

**DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ASPARTAME EM PRODUTOS DIETÉTICOS USANDO NINIDRINA COMO REAGENTE****Iolanda da Cruz Vieira**

Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo - Cx. P. 369 - 13560-970 - São Carlos - SP

**Orlando Fatibello Filho\***

Laboratório de Química Analítica, Departamento de Química - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - Universidade Federal de São Carlos - Cx. P. 676 - 13560-970 - São Carlos - SP

Recebido em 31/5/94; aceito em 29/7/94

A spectrophotometric method was developed for determination of aspartame (N-L- $\alpha$ -aspartyl-L-phenylalanine 1-methyl ester) in dietary products based on the reaction of this sweetener with ninhydrin. Effects of organic solvents, ninhydrin concentration ( $2.0 \times 10^{-3}$ -  $4.0 \times 10^{-2}$ M), KOH concentration (0.005-0.12M), temperature (25-55°C) and interference substances were evaluated. The best conditions found were 1:1 V/V methanol/isopropanol,  $2.0 \times 10^{-2}$  M ninhydrin, 0.03M KOH, temperature of 55°C, reaction time of 10 min. The analytical curve was linear within the  $2.0 \times 10^{-5}$  -  $2.0 \times 10^{-4}$  M range. The molar absorptivity was  $8.9 \times 10^3$  l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at 603 nm, and the detection limit (3s blank/m) was  $1.96 \times 10^{-6}$  M of aspartame. The method was successfully used for assay of aspartame in several dietary products, presenting a relative standard deviation of 3.5% and a recovery of aspartame from various dietary products of 94.6 to 103.0%.

**Keywords:** aspartame; ninhydrin; spectrophotometry; dietary products.

**INTRODUÇÃO**

Aspartame (C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) ou éster metílico da N-L- $\alpha$ -aspartil-L-fenilalanina foi sintetizado acidentalmente em 1965, a partir do metanol, ácido L-aspártico e L-fenilalanina por J. M. Schlatter<sup>1,2</sup>, quando tentava-se preparar um sedativo para úlceras. Este dipeptídeo de baixa caloria, é branco, cristalino e inodoro, com uma doçura de 180-200 vezes a da sacarose<sup>3</sup>. Introduzido nos EUA sob o nome de "NutraSweet" é atualmente o adoçante artificial de maior comercialização no mundo e no Brasil vem sendo empregado em diversos produtos dietéticos como adoçante de mesa, refrigerantes, iogurtes, refresco em pó, gelatinas, pudins, chás e sorvetes<sup>4</sup>.

O aspartame tem sido determinado em diversos produtos dietéticos por várias técnicas cromatográficas<sup>5-10</sup>. Dentre estes métodos, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)<sup>8-10</sup> é a técnica mais utilizada para as determinações deste edulcorante, devido à sua seletividade e sensibilidade. No entanto, esta é uma técnica de alto custo e trabalhosa para algumas amostras.

Renneberg *et alii*<sup>11</sup> desenvolveram um sensor amperométrico microbiológico para determinação deste adoçante usando células de *Bacillus subtilis* imobilizadas diretamente em uma membrana de um eletrodo de oxigênio. Este biossensor apresentou boa estabilidade e sensibilidade, todavia glicose, L-fenilalanina e ácido L-aspártico interferem fortemente, comprometendo assim a seletividade do método.

Fatibello *et alii*<sup>12</sup> construíram um eletrodo bienzimático sensível a aspartame, pela co-imobilização da *Carboxipeptidase A* e *L-aspartase* em um eletrodo de amônia. A resposta do eletrodo foi linear no intervalo de concentração de aspartame de  $4,25 \times 10^{-4}$  a  $8,10 \times 10^{-3}$  M com uma inclinação de -45 mV/década. O eletrodo apresentou boa seletividade e foi usado na determinação de aspartame em diversas amostras dietéticas, no entanto possui um tempo de vida de aproximadamente 25 dias (500 determinações por membrana enzimática) em virtude da baixa estabilidade da enzima *L-aspartase*.

Atmaca *et alii*<sup>13</sup> propuseram um procedimento fluorimétrico para a determinação de aspartame. O edulcorante foi excitado a 436 nm e sua fluorescência medida a 523 nm. Entretanto, o método se mostrou demorado (30min/determinação) e trabalhoso, exigindo aquecimento das amostras a 70°C, antes das determinações.

Há relatos na literatura alguns métodos espectrofotométricos na região do visível<sup>14-19</sup> para a determinação deste composto usando dietilditiocarbamato de sódio<sup>14,15</sup>, 4-dimetilaminobenzaldeído<sup>16</sup>, p-benzoquinona<sup>17</sup> e ninidrina<sup>18,19</sup>. Enquanto nos dois primeiros leucina e alguns corantes causam fortes interferências, aquele usando p-benzoquinona é afetado pela presença de diversos corantes presentes nas amostras. Aminoácidos com  $\alpha$ -aminogrupos interferem no método colorimétrico da ninidrina, mas este método é o mais sensível dos métodos colorimétricos e a grande maioria das amostras de interesse não contém estes aminoácidos, especialmente aquelas sólidas onde o aspartame possui boa estabilidade. Lau *et alii*<sup>18</sup> determinaram aspartame em diversos produtos dietéticos em carbonato de propileno num intervalo de concentração de 7,5-35,0 ppm. Após sua extração com esse solvente, o aspartame foi colocado para reagir com ninidrina durante 20 minutos a 100°C e a absorvância do composto formado (Ruhemann) foi medida a 585 nm. Nesse comprimento de onda, tanto a maioria dos corantes como os aminoácidos presentes nas amostras não interferiram no método, uma vez que a etapa de extração com carbonato de propileno aumentou significativamente a seletividade do método.

No presente trabalho, desenvolveu-se um método alternativo para determinação espectrofotométrica de aspartame em diversos produtos dietéticos comerciais. O efeito de diversos solventes orgânicos, concentração de ninidrina, concentração de KOH, temperatura, tempo de reação e substâncias concomitantes sobre a reação colorimétrica de aspartame com ninidrina foi investigado. No meio reacional de metanol/isopropanol 1:1 V/V e KOH 0,03M o método espectrofotométrico proposto mostrou-se rápido, prático e mais sensível que aquele proposto por Lau e colaboradores<sup>18</sup>.

## PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### Equipamentos

Todas as medidas espectrofotométricas do composto de **Ruhemann** foram feitas em um espectrofotômetro de feixe duplo Varian, modelo DMS 100 com cubeta de quartzo com espessura de 1,0 cm. Utilizou-se uma centrífuga Fanem, modelo 206-R. Nas medidas de pH, empregou-se um pH-metro digital Micronal, modelo B-374. No estudo do efeito da temperatura sobre a reação colorimétrica foi usada uma célula de vidro de 30,0 ml com camisa para a circulação da água de um banho termostático Tecnal, modelo DDS -100.

### Reagentes e Soluções

A solução estoque de aspartame  $3,4 \times 10^{-3}$  M foi preparada pela dissolução de 100 mg desse edulcorante (Sigma) em 100 ml da mistura de solventes metanol/isopropanol 1:1 V/V. As soluções de trabalho nas concentrações de  $2,0 \times 10^{-5}$  -  $2,0 \times 10^{-4}$  M foram obtidas por diluição a partir da solução estoque, com a mistura dos mesmos solventes.

A solução de ninidrina 0,10M foi preparada pela dissolução de 1,781g desse reagente (Merck), com metanol/isopropanol 1:1 em um balão volumétrico de 100 ml.

A solução de hidróxido de potássio 0,15M foi preparada pela dissolução de 0,421g de KOH (Mallinckrodt) em 50 ml da mistura de solventes metanol/isopropanol 1:1 V/V. No estudo do efeito da concentração de KOH sobre a reação colorimétrica esta solução foi adicionada ao sistema na concentração necessária, variando-se o volume.

Diversas soluções de edulcorantes (sacarina e ciclamato), acidulantes (ácido cítrico e ácido fumárico), carboidratos (sacarose, lactose e glicose), corantes (tartrazina, amarelo crepúsculo e bordeaux-S), sorbitol e manitol foram estudados como possíveis interferentes, nas concentrações de até cinco vezes daquela de aspartame ( $8,0 \times 10^{-5}$  M).

### Preparação das amostras e procedimento analítico

Duzentos miligramas das amostras sólidas de gelatina, refresco, pudim (Produtos Alimentícios Fleischmann & Royal Ltda, Jundiá-SP) e adoçante de mesa (Boehringer De Angeli Química e Farmacêutica Ltda, Itapeerica da Serra-SP), foram pesados e transferidos para um erlenmeyer com tampa de vidro esmerilhada contendo 10 ml de metanol/isopropanol 1:1 V/V e agitado com agitador magnético durante 2-3 minutos. Após centrifugação e filtração em cadinho de Gooch, o filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 25 ml e o cadinho foi lavado com 2-3 ml da mistura destes solventes e adicionado no mesmo balão volumétrico. Em seguida 5,0 ml de solução de ninidrina 0,10M e 5,0 ml de KOH 0,15M foram adicionados e seu volume completado para 25 ml com metanol/isopropanol 1:1 V/V. Após 10 minutos, o produto formado na reação entre a ninidrina e o aspartame (composto de **Ruhemann**) nesta mistura de solventes foi medido no comprimento de onda de 603 nm. No estudo do efeito da temperatura sobre a reação colorimétrica, o volume de 25,0 ml do balão volumétrico foi transferido para uma célula de vidro com agitação e após aquele tempo supramencionado, uma alíquota de 3,0 ml foi resfriada a temperatura ambiente e transferida para a cubeta do espectrofotômetro.

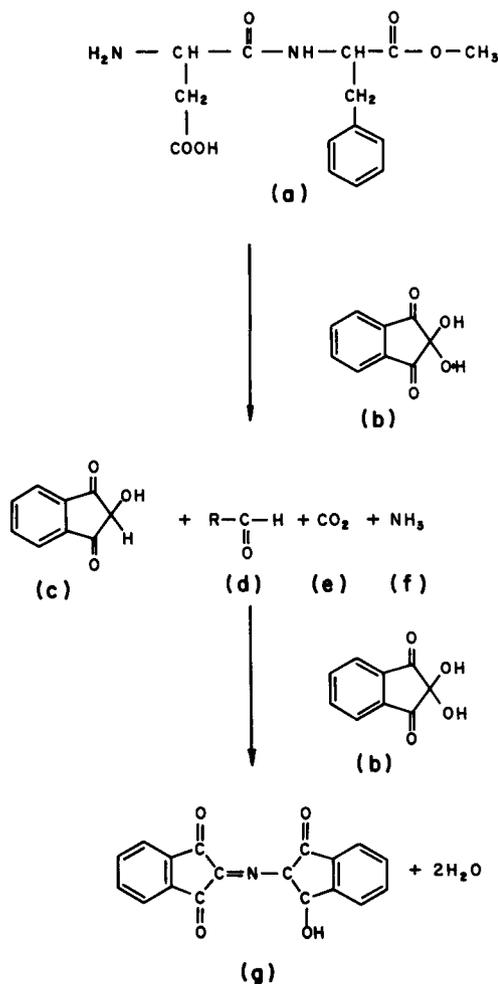
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Similarmente à reação da ninidrina (b) com aminoácidos<sup>20</sup>, em uma primeira etapa, este reagente fortemente oxidante ocasiona a oxidação descarboxilativa do aspartame (a) com formação de hidridantina (c), aldeído (d), dióxido de carbono (e) e

amônia (f) (Figura 1). A amônia (f) e a hidridantina (c) assim formados reagem com uma segunda molécula de ninidrina (b) produzindo um composto azul intenso (composto de **Ruhemann**). Como pode ser observado no esquema apresentado nesta figura, apenas o átomo de nitrogênio presente inicialmente na molécula do aspartame (a) está presente no composto formado (g). Este composto azul apresenta duas absorvâncias máximas nos comprimentos de onda de 400 e 603 nm. Apesar de apresentar maior sensibilidade em  $\lambda=400$  nm, o comprimento de onda igual a 603 nm foi usado em todo este trabalho, uma vez que a maioria dos corantes encontrados nos produtos dietéticos (amarelo crepúsculo, tartrazina, amaranço, eritrosina, vermelho 40 e ponceau 4R), absorvem significativamente na região de 410-520 nm e também pela ausência de absorção do aspartame ( $\lambda=252, 257$  e  $263$  nm), ninidrina ( $\lambda=363$ nm) e solventes usados. A Figura 2 mostra o espectro de absorção molecular do composto de **Ruhemann** obtido em metanol/isopropanol 1:1 V/V.

### Efeito do solvente sobre a reação colorimétrica

Inicialmente, estudou-se a reação do aspartame com a ninidrina em tampão fosfato-ácido cítrico e acetato nos valores de pH variando de 3,4 a 6,8. No entanto, nenhuma reação com desenvolvimento de cor foi observada em meio aquoso neste



**Figura 1.** Esquema simplificado da reação descarboxilativa do aspartame (a) com a ninidrina (b) com formação de hidridantina (c), aldeído (d), dióxido de carbono (e) e amônia (f). A hidridantina e amônia formados reagem com um segunda molécula de ninidrina produzindo o composto de **Ruhemann**.

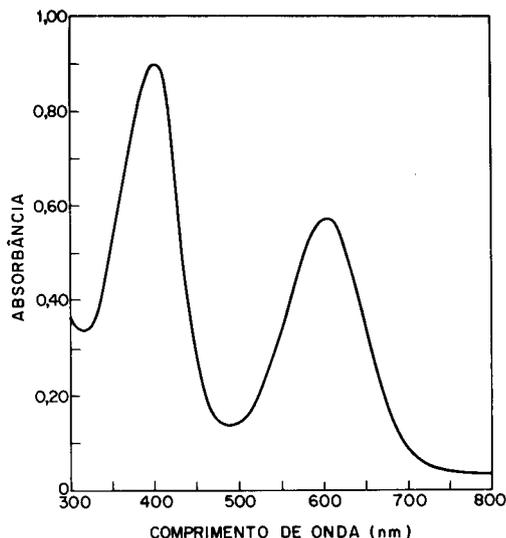


Figura 2. Espectro de absorção molecular do composto de Ruhemann em metanol/isopropanol 1:1 V/V.

intervalo de pH, mesmo em temperaturas acima de 25°C. Assim, investigou-se esta reação colorimétrica em diversos solventes orgânicos como acetona, acetato de etila, benzeno, butanol, carbonato de propileno, clorofórmio, ciclohexano, dicloroetano, diclorometano, etanol, éter etílico, hexano, hexanol, isobutanol, isopropanol, metanol, metil isobutil cetona, octanol, propanol, tetracloreto de carbono e tributil fosfato. Desses solventes, no isopropanol obteve-se maior sensibilidade (maior sinal analítico), seguido de propanol, etanol, carbonato de propileno, butanol e metanol, respectivamente. A sensibilidade do método espectrofotométrico diminui com o aumento da constante dielétrica do solvente. Como a solubilidade do aspartame em isopropanol é inferior a concentração deste adoçante encontrada na maioria dos produtos dietéticos e relativamente elevado em metanol (inferior apenas em meio aquoso), estudou-se o efeito da composição da mistura dos solventes metanol/isopropanol (% V/V) sobre a reação de aspartame  $2,0 \times 10^{-4}$  M e ninidrina de  $4,5 \times 10^{-3}$  M em função do tempo de reação de 10; 20; 30; 40; 50 e 60 minutos a 25°C. Como é mostrado na Figura 3, o melhor sinal analítico (maior sensibilidade) foi obtido para a mistura de metanol/isopropanol 1:1 V/V, consequentemente todos os estudos posteriores foram feitos com esta mistura de solventes.

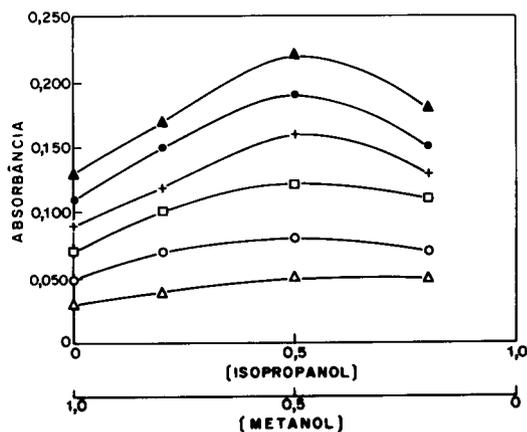


Figura 3. Efeito da composição dos solventes metanol/isopropanol (%V/V) sobre a reação colorimétrica do aspartame  $2,0 \times 10^{-4}$  M com ninidrina  $4,5 \times 10^{-3}$  M em função do tempo de reação ( $\Delta\Delta\Delta$ : 10;  $\circ\circ\circ$ : 20;  $\square\square\square$ : 30;  $++$ : 40;  $\bullet\bullet\bullet$ : 50 e  $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$ : 60) à 25°C

### Efeito da concentração de KOH sobre a reação colorimétrica

Com o objetivo de diminuir o tempo de análise, como também a sensibilidade do método, estudou-se o efeito da concentração de KOH nas concentrações de 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,08 e 0,12M sobre a reação colorimétrica de aspartame  $6,0 \times 10^{-4}$  M com ninidrina  $4,5 \times 10^{-3}$  M em metanol/isopropanol 1:1 V/V. Como pode ser observado na Figura 1, a primeira etapa da reação deste adoçante com ninidrina, produz amônia, além da hidridantina, aldeído e  $\text{CO}_2$ . Assim, um aumento do pH condicional do meio reacional deve favorecer a formação destes produtos, aumentando assim a concentração do composto de Ruhemann formado na segunda etapa desta reação, levando consequentemente a um aumento da sensibilidade do método espectrofotométrico.

Nota-se na Figura 4, que há um aumento acentuado da sensibilidade da reação colorimétrica no intervalo de concentração de KOH 0,005-0,03M permanecendo a absorbância medida praticamente constante acima deste intervalo de concentração. Assim, fixou-se a concentração de KOH em 0,03M, uma vez que obtiveram-se nesta concentração de base os maiores intervalos lineares de concentrações de aspartame das curvas analíticas em diversas temperaturas estudadas, como também os melhores coeficientes de correlação.

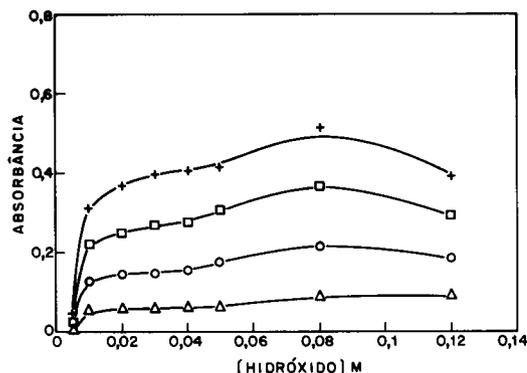


Figura 4. Efeito da concentração de hidróxido de potássio ( $5,0 \times 10^{-3}$  -  $1,2 \times 10^{-1}$  M) sobre a reação colorimétrica do aspartame  $6,0 \times 10^{-4}$  M com ninidrina  $4,5 \times 10^{-3}$  M em metanol/isopropanol 1:1 V/V em função do tempo de reação ( $\Delta\Delta\Delta$ : 2;  $\circ\circ\circ$ : 4;  $\square\square\square$ : 6 e  $++$ : 8 min).

### Efeito da concentração de ninidrina

O efeito da concentração de ninidrina de  $2,0 \times 10^{-3}$  -  $4,0 \times 10^{-2}$  M sobre a reação colorimétrica de aspartame  $4,0 \times 10^{-4}$  M em KOH 0,03M em função do tempo de reação de 2; 4; 6; 8 e 10 minutos, a 25°C é mostrada na Figura 5. O sinal analítico cresce com o aumento da concentração de ninidrina até a concentração de  $2,0 \times 10^{-2}$  -  $2,2 \times 10^{-2}$  M, decrescendo em valores superiores. A fim de garantir o efeito da concentração deste reagente desprezível em todo este trabalho, escolheu-se uma concentração de ninidrina igual a  $2,0 \times 10^{-2}$  M.

### Efeito da temperatura sobre a reação colorimétrica

Uma vez estabelecido o melhor meio reacional para a reação entre aspartame e ninidrina, estudou-se o efeito da temperatura no intervalo de 25 a 55°C sobre a reação do aspartame de  $2,0 \times 10^{-5}$  -  $2,0 \times 10^{-4}$  M com ninidrina  $2,0 \times 10^{-2}$  M em KOH 0,03M, para um tempo de reação de 10 minutos (tempo necessário para o desenvolvimento máximo da cor do composto). Observa-se que a sensibilidade da reação colorimétrica aumenta com a temperatura, diminuindo assim o tempo gasto por determinação desse adoçante, indicando que a reação entre

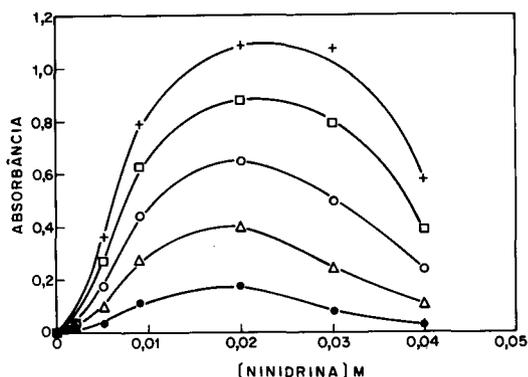


Figura 5. Efeito da concentração de ninidrina ( $2,0 \times 10^{-3}$ – $4,0 \times 10^{-2}$  M) sobre a reação colorimétrica de aspartame  $4,0 \times 10^{-4}$  M em metanol/isopropanol 1:1 V/V, KOH 0,03 M (●●●: 2; ΔΔΔ: 4; ○○○: 6; □□□: 8 e ++++: 10 min) a 25°C.

aspartame e ninidrina mostrado na Figura 1 é um processo endotérmico, deslocando o equilíbrio no sentido dos produtos. Os valores de absorvidade molar obtidos foram  $3,7 \times 10^3$ ;  $4,3 \times 10^3$ ;  $7,1 \times 10^3$  e  $8,9 \times 10^3$  l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, para as temperaturas de 25, 35, 45 e 55°C, respectivamente com um limite de detecção (3s branco/m) igual a  $1,96 \times 10^{-6}$  M, a 55°C.

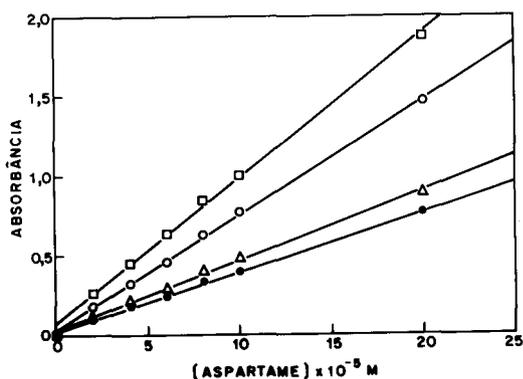


Figura 6. Efeito da temperatura (●●●: 25; ΔΔΔ: 35; ○○○: 45 e □□□: 55°C) do meio reacional sobre a sensibilidade do método espectrofotométrico para um tempo de reação de 10 minutos.

#### Efeito de substâncias concomitantes (Matriz)

O efeito de diversas substâncias geralmente adicionadas em produtos dietéticos para conservação e melhoria de sua aparência foi investigado. Ciclamato, sacarina, ácido cítrico, ácido fumárico, sacarose, lactose, glicose, sorbitol e manitol na concentração de até cinco vezes a concentração de aspartame e os corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e bordeaux-S na concentração permitida pela legislação brasileira (0,01% m/m) não interferiram na determinação espectrofotométrica de aspartame no comprimento de onda de 603 nm.

#### Testes de recuperação

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram os testes de recuperação de aspartame em alguns produtos comerciais. Nesse estudo, 0,37; 0,74 e 1,47 mg de aspartame foram adicionados em adoçante de mesa, gelatina e pudim, obtendo-se um fator de recuperação variando de 94,6 a 103,0%, indicando assim que não houve interferência da matriz desses produtos dietéticos no método analítico proposto.

Tabela 1. Recuperação de aspartame em diversos produtos comerciais.

Amostra	aspartame (mg)		Recuperação (%)
	adicionado	recuperado	
Adoçante de mesa	0,37	0,38	103,0
	0,74	0,73	98,7
	1,47	1,46	99,3
Gelatina	0,37	0,35	94,6
	0,74	0,76	102,7
	1,47	1,45	98,6
Pudim	0,37	0,36	97,3
	0,74	0,75	101,4
	1,47	1,48	100,7

#### Determinação de aspartame em produtos dietéticos

A Tabela 2 apresenta uma comparação entre os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico e os valores rotulados pelos fabricantes. Estes valores encontrados representam uma média de 7 (n=7) determinações por amostra analisada com um nível de confiança igual a 95%. Os resultados obtidos indicam que o método proposto apresenta boa precisão e um desvio padrão relativo inferior a 3,5%.

O trabalho desenvolvido mostra a viabilidade do uso da reação do aspartame com a ninidrina no meio reacional do metanol/isopropanol 1:1 V/V, para a determinação desse edulcorante em produtos dietéticos.

O método espectrofotométrico proposto mostrou-se rápido, prático e mais sensível que aquele apresentado por Lau e colaboradores<sup>18</sup>.

Estuda-se atualmente a adaptação deste método espectrofotométrico em análise por injeção em fluxo (FIA) objetivando aumentar ainda mais a frequência analítica destas determinações.

Tabela 2. Determinação espectrofotométrica de aspartame em produtos dietéticos.

Amostra	Valor Rotulado mg/g	Valor Encontrado mg/g	Erro Relativo %	Coefficiente Variação %
Adoçante	38,0	37,0 ± 1,0	-2,6	2,7
Gelatina	24,7	25,0 ± 0,5	+1,2	2,0
Refresco	48,0	49,0 ± 1,7	+2,1	3,5
Pudim	14,8	14,5 ± 0,5	-2,0	3,4

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao PADCT/CNPq (62.0060/91-3), CNPq (501638/91-1), FAPESP (91/2637-5) e também à CAPES pela bolsa de mestrado de I. C. V.

#### REFERÊNCIAS

- Mazur, R. H.; Schlatter, J. M.; Goldkamp, A. H.; *J. Am. Chem. Soc.*, (1969), **91**, 2684.
- Mazur, R. H., "Discovery of aspartame", In: "Aspartame: physiology and biochemistry", Ed by Stegink, L. D.; Filer, L. J., Marcel Dekker, New York, (1984), cap. 1, p. 3.
- O'brien, L.; Gelardi, R. C., *Chemtech* (1981) 274.
- Fuoco, T. H., *Química e Derivados*, abril (1991), 21.
- Tyler, T. A., *J. Assoc. Off Anal. Chem.* (1984), **67**, 745.
- Webb, N. G.; Beckman, D. D., *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, (1984), **67**, 510.

7. Tsang, W. S.; Clarke, M. A.; Parrish, F. W., *J. Agric. Food Chem.*, (1985), **33**, 734.
8. Di Pietra, A. M.; Cavrini, V.; Bonazzi, D.; Benfenati, L., *Chromatogr.* (1990), **30**, 215.
9. Issaq, H. J.; Weiss, D.; Ridlon, C.; Fox, S. D.; Muschik, G. M., *J. Liq. Chromat.*, (1986), **9**, 1791.
10. Verzella, G.; Mangia, A., *J. Chromatogr.*, (1985), **346**, 417.
11. Renneberg, R.; Riedel, K.; Scheller, F., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (1985), **21**, 180.
12. Fatibello-Filho, O.; Suleiman, A. A.; Guilbault, G. G.; Lubrano, G. J., *Anal. Chem.*, (1988), **60**, 2397.
13. Atmaca, S.; Iskender, G.; Bayer, E., *Acta Pharm. Turc.*, (1989), **31**, 37.
14. Guven, K. C.; Ozol, T., *Acta Pharm. Turc.*, (1984), **26**, 28.
15. Araman, A.; Temiz, D., *Acta Pharm. Turc.*, (1989), **31**, 29.
16. Ozol, T., *Acta Pharm. Turc.*, (1984), **26**, 59.
17. Vacher, J., *Cesk Farm.*, (1984), **33**, 217; apud *Anal. Abstr.* (1985), **47**, 4E86.
18. Lau, O. W.; Luk, S. F.; Chan, W. M., *Analyst*, (1988), **113**, 765.
19. Vasely, Z.; Davidkova, E.; Prudel, M., *Nahrung*, (1980), **24**, 525.
20. Lehninger, A. L., "Bioquímica", Edgar Blücher Ltda, São Paulo, vol. 1, (1976), p. 60.

**Publicação financiada pela FAPESP**