



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**Produção de aspartame: Abordagem Descritiva, Técnica e Econômica**

**Autor: Thales Azevedo Teixeira**

**Uberlândia – MG**

**2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**Produção de aspartame: Abordagem Descritiva, Técnica e Econômica**

**Thales Azevedo Teixeira**

**Monografia submetida à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para conclusão da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Química.**

**Orientador: Prof. Ubirajara Coutinho Filho**

**Uberlândia – MG**

**2017**

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA MONOGRAFIA *ASPARTAME: ABORDAGEM DESCRITIVA, TÉCNICA E ECONÔMICA*, DE THALES AZEVEDO TEIXEIRA, APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

Uberlândia, 22 de dezembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Ubirajara Coutinho Filho

Orientador– FEQUI/UFU

---

Prof. Humberto Molinar Henrique

FEQUI/UFU

---

Prof. Rubens Gedraite

FEQUI/UFU

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas.

Ao meu professor orientador, Prof. Ubirajara Coutinho Filho, por seus ensinamentos, paciência e confiança durante a realização deste trabalho. Foi um privilégio tê-lo como orientador.

Aos meus colegas e professores que me deram suporte para a conclusão do curso.

## RESUMO

Nos últimos anos o consumo de alimentos diet e light tem aumentado significativamente, promovendo expansão nas áreas de pesquisas orientadas à criação de novos produtos e ao desenvolvimento de outros já existentes. Nesse contexto, este trabalho tem como foco o estudo do N-L- $\alpha$ -aspartil-L-fenilalanina-1-metil éster, mais conhecido como aspartame, um edulcorante, de baixas calorias cerca de 200 vezes mais doce que a sacarose a 10% e consumido em quantidade superior a 14000 toneladas por ano em todo o mundo. Composto basicamente pelos aminoácidos fenilalanina e ácido aspártico, ligados por um éster de metila (metanol). Desde sua aprovação até hoje, foi sujeito a inúmeros ataques e questionamentos quanto a sua segurança para uso alimentar, no entanto, ainda há dúvidas aos possíveis danos relacionados à saúde humana na ingestão do produto. Este trabalho começa por uma abordagem descritiva sobre o aspartame, avaliando sua estrutura química, bem como uma pequena análise sobre os compostos que o constituem e como ele se comporta no organismo humano após metabolização. Discorre também sobre a questão da toxicidade do produto e como a ANVISA trata seu consumo no Brasil. Além disso apresenta um estudo pertinente exposto no livro BIOCHEMICAL ENGINEERING (1996), sobre as rotas de produção da fenilalanina, um dos principais constituintes do aspartame. Está contido também neste trabalho, algumas das principais rotas de produção do aspartame realizadas pelas maiores empresas do mundo, destacando suas vantagens e desvantagens, e por fim uma breve análise de uma rota de produção a partir do processo de síntese, avaliando um exemplo teórico, através de um balanço de massa, selecionando os principais equipamentos e matéria prima do processo, bem como algumas informações de custos, com o objetivo de adquirir uma visão mais clara do processo de produção sintético industrial do aspartame, uma vez que este é o principal edulcorante utilizado na indústria alimentícia no mundo, podendo alcançar grandes potências com relação ao seu desenvolvimento e descoberta de novos derivados do produto.

**PALAVRAS-CHAVE:** Aspartame, edulcorante, rotas de produção.

## ABSTRACT

In recent years the consumption of diet and light foods has increased significantly, promoting expansion in the areas of research oriented to the creation of new products and the development of others already existing. In this context, this study focuses on the study of N-(l-*aspartyl*)-l-phenylalanine methylester, better known as aspartame, a low calorie sweetener about 200 times sweeter than 10% sucrose and consumed in quantities exceeding 14000 tonnes worldwide per year. Composed primarily of the amino acids phenylalanine and aspartic acid, bound by a methyl ester (methanol). Since its adoption until today, it has been subject to numerous attacks and questions regarding its safety for food use, however, there are still doubts to the possible damages related to human health in the intake of the product. This work begins with a descriptive approach on aspartame, evaluating its chemical structure, as well as a small analysis about the compounds that constitute it and how it behaves in the human organism after metabolism. It also discusses the question of the toxicity of the product and how ANVISA treats its consumption in Brazil. In addition, it presents a pertinent study exposed in the book *BIOCHEMICAL ENGINEERING* (1996), on the routes of production of phenylalanine, one of the main constituents of aspartame. Some of the main routes of aspartame production carried out by the largest companies in the world, highlighting their advantages and disadvantages, and finally a brief analysis of a production route from the synthesis process, evaluating a theoretical example, through a mass balance, selecting the main equipments and raw material of the process, as well as some information of costs, with the objective of acquiring a clearer vision of the industrial synthetic production process of aspartame, since it is the main sweetener used in the food industry in the world, being able to reach great powers in relation to its development and discovery of new derivatives of the product.

**KEYWORDS:** Aspartame, sweetner, routes of production.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química do aspartame.....	3
Figura 2-Síntese Industrial do dipeptídeo.....	4
Figura 3– Estrutura química do Ácido aspártico. ....	6
Figura 4- Estrutura química da fenilalanina. ....	7
Figura 5– Estrutura química do Metanol. ....	9
Figura 6– O aspartame é metabolizado por esterases e petidades no trato intestinal em seus três constituintes- Aspartato, fenilalanina e metanol.....	10
Figura 7– Transaminação de ácido fenilpiruvico. ....	16
Figura 8– Fenilalanina desidrogenase.....	16
Figura 9- Produção a partir de D, L fenilalanina hidantoína com hidantoniase. ....	17
Figura 10 - NutraSweet/Ajinomoto processo “Formyl” para APM. ....	18
Figura 11- DSM/Tosh Processo químico enzimático.....	19
Figura 12- Processo biocatalítico na HSC (Holland sweetener company).....	20
Figura 13- Processo de produção do aspartame melhorado. ....	21
Figura 14– Diagrama de blocos do processo HSC. ....	22
Figura 15– Fluxograma do processo HSC.....	22
Figura 16– Produção química do $\alpha$ -aspartame. ....	27
Figura 17- Síntese do ácido N-formil-L-aspártico.....	28
Figura 18- Ponto de fusão, solução % em peso de etanol. ....	33
Figura 19- Sequência Processo industrial de produção do aspartame.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Vantagens e desvantagens da fermentação batelada com alimentação de glucose.....	14
Tabela 2– Vantagens e desvantagens da fermentação batelada alimentado com adição de precursor. ....	15
Tabela 3– Vantagens e desvantagens da síntese enzimática da fenilalanina.....	18
Tabela 4 – Massa molar e custo por quilograma do aspartame, ácido N-formil-L-aspartico anidrido e éster metílico de L-fenilalanina.....	29
Tabela 5 - Custo médio dos materiais utilizados no processo de produção de 3000 toneladas de aspartame considerando o primeiro ano de produção. ....	38
Tabela 6 - Custo médio dos materiais utilizados no processo de produção de 3000 toneladas de aspartame considerando o primeiro ano de produção. ....	38

## SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO .....	1
OBJETIVOS .....	2
2-QUÍMICA E PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ASPARTAME .....	3
2.1. AMINOÁCIDOS .....	5
2.2. ÁCIDO ASPÁRTICO.....	6
2.3. FENILALANINA .....	7
2.4. METANOL .....	9
2.5. O METABOLISMO DO ASPARTAME NO ORGANISMO HUMANO .....	10
2.6. TOXICIDADE.....	11
2.7. ROTAS DE PRODUÇÃO DA FENILALANINA.....	13
i - FERMENTAÇÃO BATELADA COM ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE .....	13
ii - FERMENTAÇÃO BATELADA ALIMENTADO COM ADIÇÃO DE PRECURSOR.....	14
iii - SÍNTESE ENZIMÁTICA DA FENILALANINA .....	15
2.8 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ASPARTAME.....	18
(i) NutraSweet/Ajinomoto processo “Formyl” para APM .....	18
(ii) DSM/Tosoh Processo químico enzimático.....	19
(iii) Processo biocatalítico na HSC (Holland sweetener company).....	20
(iv) Processo de produção do aspartame melhorado .....	21
3 - LEGISLAÇÃO BRASILEIRA FRENTE O ASPARTAME .....	23
4 - DESCRIÇÃO DO MÉTODO SINTÉTICO DE PRODUÇÃO DO ASPARTAME .....	24
Fermentação .....	24
Síntese .....	25
Purificação .....	26
ANÁLISE: .....	27
ESTUDO DE CASO:.....	28
SELEÇÃO DE EQUIPAMENTOS .....	33
Reator Tanque de mistura.....	34

Tanque de Armazenamento.....	35
Resfriador/Aquecedor.....	35
Tanque de cristalização .....	36
Filtro .....	36
Secador.....	37
Custo médio dos materiais e equipamentos para produção de 3.000 toneladas de aspartame por ano a partir da etapa de síntese apresentado nas Tabelas 5 e 6.....	37
5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41

## 1-INTRODUÇÃO

O N-L-a-aspartil-L-fenilalanina-1-metil éster, mais conhecido como aspartame, possui um poder edulcorante cerca de 200 vezes mais doce que a sacarose a 10% (CARDELLO *et al.* 2001), consumido na quantidade superior a 14000 toneladas por ano. Aspartame está em todo lugar. Está nos restaurantes e em nossas casas. Nos últimos anos, o consumo de alimentos diet e light tem aumentado significativamente, promovendo um aumento nos investimentos de pesquisas nas áreas orientadas à elaboração de novos produtos. Estes produtos são basicamente direcionados a pessoas que apresentam algum distúrbio no metabolismo de açúcares (diabéticos), ou mais recentemente, consumidores que estão à procura de alimentos com baixo teor calórico. Na luta contra a obesidade, consumidores não estão apenas interessados em alternativas de baixas calorias aos seus alimentos favoritos, começaram a exigí-los.

Edulcorantes são substâncias com poder adoçante elevado, principalmente quando comparados com a sacarose, são utilizados na substituição deste açúcar em alimentos e bebidas dietéticas tendo como objetivo principal a redução do valor calórico.

São diversos os edulcorantes permitidos para uso em alimentos e bebidas no Brasil, dentre os quais um dos mais vendidos está o aspartame.

O aspartame foi descoberto em 1965 por James Schlatter, pesquisador dos Laboratórios de G. D. Searle (empresa farmacêutica) nos Estados Unidos. Foi desenvolvido por acaso na tentativa de se encontrar um novo medicamento para o tratamento da úlcera. Enquanto o Dr. Schlatter misturava ácido aspártico e fenilalanina, dois aminoácidos que ocorrem naturalmente e fazem parte da constituição de proteínas, ele colocou o dedo na mistura e por algum motivo decidiu prová-lo. “Eu lambi meu dedo e o gosto foi bom”. Ele, mais tarde, lembrou. E com isso nasceu um novo edulcorante com baixas calorias. (WASHINGTON POST ,1982).

Seu consumo só foi liberado pela Food and Drug Administration (FDA) em 1981, após a realização de vários estudos toxicológicos. No Brasil, a liberação da comercialização de produtos dietéticos, entre eles os que continham aspartame, foi autorizada em 1988 (FREITAS; ARAÚJO, 2010 apud CAMPOS, 1996). Atualmente, seu consumo nos produtos diet e light tem alcançado grande êxito devido suas características semelhantes às da sacarose e por contribuir

para a redução do valor energético dos alimentos (CARDELLO *et al.* 2001; THOMSON; TUNALEY, 1987). Seu valor calórico é igual ao da sacarose (4 kcal/g) utilizado em pequenas quantidades. É consumido por diabéticos, mas não por portadores de fenilcetonúria, doença genética que altera o metabolismo da fenilalanina. Desde sua aprovação até hoje, foi sujeito a inúmeros ataques e questionamentos quanto a sua segurança para uso alimentar. Em 20 anos, mais de 200 estudos foram realizados em animais e seres humanos e nenhum deles chegou em uma conclusão que colocasse em dúvida a segurança do produto. No entanto, ainda há dúvidas aos possíveis danos relacionados à saúde humana na ingestão do aspartame. Por esse motivo faz-se necessário uma reflexão crítica e coerente, considerando o conhecimento existente na literatura nacional e internacional cujo objetivo é auxiliar a Ciência toxicológica sobre o aspartame, cujos efeitos são ainda controversos. Além do mais, não se conhece na literatura informações científicas que comprovam a participação do aspartame em possíveis alterações morfológicas no ser humano.

## **OBJETIVOS**

Portanto, o objetivo central deste trabalho é de estudar a produção do aspartame, sendo um produto fabricado com biotecnologia a partir de metanol e dos aminoácidos ácido aspártico e fenilalanina. As seguintes etapas serão avaliadas: Abordagem descritiva do aspartame, descrição do processo produtivo, análise das principais rotas de produção e estudo econômico parcial do processo.

## 2-QUÍMICA E PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ASPARTAME

O aspartame é também conhecido comercialmente como “Equal”, o N-L-alfaaspartil-L-fenilalanina-1-metil-éster cuja a fórmula química é apresentada na Figura 1, um dipeptídeo sintético esterificado com sua fórmula apresentada na Figura 2, composto pelos aminoácidos fenilalanina e ácido aspártico, ligados por um éster de metila (metanol) (SONKE; SCHOEMAKER, 2006).

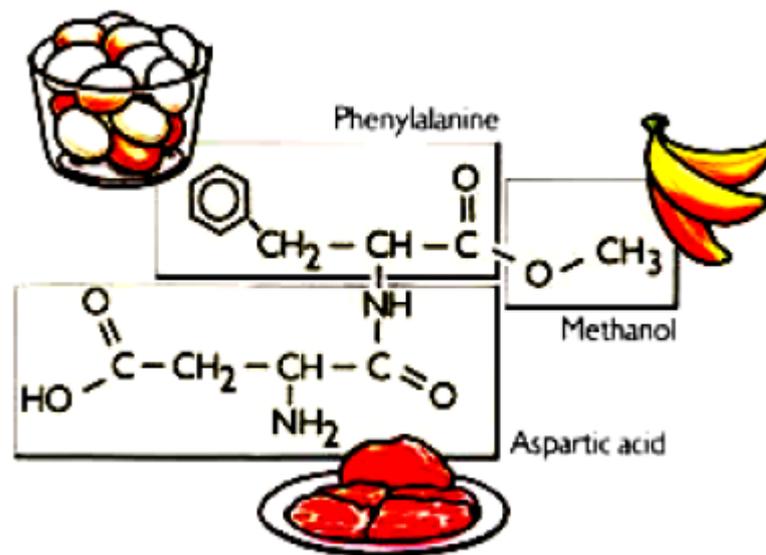


Figura 1- Estrutura química do aspartame.

Fonte: (SONKE; SCHOEMAKER, 2006).

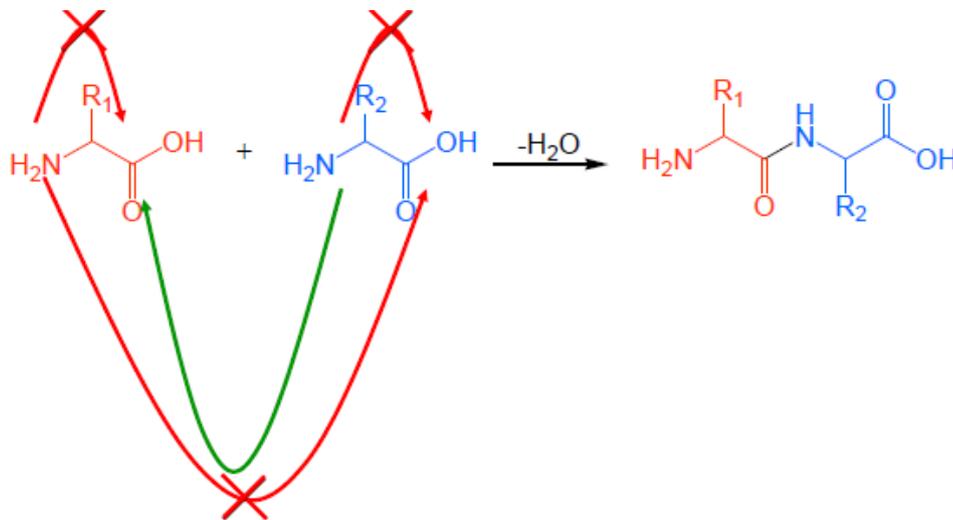


Figura 2-Síntese Industrial do dipeptídeo.

Fonte: (SONKE; SCHOEMAKER, 2006).

Na síntese industrial do dipeptídio são requerimentos importantes: grupos protetores baratos para evitar reações secundárias de grupos amino e grupos de cadeias laterais de aminoácidos, se necessário; e a ativação barata de uma função carbonila (SONKE; SCHOEMAKER,2006).

Com poder adoçante de aproximadamente 200 vezes superior ao da sacarose, o aspartame possui um sabor residual se comparado com ciclamato e sacarina, menos apurado (BUTCHKO *et al.* 2002) concluiu, através de análise descritiva quantitativa, que em equivalência de doçura a uma solução de sacarose a 10%, o aspartame foi o edulcorante que apresentou os atributos mais próximos a solução padrão. O aspartame possui estabilidade limitada em condições ácidas e de processamento térmico. Apesar do aspartame não resistir a temperaturas elevadas, tendo como consequência a perda do seu poder adoçante, para evitar a diminuição de sua estabilidade controla-se alguns parâmetros, como a adição do edulcorante no final do preparo de algumas receitas, a redução da quantidade de água no alimento e um tempo de exposição menor a temperaturas elevadas (BENASSI *et al.* 2001 e CAMPOS, 2006). Durante sua ingestão, o aspartame separa-se em seus três constituintes originais: fenilalanina, ácido aspártico e metanol. Os três elementos são processados pelo organismo da mesma forma como se fossem provenientes de alimentos naturais.

## 2.1. AMINOÁCIDOS

A REVISTA FOOD INGREDIENTS BRASIL(FIB) classificou aminoácidos como sendo formados por ácido carboxílico e uma amina dois grupos funcionais que representam sua estrutura. Quando dois aminoácidos se unem, forma-se um dipeptídeo, assim como a união de três forma-se um tripeptídeo e assim por diante, bem como a união de vários aminoácidos irá formar uma cadeia polipeptídica.

Proteínas são formadas por cadeia polipeptídica, alguns formados por apenas uma cadeia, outras por três, quatro ou mais. A sequência dos aminoácidos, bem como a estrutura tridimensional é o que determinará a diferença de cada uma delas. 20 aminoácidos (Alanina, Arginina, Aspartato, Asparagina, Cisteína, Fenilalanina, Glicina, Glutamato, Glutamina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Prolina, Serina, Tirosina, Treonina, Triptofano e Valina) são conhecidos, encontrados em moléculas de proteína, com sua síntese comandada por mecanismos genéticos, como a replicação do DNA e a transcrição do RNA.

Os aminoácidos são classificados em essenciais e não essenciais. Em humanos saudáveis, nove aminoácidos são considerados essenciais, uma vez que não podem ser sintetizados endogenamente e, portanto, devem ser ingeridos por meio da dieta. Dentre os aminoácidos essenciais, se incluem os três aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), ou seja, leucina, valina e isoleucina. (ROJERO; TIRAPEGUI, 2008).

Certamente a principal função dos aminoácidos não é a energética, pois os carboidratos e lipídios são mais bem aproveitados no metabolismo energético. No entanto, aminoácidos são importantes fontes de energia durante exercícios físicos intensos e longos, fornecendo substrato para a neoglicogênese (aminoácidos glicogênicos).

Alguns aminoácidos são responsáveis por fornecer substrato para a síntese do acetil-CoA, o qual é aproveitado no ciclo de Krebs, entretanto não podem ser convertidos em glicose (aminoácidos cetogênicos). Outros fornecem substrato para as duas vias (aminoácidos-cito-glicogênicos). Muitas vezes, são os aminoácidos dos músculos das proteínas plasmáticas que fornecem a energia necessária para a manutenção da vida em estados de carências nutricionais. (NELSON; COX, 2002)

## 2.2. ÁCIDO ASPÁRTICO

O ácido aspártico compõe 40% do aspartame, é encontrado em produtos lácteos, carne bovina, aves, cana-de-açúcar e melado.

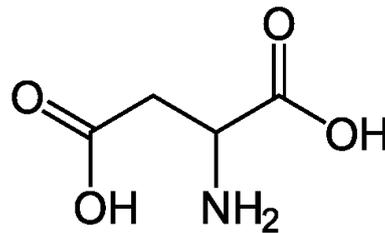


Figura 3– Estrutura química do Ácido aspártico.

(GESTIS Substance Database)

O ácido aspártico ou 2-amino-butanóico ou ainda aspartato, é um dos aminoácidos codificado pelo código genético, sendo assim um dos componentes das proteínas dos seres vivos. Tem como função reduzir os níveis de amônia após os exercícios, ajudando na sua eliminação, e ainda protege o sistema nervoso central. Também ajuda a melhorar o sistema imunológico e converter carboidratos em energia muscular. É um aminoácido não essencial nos mamíferos, tendo como possível função a neurotransmissão excitatória no cérebro. Nesse sentido, o ácido aspártico parece, segundo indicações conferir resistência a fadiga. É um metabolito do ciclo da ureia e participa na gluconeogénese. Sendo classificado como aminoácido por apresentar grupos carboxilato, os quais são hidrófilos. Nos mamíferos, o ácido aspártico é degradado *in vivo* a oxaloacetato. Sendo este metabolito o precursor da síntese do aspartato. A enzima responsável por esta reação é a aspartato aminotransferase que, como o nome indica, transfere um grupo amina do glutamato para o oxaloacetato para formar aspartato (o outro produto da reação é o  $\alpha$ -cetogluturato). O qual ocorre na matriz mitocondrial. Assim o aspartato sai do mitocôndrio e participa no ciclo da ureia. Por meio desse processo, o ácido aspártico funciona como precursor na síntese na arginina, outro aminoácido. Em bactérias, o aspartato origina os aminoácidos metionina, treonina e lisina.

### 2.3. FENILALANINA

A fenilalanina é um aminoácido aminado que representa quase 50% da constituição do aspartame.

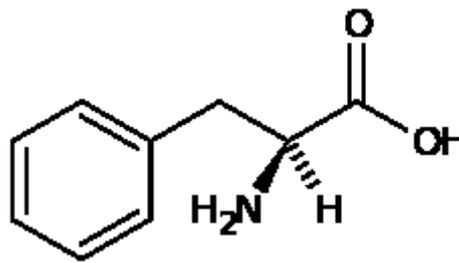


Figura 4- Estrutura química da fenilalanina.

(REVISTA ELETRÔNICA DE FARMÁCIA ,2014)

A fenilalanina pode ser obtida a partir de alimentos que contenham proteínas, incluindo carne bovina, aves, porco, peixe, leite, iogurte, ovos, queijo, produtos de soja e certas nozes e sementes.

A Fenilalanina ou ácido 2-amino-3-fenil-propanóico um aminoácido codificado pelo código genético, sendo assim um dos componentes das proteínas dos seres vivos. Por apresentar grupos funcionais hidrocarbonetos apolares ou modificados, são hidrofóbicos. A fenilalanina é essencial ao corpo humano pois é parte integral de todas as proteínas do nosso corpo. Não é sintetizada pelo corpo humano, portanto deve fazer parte da dieta diária, do contrário nosso corpo não consegue funcionar. Conforme a REVISTA ELETRÔNICA DE FARMÁCIA (2014) certas pessoas possuem uma doença conhecida com fenilcetonúria (PKU), uma rara doença hereditária. Essas pessoas não conseguem digerir a fenilalanina, devido a falta de uma enzima específica. . Esta, como não é absorvida, passa a acumular-se no organismo até ser convertida

em compostos tóxicos, designados por fenilcetonas (como o fenilacetato e a fenetilamina), que são expelidos pela urina. Os doentes com PKU que ingerem a fenilalanina sofrem de diferentes sintomas de toxicidade, incluindo atrasos mentais especialmente em crianças, e distúrbios intelectuais nos adultos. Como as crianças nascem aparentemente normais e os sintomas da Fenilcetonúria e Hipotireoidismo Congênito surgem por volta do 6º ao 8º mês de vida, torna-se importantíssimo a detecção dessas doenças ainda nos berçários. O defeito genético no metabolismo da fenilalanina (Phe), um aminoácido essencial, está relacionado com o nível de atividade enzimática da fenilalanina-hidroxilase ou com a síntese do cofator tetraidrobiopterina (BH4). A fenilalanina, em sua via metabólica principal, é hidroxilada a tirosina (Try). Devido a um desses defeitos, o nível de fenilalanina nos líquidos corporais se eleva e, entra em jogo, uma via secundária do seu metabolismo. Nessa via, a fenilalanina sofre transaminação produzindo ácido fenilpirúvico que é excretado na urina. O excesso de fenilalanina acumulado nos líquidos corporais juntamente com o fenilpiruvato circulante leva a um retardo mental irreversível e a uma diminuição dramática na expectativa de vida, a menos que o distúrbio seja, precocemente, diagnosticado e um tratamento iniciado. Denominou-se, genericamente, como hiperfenilalaninemia os níveis elevados de fenilalanina no sangue e como fenilcetonúria (PKU) a hiperfenilalaninemia relacionada com a deficiência de fenilalanina-hidroxilase. A fenilcetonúria (PKU) foi descoberta por Fölling, em 1934, e constituiu a primeira demonstração de um defeito genético, de caráter autossômico recessivo, como causa de retardamento mental. A triagem neonatal possibilita a detecção e o tratamento precoce de PKU. O teste de triagem é realizado alguns dias após o nascimento, em geral antes do recém-nascido deixar o hospital. Uma gota de sangue é obtida por punção do calcanhar (Teste do Pezinho), secada em papel de filtro e enviada para medida dos níveis sanguíneos de fenilalanina. Os resultados positivos devem ser confirmados rapidamente, porque atrasos no início do tratamento têm efeitos profundos sobre a capacidade intelectual do indivíduo. O tratamento de pacientes portadores de PKU consiste na restrição dietética de fenilalanina, conseqüentemente, na restrição de alimentos proteicos. O uso de formulações semissintéticas específicas, como mistura de L-aminoácidos e hidrolisados proteicos, reduz a ingestão de fenilalanina ao mínimo necessário ao mesmo tempo em que mantém uma boa nutrição de todos os outros aminoácidos essenciais. A remoção de fenilalanina pode ser realizada por técnicas e procedimentos diferenciados, como uso de carvão ativado, cromatografia de exclusão molecular, cromatografia de troca iônica, dentre outros.

## 2.4. METANOL

O metanol, também comumente chamado de "álcool em madeira", é usado como solvente industrial, pesticida e fonte alternativa de combustível.

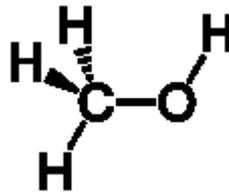


Figura 5– Estrutura química do Metanol.

(JOVELINO et al, 2015)

O metanol é um constituinte de 10% de edulcorantes artificiais, como o aspartame.

Alimentos como frutas e vegetais frescos, sucos de frutas, bebidas fermentadas e refrigerantes dietéticos contendo aspartame são as principais fontes de metanol no organismo humano.

O metanol, carbinol ou álcool metílico, sendo um dos principais compostos do grupo orgânico dos álcoois. Tem como ponto de fusão  $-97\text{ }^{\circ}\text{C}$  e ponto de ebulição de  $64,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

É conhecido como álcool de madeira pois durante muitos anos foi obtido pela destilação da madeira a seco, sem presença de ar. Atualmente o metanol é obtido de forma sintética a partir do monóxido de carbono (processo carboquímico) ou por oxidação controlada do metano (processo petroquímico). Sua solubilidade em água é infinita, pois, por possuir moléculas pequenas, com o grupo OH – grupo característico dos álcoois – suas moléculas formam ligações de hidrogênio com a água. De todos os álcoois, o metanol é o mais tóxico: sua dose letal é de 0,07 gramas por kg de massa corporal, o que quer dizer que meia colher de sopa de metanol é

suficiente para provocar a morte de um indivíduo de 60 kg (JOVELINO *et al*, 2015). Se ingerido, pode até mesmo causar cegueira, ainda que em pequenas doses, e em casos mais graves a morte. Um exemplo que ilustra bem esse caso é o que ocorreu em Salvador, em 1999, quando 40 pessoas morreram por ingerir aguardente de produção clandestina que estava contaminada com metanol. Os sintomas que eles sentiram antes de morrer foram dor de cabeça, hipertensão e vertigem.

## 2.5. O METABOLISMO DO ASPARTAME NO ORGANISMO HUMANO

Após ingestão, o aspartame é rapidamente hidrolisado no intestino ao dipeptídeo L-aspartil-L-fenilalanina e a metanol cuja estrutura é apresentada na Figura 6. O dipeptídeo é então metabolizado nas células da mucosa em seus aminoácidos constituintes: ácido aspártico e fenilalanina (LOURENÇO, 2005).

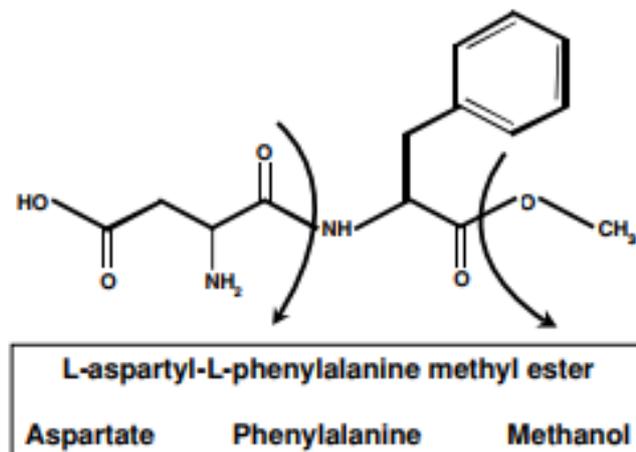


Figura 6– O aspartame é metabolizado por esterases e peptidases no trato intestinal em seus três constituintes- Aspartato, fenilalanina e metanol.

Fonte: (BUTCHKO *et al*. 2002).

Para cada molécula de aspartame uma molécula de cada constituinte é produzida. Após a absorção elas são então metabolizadas ou excretadas pelo organismo seguindo os caminhos:

o ácido aspártico é transformado em alanina, a fenilalanina em sua maior quantidade em tirosina e, o metanol em formaldeído e então em ácido fórmico (BUTCHKO *et al.* 2002). Cerca de 10% em peso do aspartame é absorvido para a circulação como metanol, no entanto, não é detectável mesmo em doses de 34mg de aspartame/kg de peso corpóreo. As quantidades destes metabólitos são muito pequenas quando comparadas às obtidas da dieta normal (carnes ou outros alimentos proteicos) (MATTOS, 2017).

O aspartame não age no sistema reprodutor e não apresenta efeitos mutagênicos, teratogênicos ou embriotóxicos, ou efeito tóxico de qualquer natureza nas doses em que é utilizado ou recomendado (MATTOS, 2017). Indivíduos que consumiram alimentos e bebidas com aspartame mostraram maior perda de peso, indicando maior aderência à dieta prescrita, e melhor qualidade de vida, confirmando a vantagem de se utilizar o aspartame em programas de perda de peso, pois este satisfaz o componente hedônico e facilita a aderência a um programa dietético hipocálico. Pode ser consumido por diabéticos, mas não por portadores de fenilcetonúria, doença genética que altera o metabolismo da fenilalanina.

## 2.6. TOXICIDADE

Nos últimos anos o produto aspartame foi alvo de ataques sobre sua inocuidade em relação a aspectos toxicológicos. Apesar das desconfianças da comunidade, nada foi provado ainda em relação a sua toxicidade. Ensaio realizados em vários animais evidenciaram a ausência de toxicidade e carcinogenicidade associado à ingestão do aspartame (MATTOS, 2017). Segundo BUTCHKO *et al.* (2002), a ingestão dos produtos metabolizados do aspartame (L-fenilalanina, ácido aspártico e metanol), não acarreta problemas à saúde, uma vez que, na alimentação normal, as quantidades destes três componentes são muito superiores. Por exemplo, um copo de leite desnatado contém 6 vezes mais fenilalanina e 13 vezes mais ácido aspártico, enquanto que um copo de suco de tomate contém 6 vezes mais metanol que um volume equivalente de bebida adoçado com 100% de aspartame. Além disso, a fenilalanina é um aminoácido essencial para o crescimento, manutenção e desenvolvimento da vida. Uma das

preocupações quanto aos seus possíveis efeitos nocivos se deve ao metanol, que produz formaldeído e ácido fórmico, responsáveis pela acidose e toxicidade ocular devido à ingestão do álcool. Considera-se, no entanto, que seriam necessários 200-500 mg/kg de metanol para ocorrer toxicidade significativa e, como aproximadamente 10% do aspartame ingerido se transforma em metanol, seria necessário ingerir, no mínimo, 2.000 mg/kg de aspartame para ele promover intoxicação (TORLONI *et. al.*, 2007). Essa dose equivaleria, para um indivíduo de 70 kg, à ingestão diária de 140.000 envelopes ou 350.000 gotas do adoçante ou 2.545 litros de refrigerante dietético, o que seria impossível. E, a quantidade de metanol produzida a partir da ingestão de refrigerantes dietéticos (cerca de 55 mg/L) é menor que a produzida a partir da ingestão de sucos de frutas naturais ricos em aspartato (cerca de 140 mg/L) (STEGINK, 1987). Baseado nesses dados conclui-se não haver possibilidade de dano a saúde direcionado ao metanol produzido pela ingestão de aspartame (TORLONI *et. al.*, 2007). Outra questão quanto à toxicidade do aspartame é que durante a gravidez há o acúmulo de aspartato, outro dos seus metabólitos. Algumas pesquisas realizadas em ratos, observaram que a ingestão maciça de aspartato produzia necrose neuronal hipotalâmica. Porém, segundo STEGINK (1987), a administração de grandes doses dessas mesmas substâncias a primatas não produz lesões cerebrais. O autor ainda afirma que o aspartato, ao contrário da maioria dos aminoácidos, não se acumula nos tecidos fetais. Portanto, em humanos, não existem evidências de toxicidade fetal devido ao aspartato decorrente da ingestão materna de aspartame. Há restrições do uso do aspartame para pessoas portadoras da fenilcetonúria (PKU ou phenylketonuria), mal congênito e raro que se caracteriza pela ausência de uma enzima que faz o metabolismo da fenilalanina, aminoácido presente no edulcorante artificial. Indivíduos com forma homozigota da PKU têm uma deficiência da enzima hepática fenilalanina-hidroxilase e são incapazes de converter a fenilalanina (aminoácido essencial) em tirosina (aminoácido não essencial), o que resulta no acúmulo de fenilalanina, potencialmente tóxica para o tecido cerebral. Sem tratamento, esses indivíduos apresentam atraso mental, microcefalia, mielinização deficiente dos nervos, reflexos hiperativos e menor expectativa de vida. Com o diagnóstico precoce e abstenção da fenilalanina, esses indivíduos terão vida normal. Para evitar danos à sua própria saúde, as mulheres com PKU (forma homozigota), assim como todos os indivíduos portadores desta doença, devem controlar constantemente o consumo de qualquer produto que contenha fenilalanina e, conseqüentemente, devem evitar o aspartame, uma vez que um de seus metabólitos é a fenilalanina, inclusive durante a gestação (TORLONI *et. al.*, 2007).

Baseados nos estudos toxicológicos realizados nos Estados Unidos, obtidos com animais (geralmente realizados com roedores durante toda a vida dos mesmos), o Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização Mundial da Saúde (JECFA/OMS), estabeleceu que a IDA (Ingestão Diária Aceitável) de aspartame seria de até 40 mg/kg/dia, valor que também corresponde ao IDA do aspartame em nosso país. Agências de regulamentação em mais de 100 países aprovaram o aspartame para o seu uso como edulcorante (TOZETTO, 2005).

## **2.7. ROTAS DE PRODUÇÃO DA FENILALANINA**

A fenilalanina pode ser produzida por várias rotas incluindo a fermentação batelada utilizando glucose, a fermentação batelada utilizando um precursor e a síntese enzimática. Ao determinar qual processo usar na produção da fenilalanina, o tipo de estimativa de custos, proporciona um meio para avaliar cada abordagem. As necessidades de pesquisas e desenvolvimento podem ser determinadas examinando a sensibilidade dos custos de fabricação e de capital para processar as mudanças.

### **i - FERMENTAÇÃO BATELADA COM ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE**

Na fermentação batelada com alimentação de glucose, duas propostas para o desenvolvimento de sepas microbianas de alto rendimento podem ser abordadas, a rota tradicional envolvendo mutantes reguladores e o uso de organismos geneticamente modificados. Um certo número de mutantes reguladores foi descrito na literatura. Por exemplo, a utilização do mutante *E. coli* que na fermentação em lote produziu 10 gm phe/litro.  $Y_{p/s}$  de 0.21 gm/gm, e uma produtividade de 0.035 gm phe/litro-hora. Em cultura contínua a

concentração final foi reduzida para 8.7 gm/litro, mas a produtividade aumentou para 0.44 gm/litro-hora. Em contraste à amplificação de DAPH e chorismato mutase em *E. coli* utilizando o plasmídeo pBr322 resultou em uma produção de deformação produzindo 2 gm/litro de phe,  $Y_{p/s}$  e 0.11 gm/gm e uma produtividade volumétrica de 0.07 gm/litro-hora. Os melhores produtores foram produzidos por combinativos de derivações provinciais e reguladoras para formar uma nova estripe. As principais variáveis no uso desta abordagem são a concentração final de fenilalanina que é obtida e o teor de fenilalanina na glicose. (BLANCH; CLARK, 1996)

Na Tabela 1, a seguir, são apresentadas algumas vantagens e desvantagens da rota de produção:

Tabela 1– Vantagens e desvantagens da fermentação batelada com alimentação de glucose.

<b>Vantagens</b>	Tecnologia bem estabelecida		Matéria-prima barata (glucose, sais, etc.)		<i>Design</i> de planta flexível			
<b>Desvantagens</b>	Alto custo de capital	Recuperação complexa do produto (necessidade de remoção de células)	Produto diluído e contaminado,	Baixa produtividade volumétrica	Potencial contaminação e problemas de instabilidade celular	Tecnologia batelada	Trabalho de alto custo	Baixa utilização da matérias-primas

Fonte: (BLANCH; CLARK, 1996).

## ii - FERMENTAÇÃO BATELADA ALIMENTADO COM ADIÇÃO DE PRECURSOR

Uma segunda abordagem para melhorar a produtividade é o uso da alimentação de um precursor. Isso é atraente para algumas fermentações onde é difícil estabelecer uma rota direta da glucose ao produto final. Por exemplo, a produção de L-triptofano e L-serina é rigorosamente regulada, e as rotas comerciais empregam ácido antranílico e glicina, respectivamente, como precursores. Dois potenciais precursores para a fenilalanina são o fenilpiruvato e o ácido

acetamindocinâmico. Com base na ransaminação de fenilpiruvato pelo glutamato, obteve-se uma concentração de 7.2 gm phe/litro, um rendimento de 0.76 gm phe por gm de precursor e uma produtividade volumétrica de 0.1 gm/litro-hora utilizando *Corynebacterium glutamicum*. A duração dessa fermentação foi 70 horas (BLANCH; CLARK, 1996).

Na Tabela 2, a seguir, são apresentadas algumas vantagens e desvantagens da rota de produção:

Tabela 2– Vantagens e desvantagens da fermentação batelada alimentado com adição de precursor.

<b>Vantagens</b>	Rendimento melhorado em substratos		Isolados microbianos naturais são usados (pequeno esforço de reversão)		<i>Design</i> de planta flexível	Capaz de usar qualquer capacidade de fermentação existente
<b>Desvantagens</b>	Baixa produtividade volumétrica	Precusores caros	O catalisador é utilizado apenas uma vez e tem um valor alto	Dificulta problemas de separação	Alto custo de capital	Alto custo de trabalho

Fonte: (BLANCH; CLARK, 1996).

### iii - SÍNTESE ENZIMÁTICA DA FENILALANINA

Várias enzimas podem ser empregadas para a produção enzimática da fenilalanina. Estas rotas envolvem a reação das transaminases, ou reações catalisadas por fenilalanina amônia liase, hidantoinase e fenilalanina acilase. A abordagem que é selecionada depende da disponibilidade do precursor e do custo da enzima e da sua semi-vida em condições operacionais. Na sequência são apresentadas cada uma das abordagens.

(a) Transaminação de ácido fenilpiruvico.

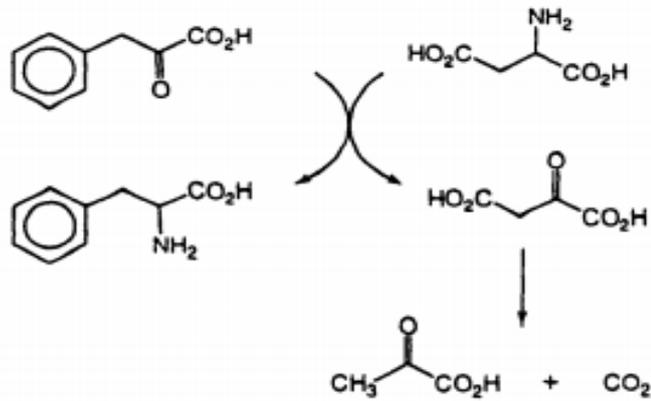


Figura 7– Transaminação de ácido fenilpiruvico.

Fonte: (BLANCH, CLARK, 1996).

**(b)** Fenilalanina desidrogenase/ formato desidrogenase.

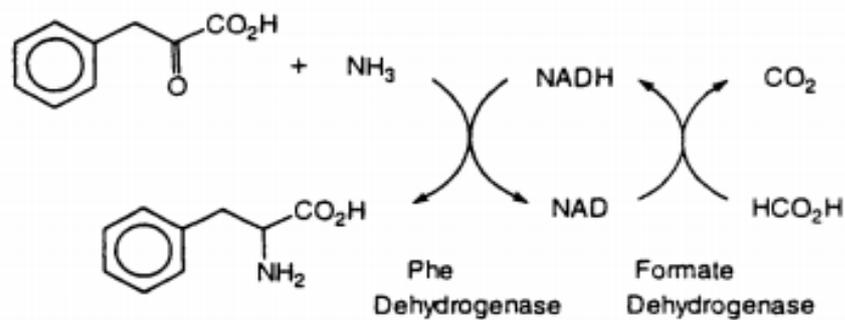


Figura 8– Fenilalanina desidrogenase.

Fonte: (BLANCH, CLARK, 1996).

O substrato para fenilalanina desidrogenase no exemplo acima (ácido fenilpiruvico) também pode ser gerado a partir de D,L-fenilacato por oxidação com D,L-hidroxi-isocaproato

desidrogenase, que regenera NADH do NAD produzido pela ação da fenilalanina desidrogenase. As enzimas estão presentes em *Lactobacillus confusus* e *Rhodococcus*.

(c) Produção a partir de D, L fenilalanina hidantoína com hidantoniasse.

L-fenilalanina hidantoína pode ser convertida a fenilalanina pela ação da hidantoniasse encontrada na *Flavobacterium aminogens*. Se uma mistura racêmica é empregada, D-hidantoína não convertida pode ser racemizada e reciclada. A reação é apresentada na Figura 9, abaixo.

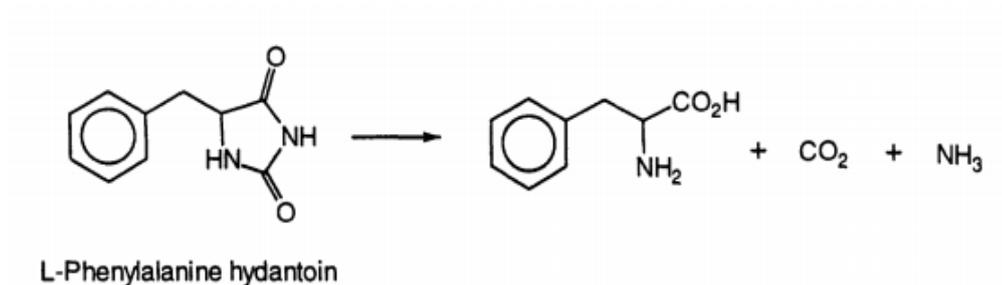


Figura 9- Produção a partir de D, L fenilalanina hidantoína com hidantoniasse.

Fonte: (BLANCH, CLARK, 1996).

Na Tabela 3, a seguir, são apresentadas algumas vantagens e desvantagens da rota de produção:

Tabela 3– Vantagens e desvantagens da síntese enzimática da fenilalanina.

Vantagens	Alta produtividade volumétrica		Baixa contaminação do produto	Fácil de automatizar	Reutilização do catalizador	Operação contínua	Baixo investimento de capital
Desvantagens	Alto custo de matéria-prima	Potencial de contaminação microbiana	Baixa flexibilidade de design da planta	Dificulta problemas de separação		Atualmente, relativamente, poucas aplicações industriais	Catalisador caro

Fonte: (BLANCH; CLARK, 1996)

## 2.8 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ASPARTAME

### (i) NutraSweet/Ajinomoto processo “Formyl” para APM

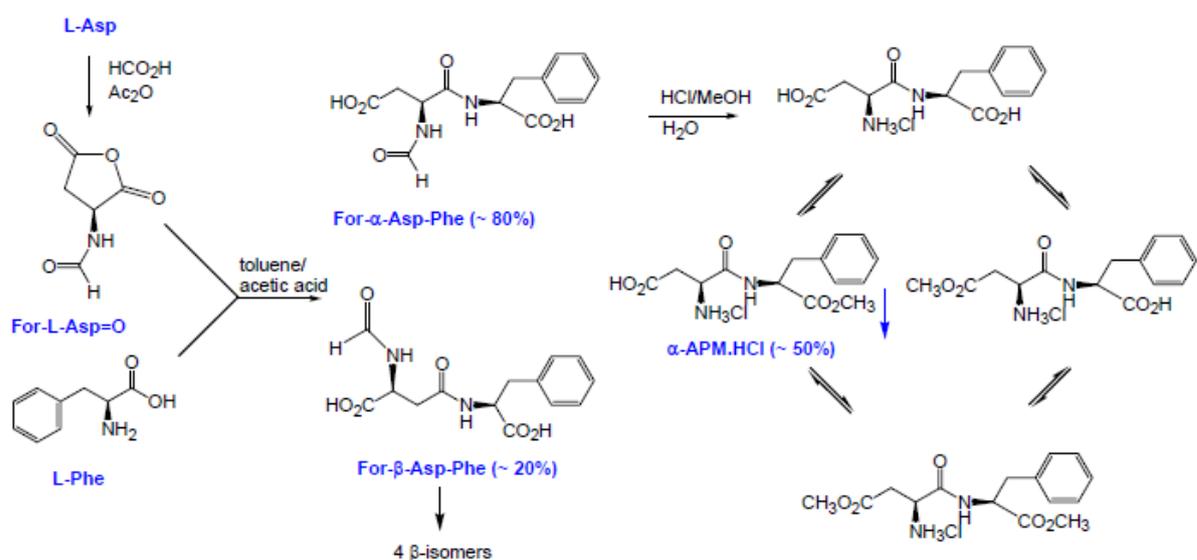


Figura 10 - NutraSweet/Ajinomoto processo “Formyl” para APM.

Fonte: (SONKE; SCHOEMAKER, 2006)

As vantagens e desvantagens do processo “Formyl” apresentada na Figura 10 acima, são as seguintes:

**Vantagens:** Proteção e acoplamentos baratos

**Desvantagens:** desproteção difícil (1-3 d, apenas 50% de rendimento), necessária acristalização de neutralização final.

**(ii) DSM/Tosoh Processo químico enzimático**

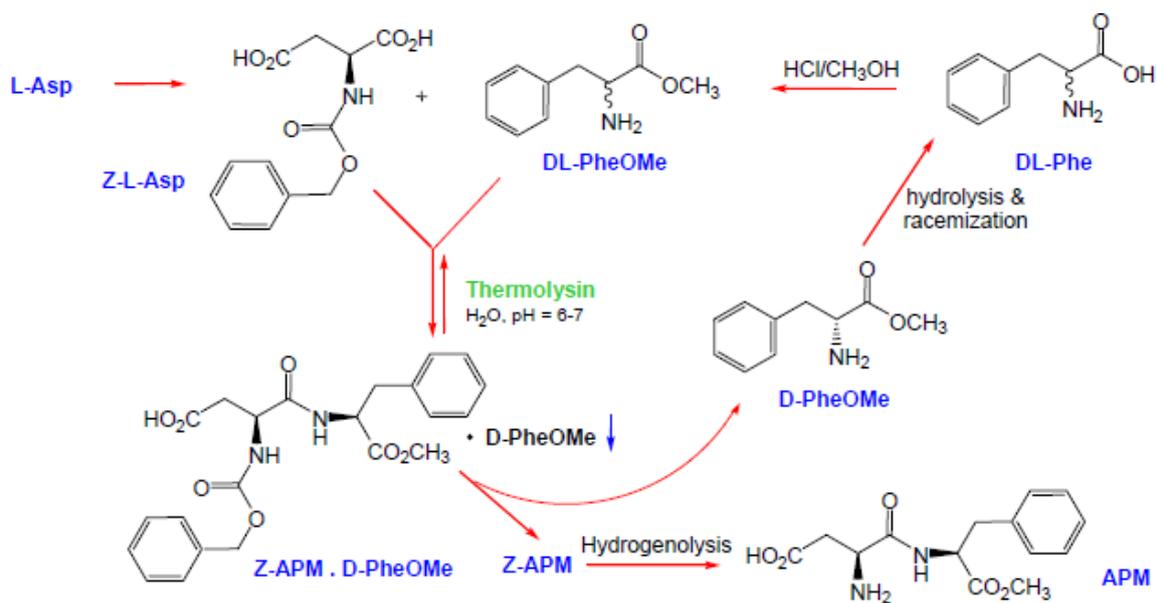


Figura 11- DSM/Tosoh Processo químico enzimático.

Fonte: (SONKE; SCHOEMAKER ,2006)

As vantagens e desvantagens do processo químico enzimático apresentada na Figura 11 acima, são as seguintes:

**Vantagens:** DL-Phe pode ser usado, 100%  $\alpha$ -isômero formado, sem reciclo (apenas racemização de D-Phe), sem cristalização de neutralização

**Desvantagens:** Z-proteção menos barata, enzima requerida.

### (iii) Processo biocatalítico na HSC (Holland sweetener company)

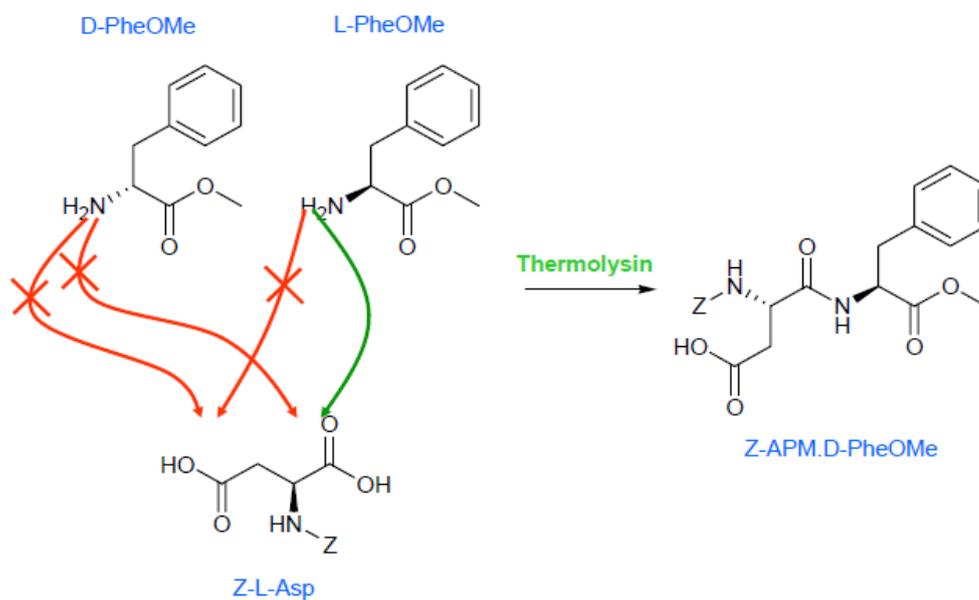


Figura 12- Processo biocatalítico na HSC (Holland sweetener company).

Fonte: (SONKE; SCHOEMAKER ,2006).

As vantagens e desvantagens do processo biocatalítico apresentada na Figura 12 acima, são as seguintes:

**Vantagens:** Sem subprodutos, fácil processamento a jusante (DSP)

**Desvantagens:** Concentração de substrato efetiva baixo, grande quantidade de enzima necessária.

**(iv) Processo de produção do aspartame melhorado**

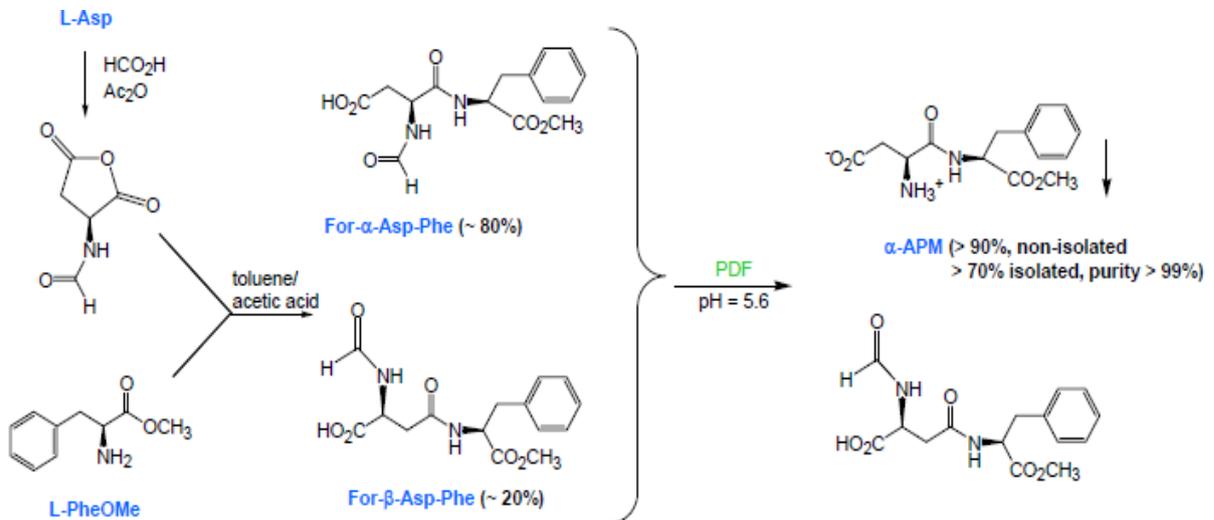


Figura 13- Processo de produção do aspartame melhorado.

Fonte: (SONKE; SCHOEMAKER ,2006).

A Figura 13 apresenta o processo de produção do aspartame melhorado, este processo combina o melhor dos processos (ii) e (iii), na qual não é necessária nenhuma Z-proteção como ocorre no processo HSC. Comparado ao processo (ii): rendimento de APM muito maior, não ocorre a cristalização de neutralização final.

É apresentando nas Figura 14 e Figura 15, o diagrama de blocos do processo HSC, e o fluxograma do processo HSC, respectivamente.

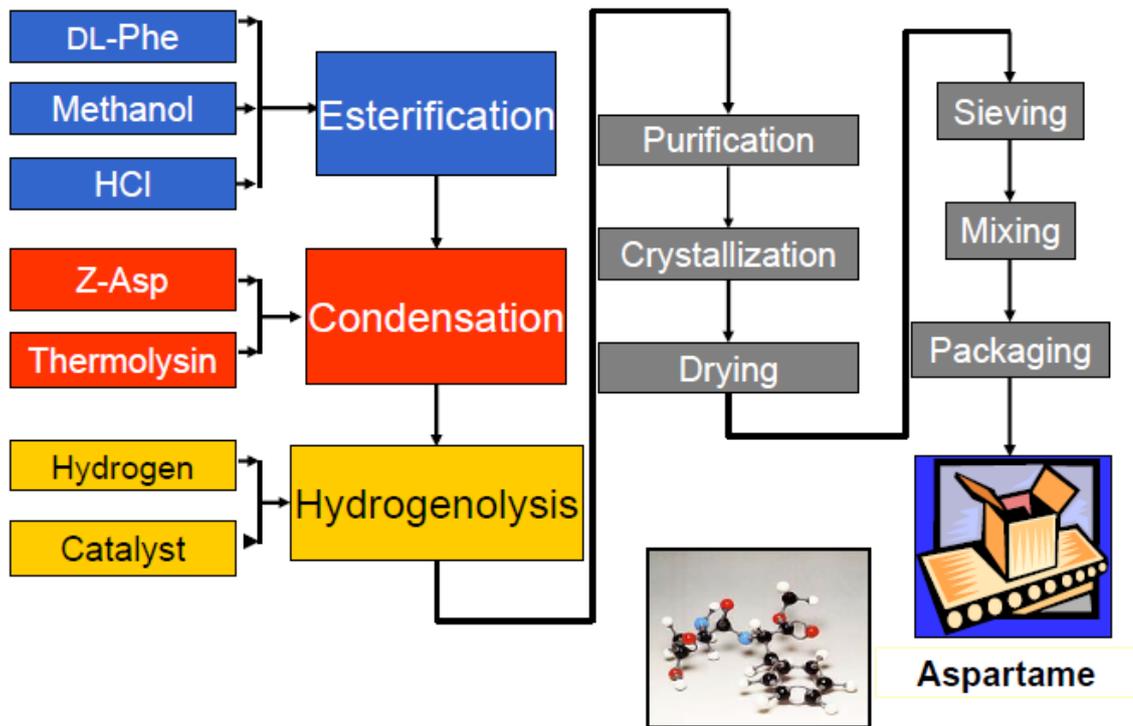


Figura 14– Diagrama de blocos do processo HSC.

Fonte: (SONKE; SCHOEMAKER ,2006).

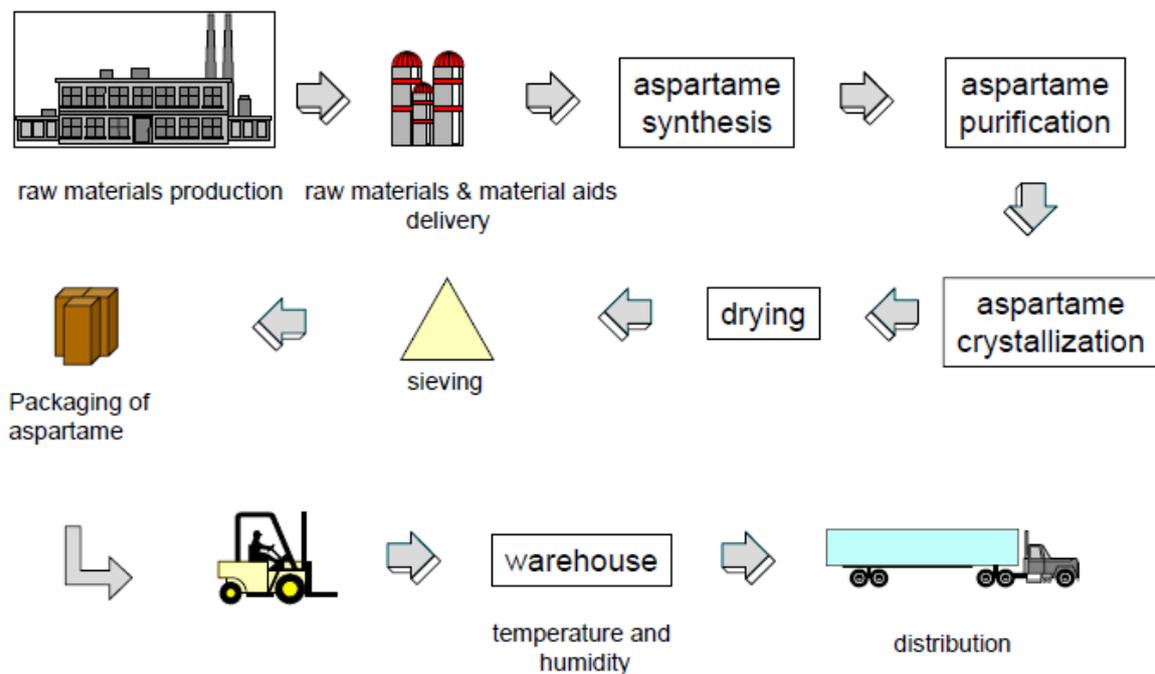


Figura 15– Fluxograma do processo HSC.

Fonte: (SONKE; SCHOEMAKER ,2006).

### 3 - LEGISLAÇÃO BRASILEIRA FRENTE O ASPARTAME

A legislação brasileira sobre aditivos alimentares é positiva, e como tal estabelece que um aditivo somente pode ser utilizado pela indústria alimentícia quando estiver explicitamente definido em legislação específica para a categoria de alimentos correspondente, nas respectivas funções e limites máximos permitidos. O que não constar da legislação, não tem permissão para ser utilizado em alimentos.

Os limites de uso dos edulcorantes em alimentos constam da **Resolução RDC nº 18 de 2008**. Vale ressaltar que os limites máximos dos aditivos alimentares têm por base, dentre outros dados científicos, o parâmetro toxicológico da ingestão diária aceitável definida pelo JECFA e os dados de dieta alimentar fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, correspondentes aos alimentos em que o aditivo está autorizado. O aspartame também tem uso autorizado como realçador de sabor para: gomas de mascar, limite de 0,25 g/100 g - **Resolução nº 387/1999**; cremes vegetais e margarinas, limite de 0,075 g/100g - **Resolução RDC nº 23/2005**; e bebidas à base de soja prontas para o consumo, limite de 0,03 g/100 g - **Resolução RDC nº 25/2005**. (ANVISA, 2006)

O aspartame vem sendo objeto de extensa investigação por vários anos, incluindo estudos experimentais, pesquisas clínicas, estudos epidemiológicos e de exposição e vigilância pós-mercado. Existe um consenso entre diversos comitês internacionais considerando o aspartame seguro, quando consumido dentro da ingestão diária aceitável.

A Autoridade Europeia de Segurança Alimentar – EFSA – vem sistematicamente reavaliando as evidências científicas e os riscos associados ao aspartame, com acesso a um amplo número de estudos, e também reconfirmou a segurança deste adoçante. Segundo a EFSA, não há qualquer indicação de potencial genotóxico ou carcinogênico associado ao aspartame, bem como não há razão para revisar sua IDA previamente estabelecida (40mg/kg peso corpóreo). (ANVISA, 2006)

Ao final das discussões junto à CTA, e à luz do conhecimento atual, a Anvisa verificou que não existem razões de base científica para a adoção de uma medida sanitária restritiva em

relação ao uso de aspartame em alimentos.

Contudo, a Anvisa permanece acompanhando as discussões científicas sobre o tema, a fim de pautar suas ações nos interesses da saúde pública.

#### 4 - DESCRIÇÃO DO MÉTODO SINTÉTICO DE PRODUÇÃO DO ASPARTAME

Ajinomoto desenvolveu um método sintético para a produção do aspartame representado na Figura 16. Neste método, a fenilalanina é modificada por uma reação com o metanol e depois combinada com um ácido aspártico ligeiramente modificado que posteriormente forma o aspartame. (MCNEIL *et al.* 2013)

#### Fermentação

A fermentação direta produz os aminoácidos iniciais necessários para a fabricação de aspartame. Neste processo, tipos específicos de bactérias que têm a capacidade de produzir certos aminoácidos são aumentados em grandes quantidades. Ao longo de cerca de três dias, os aminoácidos são colhidos e as bactérias são destruídas.

Para iniciar o processo de fermentação, uma amostra de uma cultura pura de bactéria é colocada em um tubo de ensaio contendo os nutrientes necessários para o seu crescimento. Após esta inoculação inicial, as bactérias começam a se multiplicar. Quando sua população é grande o suficiente, eles são transferidos para um tanque de fermentação. As estirpes bacterianas de aspartame usadas para produzir ácido L-aspártico e L-fenilalanina são *B. flavum* e *C. glutamicum*, respectivamente.

O tanque de fermentação proporciona um ambiente ideal para o crescimento de mais bactérias. Está preenchido com os materiais que as bactérias precisam para prosperar, incluindo água morna e alimentos com carboidratos como melaço de cana, glicose ou sacarose. Ele também possui fontes de carbono como ácido acético, álcoois ou hidrocarbonetos, e fontes de nitrogênio, como amônia líquida ou ureia. Estes são necessários para que as bactérias sintetizem grandes quantidades do aminoácido desejado. Outros fatores de crescimento, como vitaminas, aminoácidos e nutrientes menores, completam o conteúdo do tanque de fermentação. O tanque de fermentação está equipado com um misturador, que mantém o meio de crescimento em movimento, e uma bomba, que fornece ar comprimido. Quando estiver presente um crescimento bacteriano suficiente, o conteúdo do tanque de fermentação é bombeado para o tanque de fermentação.

O tanque de fermentação é essencialmente uma versão maior do tanque de fermentação. É preenchido com a mesma mídia de crescimento encontrada no tanque de fermentação e fornece um ambiente perfeito para o crescimento bacteriano. Aqui, as bactérias podem crescer e produzir grandes quantidades de aminoácidos. Como o controle do pH é essencial para um crescimento ótimo, e água de amônia é adicionada ao tanque, conforme necessário.

Quando houver aminoácido suficiente, o conteúdo do tanque de fermentação é transferido para que o isolamento possa começar. Este processo começa com um separador centrífugo, que isola uma grande porção de aminoácidos bacterianos. O aminoácido desejado é ainda segregado e purificado numa coluna de permuta iônica. A partir desta coluna, os aminoácidos são bombeados para um tanque de cristalização e depois para um separador de cristal. Eles são então secos e preparados para a fase de síntese da produção de aspartame.

## **Síntese**

Os aminoácidos obtidos do processo de fermentação são primeiramente modificados para produção do aspartame. A fenilalanina e o éster metílico (metanol), são acoplados quimicamente, resultando num composto denominado éster metílico de L-fenilalanina. O ácido

também é modificado formando o ácido N-formil-L-aspartico anidrido de modo a proteger a molécula dos efeitos de outras reações, utilizando formil como grupo protetor (MEINDERSMA; VERGOSSEU, 1996).

Depois que os aminoácidos são modificados, esses são bombeados para um tanque do reator, onde são misturados à uma temperatura ambiente durante 24 horas. A temperatura do aspartame é então aumentada para aproximadamente 149° F (65° C) e mantida por mais 24 horas. A reação é então resfriada à temperatura ambiente. É diluído com um solvente apropriado, e ajustado pH para um valor de 5,5 a 6 com a adição de hidróxido de sódio (NaOH) e depois resfriado a 0° F (-17,78° C), causando a cristalização. Os cristais são um intermediário do aspartame que deve ser modificado posteriormente.

## **Purificação**

O intermediário é convertido em aspartame fazendo-o reagir com HCl, num processo chamado de purificação, com o objetivo de remover grupos formil que foram utilizados para proteger a molécula. Esta reação é realizada em um grande tanque preenchido com uma solução ácida aquosa, um catalisador de metal paládio e hidrogênio. É completamente misturado e permitido reagir por cerca de 12 horas.

O catalisador de metal é removido por filtração e o solvente é destilado, deixando um resíduo sólido. Este resíduo é purificado por dissolução em uma solução aquosa de etanol e recristalizado. Estes cristais são filtrados e secos para fornecer o aspartame acabado em pó.

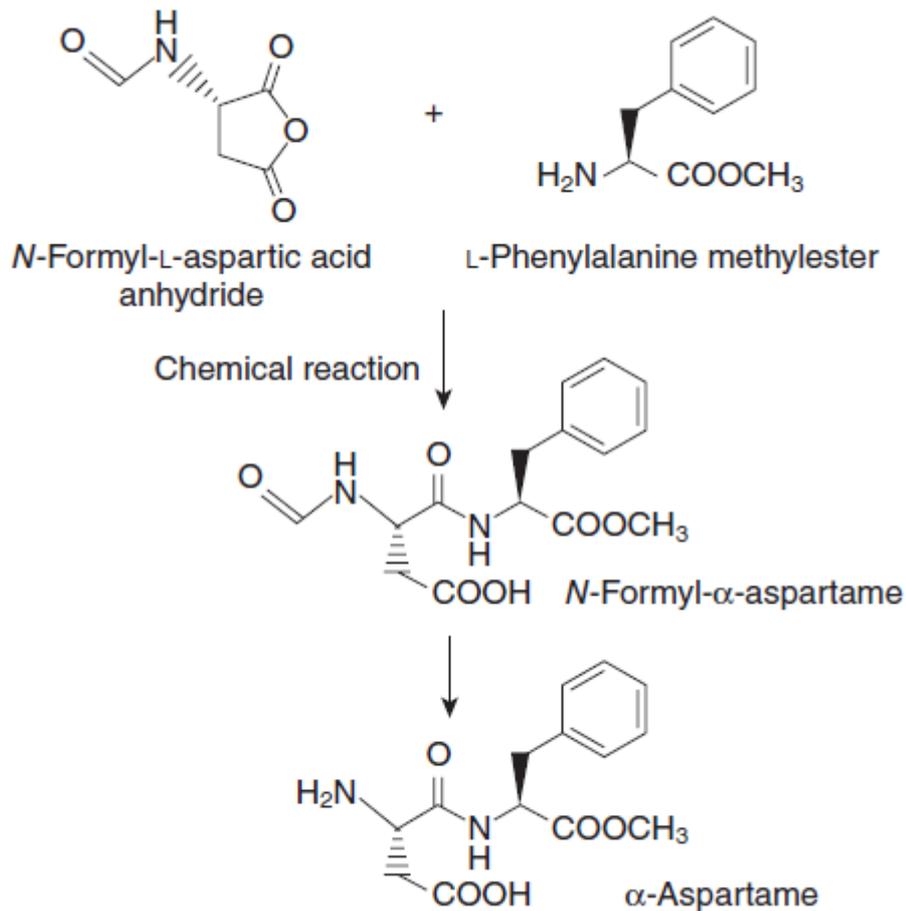


Figura 16– Produção química do  $\alpha$ -aspartame.

Fonte: (MCNEIL *et al.*, 2013).

## ANÁLISE:

NutraSweet/Ajinomoto desenvolveram um processo “Formil” para produção de aspartame, neste método, o ácido *N*-formil-L-aspartico anidrido protegido é condensado com éster metílico de L-fenilalanina para obter o aspartame *N*-protegido, seguido posteriormente pela desproteção. Deve-se observar que este método possui alguns subprodutos indesejáveis como *N*-formil- $\beta$ -aspartame, o qual tem um gosto amargo (MCNEIL *et al.*, 2013).

Neste método são utilizados como matéria prima o ácido N-formil-L-aspártico, descrito segundo a U.S. Patent No. 4,789,757, quantitativamente formada por ácido L-aspártico com agitação térmica e formamida, uma amida derivada do ácido fórmico, numa quantidade de 5 vezes molar, segundo a reação abaixo:

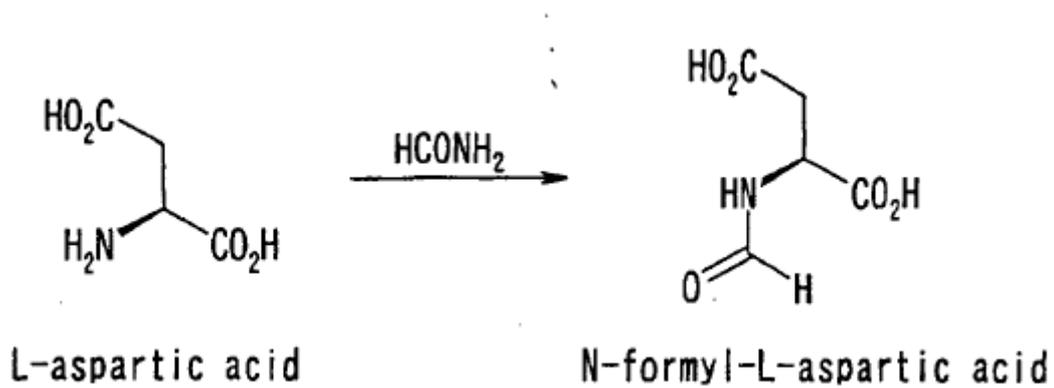


Figura 17- Síntese do ácido N-formil-L-aspártico.

Fonte:( KAWAHARA *et al.* 2014).

É utilizado também éster metílico de L-fenilalanina obtido a partir da modificação da L-fenilalanina com metanol, num processo de esterificação. Hidróxido de sódio (NaOH), para adequação do pH, HCl para remoção do grupo protetor, catalizador de metal paládio e hidrogênio.

Para o processo de cristalização será utilizado como solvente o etanol.

## ESTUDO DE CASO:

Considerando uma produção hipotética de 3.000 toneladas por ano de aspartame, será feito um balanço de massa, partir do processo de síntese, para o cálculo da quantidade de matéria prima e equipamentos, bem como os custos deste processo, considerando uma conversão de 65%, um valor coerente segundo KAWAHARA et al. (2014).

Primeiramente N-formil-L-aspartico anidrido e éster metílico de L-fenilalanina são feitos reagir em uma razão molar 1:1.

Tabela 4 – Massa molar e custo por quilograma do aspartame, ácido N-formil-L-aspartico anidrido e éster metílico de L-fenilalanina.

	Massa molar (g/mol)	Custo médio por quilograma (US\$)
Aspartame	294,30	18,00
Ácido N-formil-L-aspartico anidrido	157,13	5,00
Éster metílico de L-fenilalanina	215,67	5,00

Fonte: Própria (2017).

**Nota:** O valor obtido para o aspartame foi retirado do site FoodNavigatorUSA.

Cálculo de Ácido N-formil-L-aspartico anidrido e éster metílico de L-fenilalanina para 3.000 toneladas por ano e conversão de 65%:

1- Massa de Ácido N-formil-L-aspartico anidrido:

$$\frac{3.000 \text{ toneladas de Aspartame}}{\text{ano}} \times \frac{157,125 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ de ácido N-formil-L-aspartico anidrido}}{294,3 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ de Aspartame}}$$

$$= \frac{1.601,682 \text{ toneladas de ácido N-formil-L-aspartico anidrido}}{\text{ano}} \times \frac{1}{0,65} =$$

**∴ 2.464,13 toneladas de Ácido N-formil-L-aspartico anidrido por ano.**

2- Massa de Éster metílico de L-fenilalanina:

$$\frac{3.000 \text{ toneladas de Aspartame}}{\text{ano}} \times \frac{215,667 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ de Éster metílico de L-fenilalanina}}{294,3 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ de Aspartame}}$$

$$= \frac{2.198,44 \text{ toneladas de Éster metílico de L-fenilalanina}}{\text{ano}} \times \frac{1}{0,65} =$$

**∴ 3.382,22 toneladas de Éster metílico de L-fenilalanina por ano**

Como a reação ocorre em solução, será considerado uma concentração inicial de 10 mols/L para o Ácido N-formil-L-aspartico anidrido e 10 mols/L para éster metílico de L-fenilalanina. Essa concentração foi baseada em KAWAHARA *et al.* (2014) que diz:” A concentração de Ácido N-formil-L-aspartico anidrido na solução aquosa é de preferência de 2,7 a 27 mols / L, mais preferencialmente de 3,5 a 17 mols / L. Quando a concentração de Ácido N-formil-L-aspartico anidrido na solução apresenta 3,5 a 17 mols / L, a reação de condensação da enzima prossegue a uma conversão elevada, pelo que o rendimento de F-APM (aspartame) em relação a Ácido N-formil-L-aspartico anidrido pode ser de 50% ou mais, de preferência 60% ou mais”.

Assim, Para o cálculo foram considerados os seguintes tempos: **1-** 24 horas – tempo de mistura da solução; **2-** 24 horas – tempo após aumento da temperatura da solução; **3-** 12 horas – tempo utilizado para o processo de purificação; **4-** (6+3) horas – tempo de lavagem dos equipamentos. O que resulta em um tempo de processo de 69 horas.

Serão necessárias 2.464,17 toneladas de Ácido N-formil-L-aspartico anidrido por ano, para produzir 3.000 toneladas por ano de aspartame. Considerando o processo de produção com um tempo de duração de 69 horas, serão realizados aproximadamente 127 lotes, o que representa 19, 4 toneladas de Ácido N-formil-L-aspartico anidrido por lote.

3- Cálculo da solução de Ácido N-formil-L-aspartico anidrido

$$\frac{19,4 \text{ tonelada}}{\text{lote}} \times \frac{L}{10 \text{ mols}} \times \frac{1 \text{ mol}}{157,125 \text{ g}} \times \frac{10^6 \text{ g}}{1 \text{ tonelada}} = \frac{12346,85 \text{ L}}{\text{lote}}$$

**∴ 12.346,85 L de Ácido N-formil-L-aspartico anidrido por lote**

Para o éster metílico de L-fenilalanina, serão necessárias 3382,22 toneladas por ano para produzir 3000 toneladas por ano de aspartame, o que representa 26,63 toneladas de éster metílico de L-fenilalanina por lote.

$$\frac{26,63 \text{ toneladas}}{\text{lote}} \times \frac{L}{10 \text{ mols}} \times \frac{1 \text{ mol}}{215,667 \text{ g}} \times \frac{10^6 \text{ g}}{1 \text{ tonelada}} = 12347,74 \text{ L}$$

**∴ 12.347,74 L de éster metílico de L-fenilalanina por lote**

### Hidróxido de sódio

A solução será ajustada utilizando uma quantidade suficiente de solução aquosa de hidróxido de Sódio 15% em peso, para um pH de aproximadamente 5,8.

Custo (US\$) = 500,00 a 600,00/ tonelada

Fonte: (Alibaba; Aliexpress).

### Catalizador

O catalizador utilizado será um catalizador de metal paládio, numa quantidade de 1% em peso (SCAROS; PRAKASH, 2002), o que representa aproximadamente 246,95 quilos de catalizador por lote.

Custo (US\$) = 0,333/ quilograma

Fonte: (Alibaba; Aliexpress).

## **Etanol**

Considerando que a solução, durante o processo de cristalização estará a uma temperatura de 0 ° F, será utilizado como solvente o etanol com 50% em peso o que equivale a um volume de aproximadamente 24.694, 60 L de etanol por lote, valor coerente segundo gráfico apresentado na Figura 18.

Custo (US\$) = 1,00 a 3,00/litro, considerando etanol de alta qualidade 95% de pureza

Fonte: (Alibaba; Aliexpress).

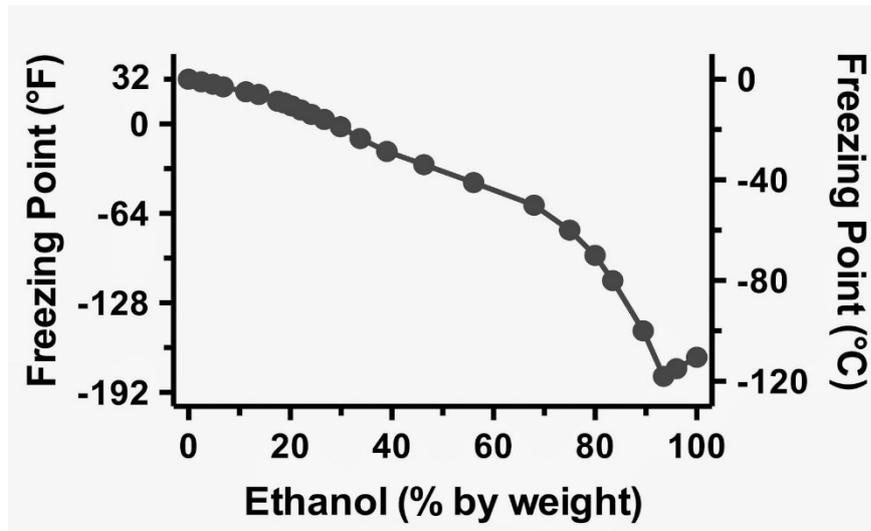


Figura 18- Ponto de fusão, solução % em peso de etanol.

Fonte: (THEMADSCIENCEBLOG, 2014).

## SELEÇÃO DE EQUIPAMENTOS

Aqui será apresentado os principais equipamentos utilizados no processo de síntese do aspartame, como pode ser visto na Figura 18, e os seus respectivos custos aproximados.

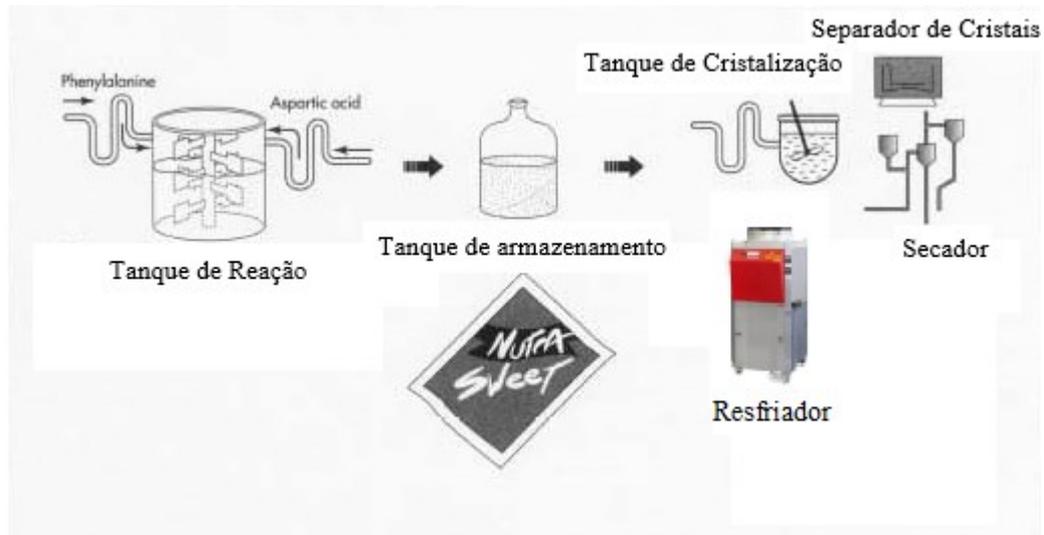


Figura 19- Sequência Processo industrial de produção do aspartame.

Fonte: (NUTRASWEET).

### Reator Tanque de mistura

Os aminoácidos modificados são bombeados para o tanque. Aqui eles são colocados para reagir a temperatura ambiente, depois a solução é aquecida e resfriada. Esses recipientes de mistura são tipicamente de aço inoxidável isolados.

Como o volume da solução inicial é de aproximadamente 24.694,60 litros, o tanque de mistura deverá ter um volume maior do que este valor.

Tanque inox 316l de 30000 litros: custo (US\$) = 38.000,00

Tanque inox 304 de 50000 litros: custo (US\$) = 48.000,00

Fonte: (Alibaba; Aliexpress).

## **Tanque de Armazenamento**

Os tanques de armazenamento são utilizados para armazenagem da matéria prima inicial, como os aminoácidos modificados e o etanol utilizado para o processo de secagem.

Tanque de armazenamento inox 30.000 litros: custo (US\$) = 5.000,00

Tanque de armazenamento aço inox 15.000 litros: custo (US\$) = 3.000,00

Fonte: (Alibaba; Aliexpress).

## **Motor Agitador Elétrico**

Os tanques de reação utilizados são tanques de mistura que necessitam de agitadores. Aqui serão utilizados motores de 1,5 HP, considerando um tanque de mistura de 30.000 litros.

Motor Agitador Elétrico 1,5 HP: custo (US\$) = 400,00

Fonte: (Alibaba; Aliexpress).

## **Resfriador/Aquecedor**

Utilizado no processo de cristalização, pode ser utilizado um refrigerador compacto de água ou glicol com permutador de calor integrado, bomba e tanque de água. Esta unidade de resfriamento foi projetada para refrigerar ou aquecer mídia externa, com acumulação de água gelada (ou quente) ou glicol. O poder de resfriamento é 45.500 W (61.8 HP).

Uma boa proposta para um volume de 50.000 litros, seria um refrigerador de glicol **CWCH-MCK361**, em venda no site Alemão *Czechminibreweries*. Como possui um poder de resfriamento de 45500 W, para um volume de 50.000 L, o calor necessário para variar uma temperatura de 20 a 0 ° C é 442 kj, o que despense do equipamento um tempo de 10 segundos.

Resfriador de glicol **CWCH-MCK361**: custo (US\$) = 23.500,00

Fonte: (czechminibreweries website).

### **Tanque de cristalização**

Aqui ocorre o processo de cristalização utilizando como solvente etanol. Usualmente tanques com circulação forçada contínua, aço inox.

Tanque de cristalização do tipo rotativo: custo (US\$) = 9.000,00 a 15.000,00

Fonte: (Alibaba; Aliexpress)

### **Filtro**

Utilizado para separação dos cristais, podendo ser do tipo chapa e amarração de ferro fundido ou do tipo filtro de vácuo rotativo contínuo de aço inox.

Filtro de vácuo rotativo: custos (US\$) = 9.000,00 a 30.000,00

Fonte: (Alibaba; Aliexpress)

## Secador

Nessa etapa final, após separação e filtração dos cristais, eles são secos para obtenção do produto final, o aspartame em forma de pó.

Secadores rotativos contínuos, com calor utilizando ar quente e aço carbono são comumente utilizados. Os custos incluem o motor, a unidade, o ventilador, o coletor de pó e a alimentador de sólidos.

Secador do tipo rotativo contínuo: custo (US\$) = 20.000,00 a 30.0000,00

Fonte: (Alibaba; Aliexpress)

**Nota:** Os custos são valores aproximados médios obtidos de sites de vendas pela internet, como Alibaba e Aliexpress. Esses valores são variáveis dependendo do fornecedor.

**Custo médio dos materiais e equipamentos para produção de 3.000 toneladas de aspartame por ano a partir da etapa de síntese apresentado nas Tabelas 5 e 6.**

Tabela 5 - Custo médio dos materiais utilizados no processo de produção de 3000 toneladas de aspartame considerando o primeiro ano de produção.

<b>Materiais</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Custo médio (US\$)</b>	<b>Total (US\$)</b>
Ácido N-formil-L-aspártico anidrido	2.464,13 toneladas	5,00/quilograma	12.320.630,00
Éster metílico de L-fenilalanina	3.382,22 toneladas	5,00/quilograma	16.911.080,00
Catalizador de metal paládio	31.362,65 quilos	0,333/quilograma	10.443,76
Etanol	1.881.728,52 litros	2,00/ litro	3.763.457,04
		<b>Total (US\$)</b>	<b>33.005.610,80</b>

Tabela 6 - Custo médio dos materiais utilizados no processo de produção de 3000 toneladas de aspartame considerando o primeiro ano de produção.

<b>Equipamentos</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Custo médio (US\$)</b>	<b>Total (US\$)</b>
Reator tanque de mistura	1	38.000,00	38.000,00
Tanque de armazenamento	2	3.000,00	6.000,00
Motor agitador Elétrico	2	400,00	800,00
Tanque de armazenamento	1	5.000,00	5.000,00
Resfriador/Aquecedor	1	23.500,00	23.500,00

Tanque de cristalização	1	12.000,00	12.000,00
Filtro	1	19.500,00	19.500,00
Secador	1	25.000,00	25.000,00
<b>Total (US\$)</b>			<b>110.300,00</b>

Portanto, no primeiro ano de produção, os custos dos equipamentos utilizados para a produção de 3.000 toneladas por ano com 127 lotes de produção, é aproximadamente 33 milhões de dólares. E o custo dos equipamentos é de 110.300,00 dólares.

Considerando que o etanol representa 11% do custo total dos materiais utilizados, pode-se pensar sobre a recuperação desse solvente através do processo de destilação na etapa de cristalização com o objetivo principal de redução dos custos. Com relação a recuperação de algumas matérias primas, pode-se considerar também a recuperação do catalizador.

## 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde que James Schetler descobriu o sabor doce do aspartame em 1965, o aditivo alimentar tornou-se um dos alimentos mais controversos e consumidos em todo o mundo. Já no início, o aspartame foi obrigado a entrar em uma controvertida indústria de edulcorantes de baixa caloria que já avia sendo manchada por preocupações em torno da segurança da sacarina. Hoje sabe-se, após diversos estudos que o aspartame é um produto seguro, consumido dentro dos padrões estabelecidos pela ANVISA (Brasil) e FDA (Estados Unidos), por exemplo. Atualmente, os principais edulcorantes utilizados no mundo são, a sacarina, o ciclomato e o aspartame, também conhecidos como adoçantes de primeira geração. Enquanto o aspartame é talvez um dos melhores disponíveis, os cientistas estão procurando por novas formas de fazer com que esses adoçantes tenha o sabor tão parecido quanto o açúcar. Nesse sentido seus estudos são focados basicamente em três áreas, são elas: a descoberta de novos derivados, a mistura de edulcorantes

e o aumento da eficiência do aspartame. Por esse motivo surgem sempre novas rotas de produção, com alternativas mais econômicas e um produto, não só mais saboroso, mais de maior qualidade. A maior parte dos trabalhos em cima dos derivados químicos do aspartame, centrou-se na busca de compostos que se encaixem nos receptores do paladar melhor do que o aspartame tradicional. Usando o aspartame como modelo, os pesquisadores acreditam que serão capazes de melhorar várias características, fazendo pequenas modificações. Por exemplo, eles descobriram que, quando o ácido L-aspartico sozinho é modificado de uma certa maneira, ele fornece produtos com sabor doce. O aspartame provavelmente se concentrará nesses tipos de derivativos. Outra área de pesquisa centra-se na melhoria da estabilidade ao calor do aspartame. Usando a tecnologia de encapsulamento, o derivado desenvolvido, pode ser usado em produtos cozidos e misturas de cozimento. Os resultados dos testes iniciais são positivos, e a aprovação da FDA (Estados Unidos) foi concedida para aplicações de padaria. Existem ainda pesquisas onde os cientistas combinam dois ou três edulcorantes em um esforço para tornar o produto mais saboroso. Neste trabalho, foi possível obter uma visão mais clara do processo de produção do aspartame, conhecendo também melhor o produto podendo considera-lo o principal edulcorante no mercado, e com grandes potenciais na indústria alimentícia em todo o mundo.

**Sugestões de Trabalhos Futuros:** Um estudo interessante que pode ser proposto para esse trabalho é estimar o custo de investimento (CAPEX) e custo de operação (OPEX) do ano atual de análise, para a produção anual de aspartame (selecionar a quantidade e a pureza). Fazer também um estudo sobre o retorno do capital investido e uma análise sobre a recuperação de algumas matérias primas como etanol e catalisador por exemplo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIBABA GROUP HOLDING LIMITED – Disponível em: <  
<https://www.alibaba.com/showroom/alibaba-official-website.html> > Acesso em 26 de novembro de 2017.
- ALIEXPRESS – Disponível em: < <https://best.aliexpress.com/pt.htm>> Acesso em 26 de novembro de 2017.
- ANVISA. Ministério da Saúde. Considerações sobre o Uso do Edulcorante Aspartame em Alimentos. Informe Técnico nº 17, de 19 de janeiro de 2006. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/>> Acesso em 12 de agosto de 2017.
- BENASSI, V. T.; WATANABE, E; LOBO, A. R. Produtos de panificação com conteúdo calórico reduzido. Curitiba: Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos-CEPPA, v. 19, n. 2, p. 225-242, 2001. Disponível em < <http://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/1235/1035> > Acesso em 5 abril de 2017.
- BLANCH W. H.; CLARK D. S., BIOCHEMICAL ENGINEERING, University of California at Berkeley, California, 2 ed, p. 671-682, 1996.
- BUTCHKO, H. H., et al. Aspartame: Review of Safety, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2002. Disponível em: < [http://seriecientifica.org/sites/default/files/scl\\_enc\\_butchko.pdf](http://seriecientifica.org/sites/default/files/scl_enc_butchko.pdf)> Acesso em: 5 de abril de 2017.
- CAMPOS, V. M. C. Fabricação de doces diet, ou dietéticos, em pedaços e em calda. Resposta Técnica. Minas Gerais: Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, p. 1- 4, 2006. Disponível em: < <http://www.revistapindorama.ifba.edu.br/files/Artigo%20Aspartame%20IFMA.pdf> > Acesso em: 5 de abril de 2017.
- CARDELLO, H. M. A. B.; SILVA, M. A. A. P.; DAMÁSIO, M. H. Avaliação tempointensidade de doçura e amargor de aspartame e ciclamato/sacarina em equivalência à sacarose em altas concentrações. Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos-CEPPA, v. 19, n. 2, p. 391-410, jul./dez. 2001. Disponível

em < <http://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/1245/1045> > Acesso em: 19 junho 2017.

CZECHMINIBREWERIES - CZECH BREWERY SYSTEM - Disponível em < <http://eshop.czechminibreweries.com/pt/product/clp-3000m-1440b/> > Acesso em 5 de dezembro de 2017.

FREITAS, M. A. S.; ARAÚJO, A. B. Revista Eletrônica Multidisciplinar Pindorama do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia – IFBA N° 01 – Ano I – agosto/2010. Disponível em: < <http://www.revistapindorama.ifba.edu.br/files/Artigo%20Aspartame%20IFMA.pdf> > Acesso em :19 junho 2017.

FOODNAVIGATORUSA- News and analysis on Food & Beverage Development – North America; “Production costs push up Ajinomoto aspartame price”. Disponível em: < [https://www.foodnavigator-usa.com/Article/2008/09/16/Production-costs-push-up-Ajinomoto-aspartame-price?utm\\_source=copyright&utm\\_medium=OnSite&utm\\_campaign=copyright](https://www.foodnavigator-usa.com/Article/2008/09/16/Production-costs-push-up-Ajinomoto-aspartame-price?utm_source=copyright&utm_medium=OnSite&utm_campaign=copyright) > Acesso em 8 de dezembro de 2017.

GESTIS Substance Database – IFA – Institute for Occupational Safety and Health of the German Accident Insurance. Disponível em: < [http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis\\_en/012910.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/012910.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0) > Acesso em 8 de dezembro de 2017.

KAWAHARA, S.; KAWASAKI-SHI, K.; TAKEMOTO, T.; KAWASAKI-SHI, K.; FUJITA, S.; KAWASAKI-SHI, K.; OHNO, A.; KAWASAKI-SHI, K. Process for Producing N-Formylamino Acid and Utilization Thereof, European Patent Application, Int Cl.7: C07C 231/02, C07C 231/08, 22 p., 14 de janeiro de 2014.

LOURENÇO, S.; A REVISTA DA ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DOS NUTRICIONISTAS, n. 5, maio 2005. Disponível em: < <http://www.apn.org.pt/documentos/revistas/Doc5.pdf> > Acesso em: 12 de agosto de 2017.

MATTOS, R. Adoçantes artificiais: O aspartame. Disponível em:< <http://www.diabetes.org.br/publico/> > Acesso em: 5 de abril de 2017.

- MCNEIL B.; ARCHER D.; GIAVASIS L.; HARVEY L. Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nuraceuticals, Oxford Cambridge Philadelphia New Delhi, p. 397-399, 2013.
- MEINDERSMA W. G.; VERGOSEN F. H. P.; Process for Recovery of Raw Materials in The Aspartame Preparation Process; United States Patent; US5501797, Mar. 26, 1996.
- NELSON, D. L.; COX M. L.; PRINCÍPIOS DE BIOQUIMICA, 3 ed. São Paulo, sarvier 2002.
- NUTRASWEET – American Nutrient Company – Disponível em < <http://www.nutrasweet.com/> > Acesso em: 10 de out. de 2017.
- REVISTA ELETRÔNIA DE FARMÁCIA, São Pedro- Teresina, Faculdade Santo Agostinho, 2014. Disponível em: < <https://revistas.ufg.br/REF/article/viewFile/31258/18133> > Acesso em 19 de junho de 2017.
- REVISTA FOOD INGREDIENTS BRASIL (FIB), São Paulo, editora INSUMOS LTDA, 2014, n. 31. Disponível em: < [http://revista-fi.com.br/upload\\_arquivos/201606/2016060749312001464891018.pdf](http://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060749312001464891018.pdf) > Acesso em 19 de junho de 2017.
- ROJERO, M. M.; TIRAPEGUI J.; REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, São Paulo, vol. 4, n. 4, out./dez., 2008. Disponível em < <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v44n4/v44n4a04.pdf> > acesso em 5 de abril de 2017.
- SCAROS M. G.; PRAKASH I.; Catalyst modification to enhance neotame production European Patent Application, PCT/US 2001/046956, 29 AGO. 2002. Disponível em < <https://www.google.ch/patents/WO2002065853A2?cl=en> > Acesso em 5 de dezembro de 2017.
- SONKE, T.; SCHOEMAKER, H. Industrial Production of Aspartame, Mastercourse “Sweetners”, Univ. of Amsterdam, January 18, 2006, 30p. Disponível em: < <https://esc.fnwi.uva.nl/dws/contextchemie2/file.php?id=2560> > Acesso em: 5 de abril de 2017.
- STEGINK, L. D. The aspartame story: a model for the clinical testing of a food additive. Am. J. Clin. Nutr., v. 46, p. 204-15, 1987.

- THEMADSCIENCEBLOG - Chemistry of Beer, Part II: Freezing Point Depression and Fractional Freezing, 2 de janeiro de 2014. Disponível em: < <http://www.themadscienceblog.com/2014/01/chemistry-of-beer-part-ii-freezing.html> > Acesso em 26 de novembro de 2017.
- THOMSON, D.M.H.; TUNALEY, A. A reappraisal of the use of multidimensional scaling to investigate the sensory characteristics of sweeteners. *J. Sensory Stud.*, v. 2, p. 215-230, 1987.
- TORLONI, M. R.; NAKAMURA, M. U.; MEGALE, A.; SANCHEZ, V. H. S.; MANO, C.; FUSARO, A. S.; MATTAR, R. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* v. 29, n. 5, Rio de Janeiro, maio, 2007. p. 267-75. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v29n5/a08v29n5.pdf> > Acesso em: 5 de abril de 2017.
- TOZETTO, A. Controle de qualidade de edulcorantes em adoçantes comerciais via espectrometria e métodos de calibração multivariada. 2005. 144 p. Revista Eletrônica Multidisciplinar Pindorama do Instituto Federal da Bahia – IFBA Nº 01 Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2005. p. 29. Disponível em: < [http://www.uepg.br/mestrados/mescta/Dissertacoes/TOZETTO,\\_A.pdf](http://www.uepg.br/mestrados/mescta/Dissertacoes/TOZETTO,_A.pdf) > Acesso em: 12 de agosto de 2017.
- WASHINGTON POST, Washington-EUA, 22 setembro 1982. Disponível em: < [http://www.mpwhi.com/market\\_sweet\\_on\\_aspartame.htm](http://www.mpwhi.com/market_sweet_on_aspartame.htm) > Acesso em 19 junho 2017.