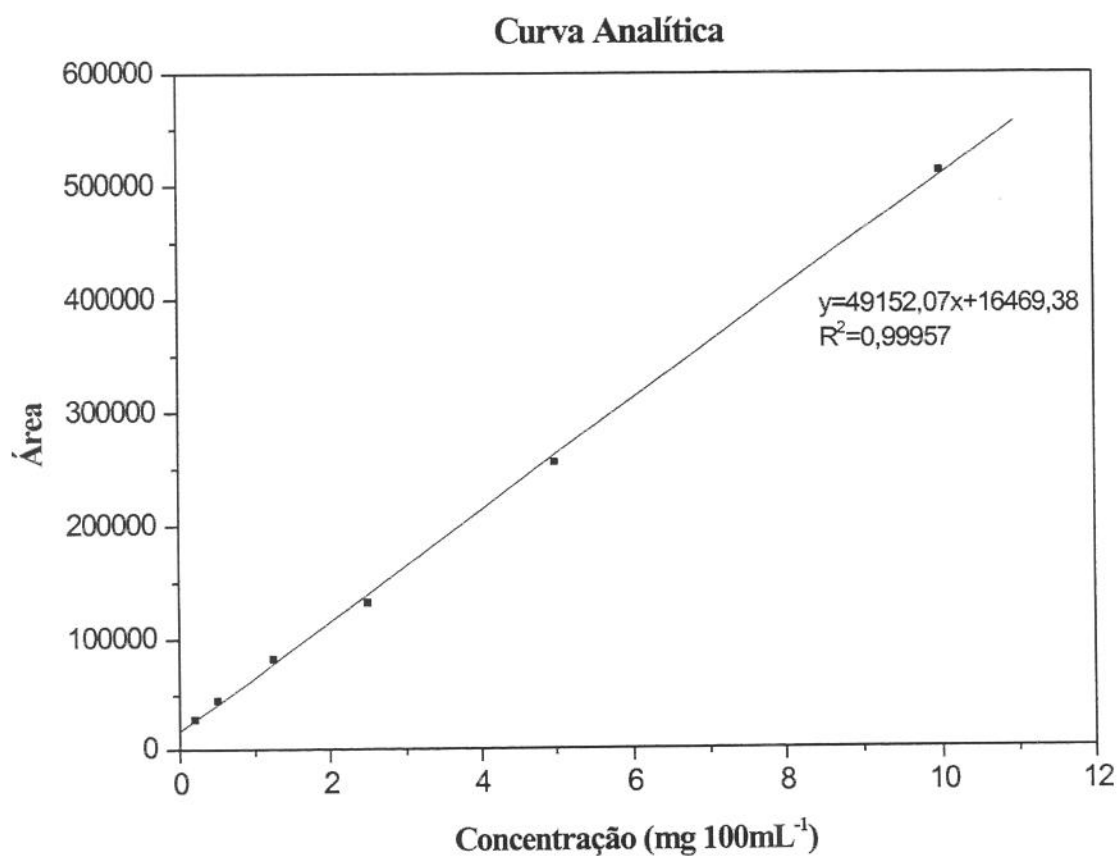
**Anexo 2.9:** Cromatograma do refrigerante sabor limão a 38°C no final do prazo de validade (4 meses), na embalagem PET.



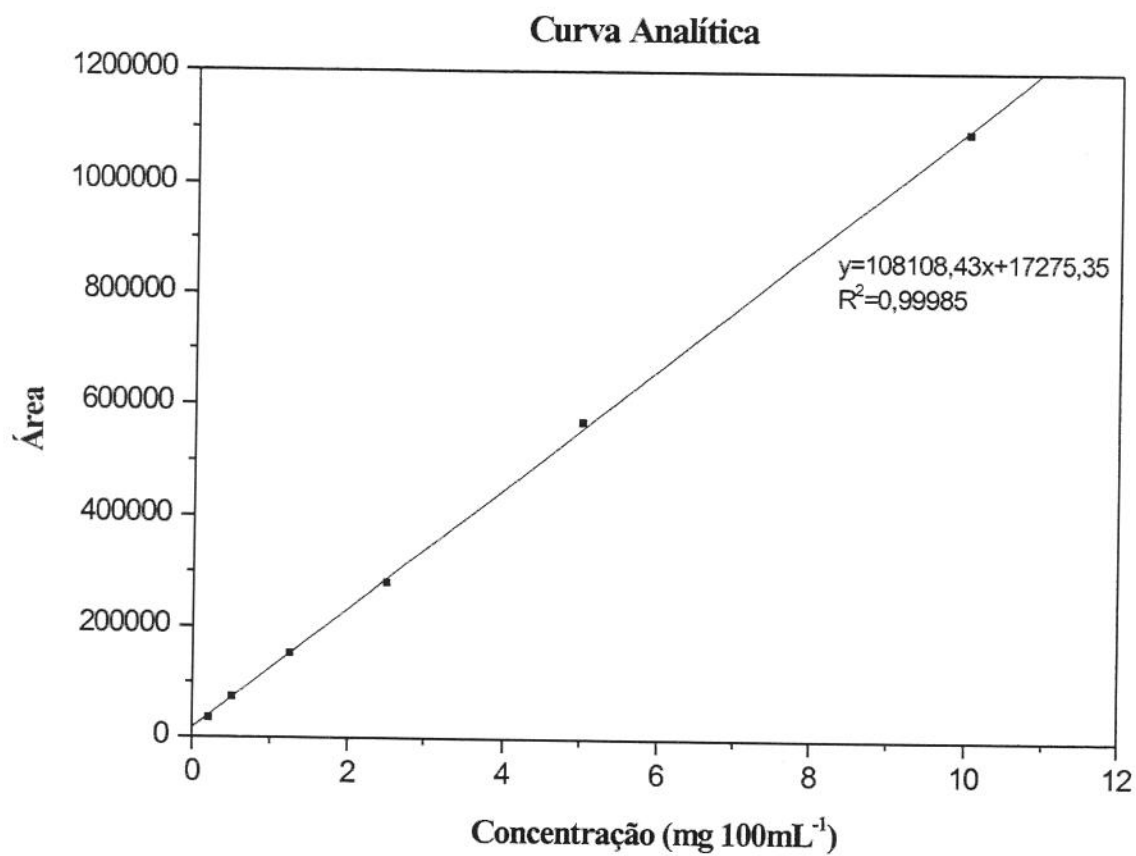
**Anexo 2.10:** Curva Analítica do padrão de aspartame.



**Anexo 2.11:** Curva Analítica do padrão de dicetopiperazina.



**Anexo 2.12:** Curva Analítica do padrão de aspartilfenilalanina.



**Anexo 2.13:** Curva Analítica do padrão de a fenilalanina.