

Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica

Development of a method for vitamin C analysis in food using high performance liquid chromatography and ion exclusion

Jeane Santos da ROSA^{1,2*}, Ronoel Luiz de Oliveira GODOY^{1,2}, João OIANO NETO¹, Rodrigo da Silveira CAMPOS^{1,2}, Virginia Martins da MATTA¹, Cyntia Abreu FREIRE³, Aline Soares da SILVA³, Rafael Santos de SOUZA⁴

Resumo

A vitamina C é um nutriente extremamente importante para a fisiologia humana. No Brasil o consumo de vitamina C sob a forma de concentrados vitamínicos ainda é bastante restrito devido aos altos preços, restando para a maioria da população o consumo via alimentos como frutas e vegetais. A dosagem de vitamina C em alimentos tem, então, um papel crucial no que diz respeito aos estudos pós-colheita para a conservação e a minimização das perdas deste nutriente tão sensível. Neste estudo, é apresentado um método para análise de vitamina C por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna de troca iônica forma hidrogênio, que demonstrou ser mais eficiente do que os métodos usuais por coluna de fase reversa (C18) para matrizes complexas e baixos teores do analito. A reprodução dos perfis cromatográficos foi em nível de linha de base com picos de pureza espectral comprovada por detector de arranjo de diodos. Esse método também foi avaliado segundo a extração mais adequada para estabilização da vitamina C, e mostrou que a fase móvel (ácido sulfúrico suprapuro® 0,05 M) foi uma solução extratora adequada para a estabilização da vitamina C.

Palavras-chave: ácido ascórbico; ácido deidroascórbico; troca iônica; partição por fase reversa.

Abstract

Vitamin C is an essential nutrient for human physiology. In Brazil, vitamin C supplements are expensive and most of the population obtains vitamin C through its consumption of fruits and vegetables. Therefore, the vitamin C assay in food is crucial in post-harvest studies to conserve and minimize losses of this highly sensitive nutrient. This study proposes a method for analyzing vitamin C by High Performance Liquid Chromatography using a hydrogen type ion exchange column, and demonstrates that it is more efficient than the traditional methods of reverse phase column (C18) for complex matrixes and low levels of this analyte. Chromatograms were baseline resolved and peak purity evaluation showed spectral homogeneity by photo diode array detector. This method was also tested using the best extraction solution to stabilize vitamin C, demonstrating that 0.05 M of superpure sulfuric acid (also the mobile phase) was the most efficient solution for this purpose.

Keywords: ascorbic acid; dehydroascorbic acid; ion exchange; reversed phase partition.

1 Introdução

Em 1912, Casimir Funk formulou uma teoria em que dizia haver uma amina vital para a manutenção da saúde do organismo. Hoje se sabe que as vitaminas são grupos de substâncias heterogêneas constituintes dos alimentos, eficientes em quantidades mínimas e essenciais à vida¹⁴.

A atividade de uma vitamina é medida em termos da remissão de uma lesão que foi provocada pela sua ausência no metabolismo quando uma quantidade da vitamina em questão é ingerida.

A atividade vitamínica do ácido ascórbico é a ação antiescorbútica. O escorbuto é uma doença que pode levar à morte e é causada pela deficiência nutricional de vitamina C. Seus principais sintomas são: o aparecimento de lesões na mucosa

intestinal, hemorragias digestivas, vermelhidão nas gengivas, enfraquecimento dos dentes (redução na ossificação), dores agudas e inchaço nos membros superiores e inferiores além de deficiência no processo de cicatrização e hemorragia capilar⁵

Em 1965 a nomenclatura *L-treo-2-hexenona-1,4-lactona* ou vitamina C foi modificada oficialmente para ácido *L*-ascórbico pela comissão de nomenclatura bioquímica da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)¹⁵. O nome ácido ascórbico designa a atividade antiescorbútica da vitamina C e deriva da antiga forma inglesa da palavra escorbuto (*scorby*).

Os seres humanos fazem parte do grupo de seres vivos que não são capazes de sintetizar vitamina C. Especula-se que estes seres vivos não possuem tal capacidade com a finalidade de aumentar as reservas de glicose, precursor do ácido ascórbico no organismo¹⁵. Devido à ausência da enzima *L*-gulonalactona oxidase, os seres humanos não conseguem transformar a glicose do sangue em ácido ascórbico. A maioria dos mamíferos não primatas possui esta capacidade e também um mecanismo de retorno através do qual o fígado aumenta a síntese de ácido ascórbico em resposta a um "stress" fisiológico²³. Insetos, répteis, alguns pássaros e peixes também não são capazes de sintetizar o ácido ascórbico.

Desta forma, a necessidade de ingestão desta vitamina é vital para a saúde e até mesmo para a sobrevivência do ho-

Recebido para publicação em 20/12/2006

Aceito para publicação em 7/6/2007 (002152)

¹ Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, CEP 23020-470, Rio de Janeiro - RJ, Brasil, E-mail: jeane@ctaa.embrapa.br

² Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Km 7, BR 465, Seropédica - RJ, Brasil

³ CEFET Química de Nilópolis, Rua Lúcio Tavares, 1045, Centro, Nilópolis - RJ, Brasil

⁴ Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Ilha de Fundão, Rio de Janeiro - RJ, Brasil,

*A quem a correspondência deve ser enviada

mem, pois o ácido ascórbico participa de inúmeras atividades fisiológicas. A dose diária média de vitamina C necessária para prevenir o escorbuto é de 46 mg². No Brasil, a Ingestão Diária Recomendada (IDR) é de 60 mg¹. Estes níveis são facilmente atingidos com o consumo de frutas e vegetais frescos, mesmo porque no Brasil o consumo de vitamina C sob forma de concentrados vitamínicos ainda é bastante restrito devido aos altos preços, restando para a maioria da população o consumo via alimentos. Os defensores da ingestão de altos teores de vitamina C, porém, alegam que o escorbuto não é o primeiro sintoma desta deficiência e sim o colapso final, a síndrome pré-morte, e há uma grande diferença entre ausência de escorbuto e saúde completa⁷. Esta polêmica cria dúvidas na comunidade científica até os dias de hoje a respeito de qual seria a melhor IDR para a vitamina C.

A molécula do ácido ascórbico tem um anel γ lactona quase planar com dois centros quirais nas posições 4 e 5 (Figura 1),

determinando dois pares de estereoisômeros: os ácidos *L* e *D* ascórbico (Figura 2a e 2b, respectivamente) e os ácidos *D* e *L* isoascórbicos (Figura 2c e 2d, respectivamente). São epímeros (par de diastêromeros que diferem entre si somente na configuração de um único átomo). Os ácidos *L*-ascórbico

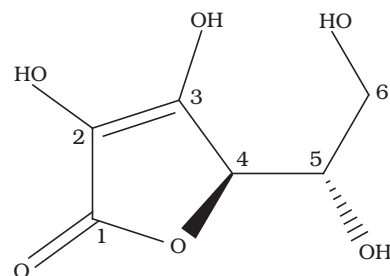
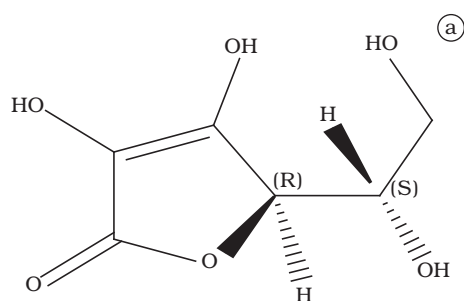
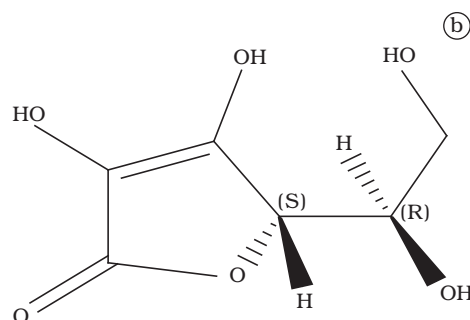


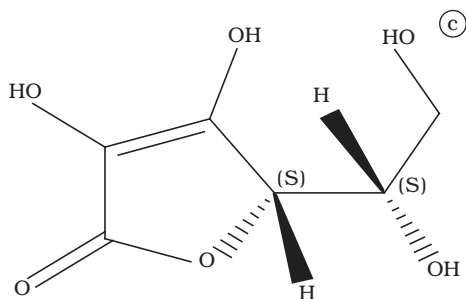
Figura 1. Estrutura da vitamina C.



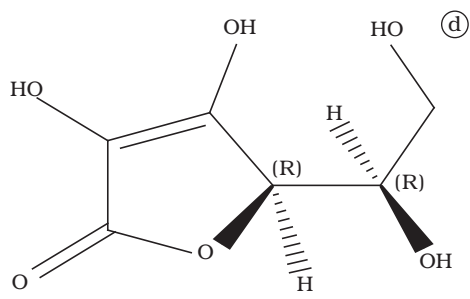
Ácido *L*-ascórbico



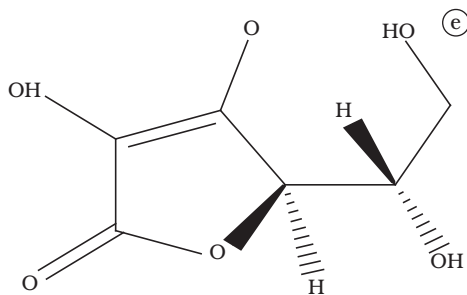
Ácido *D*-ascórbico



Ácido *L*-isoascórbico ou ácido *L*-eritórbico



Ácido *D*-isoascórbico ou ácido *D*-eritórbico



Ascorbato

Figura 2. Isômeros do ácido ascórbico e radical livre ascorbato.

e *D*-isoascórbico (este último possui somente 5% de atividade vitamínica) e os ácidos *D*-ascórbico e *L*-isoascórbico (não possuem atividade vitamínica). A oxidação reversível devido à perda de um átomo de hidrogênio (perda de um elétron) leva ao radical semideidroascórbico ou ascorbato (Figura 2e).

O anel 1,4 lactona estável²¹ deriva de açúcares (hexoses). O hidrogênio ligado à hidroxila no Carbono 3 (Figura 1), por exemplo, é mais ácido ($pK_1 = 4,17$) do que o ácido acético.

A acidez da vitamina C é justificada primeiramente devido à extensão da conjugação da carbonila presente no carbono 1 (Figura 3), aumentando a característica ácida da hidroxila no carbono 3. A hidroxila no carbono 2 faz parte de um enol e sua acidez é pouco maior que a do fenol ($pK_a = 11,57$).

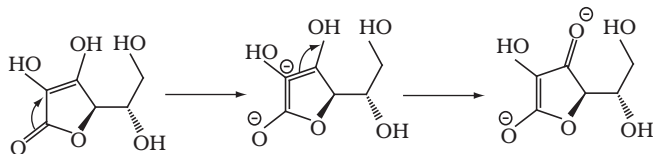


Figura 3. Acidez das hidroxilas na molécula do ácido ascórbico.

O ácido deidroascórbico (DIA) é a forma oxidada do ácido ascórbico (AA) e possui atividade vitamínica idêntica a este, pois no organismo é facilmente reduzido e novamente retido como ácido ascórbico nos tecidos intracelulares¹⁶. A oxidação reversível, que devido à perda de dois elétrons (Figura 4), leva ao ácido *L*-deidroascórbico é a propriedade química mais importante e a base da atividade fisiológica da vitamina C¹⁵. A atividade antioxidante da vitamina C envolve doação de um elétron e a formação do radical livre ascorbato.

O DIA pode ser reduzido a ácido ascórbico in vivo por enzimas ou glutatona, e in vitro por agentes redutores como a homocisteína, ditioneitol (DTT) e bromina. Como é extremamente lábil, pode ser rapidamente hidrolisado ao ácido 2,3-diceto-*L*-gulônico (Figura 4) em pH neutro e 37 °C, através de uma abertura irreversível no anel da lactona⁶. O ácido 2,3-diceto-*L*-gulônico não possui atividade antiescorbútica e a hidrólise é irreversível in vivo.

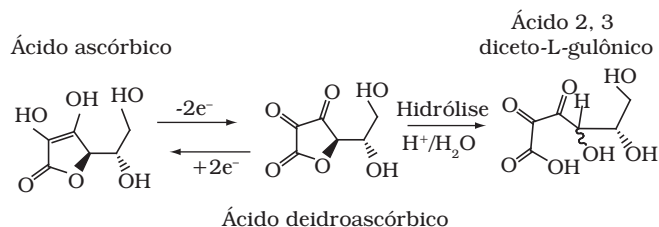


Figura 4. Reação de oxidação do ácido ascórbico a ácido deidroascórbico e de hidrólise deste último ao ácido 2,3 diceto-*L*-gulônico.

O ácido deidroascórbico representa menos de 10% da vitamina C total dos vegetais, tendendo a aumentar com o período de estocagem. Por isso existem muitos trabalhos cujo escopo é dosar os teores de ácido ascórbico e também deidroascórbico²⁵. A separação conjunta de ambas as espécies (DIA

e AA) é dificultada pela sensibilidade de detecção para o DIA que ocorre a 210 nm, aproximadamente. Este comprimento de onda pertence a uma região do espectro UV que possui baixa especificidade (alta energia), desta forma a sensibilidade para a detecção do DIA, que normalmente se apresenta em baixos níveis, é bastante complicada. Além disso, o AA e o DIA também não apresentam resposta conjunta em detecção eletroquímica.

A estabilização do ácido deidroascórbico em solução também requer ótimo controle de pH, pois a hidrólise deste em ácido 2,3 dicetogulônico é muito dependente do pH²⁶. Como em alimentos naturais o ácido deidroascórbico está presente em níveis baixos, a escolha de um método de dosagem de vitamina C total deve considerar o custo/benefício dos resultados obtidos. Esta escolha deve ser feita em nome da obtenção de uma separação cromatográfica eficiente.

O ácido ascórbico é o nutriente mais afetado pelo processamento de frutas e vegetais, por isso sua retenção é usada freqüentemente como indicativo da qualidade nutricional e até mesmo de conservação dos alimentos³. Algumas vezes, até mesmo interações com outras substâncias presentes no alimento contribuem para a diminuição dos níveis de vitamina C. A destruição desta, por exemplo, pode ser catalisada pela lumiflavina, produto de degradação da riboflavina (vitamina B2)⁸, que pode ser induzida pela presença de aminas (pois reações de escurecimento ocorrem com o ácido ascórbico de forma semelhante às que ocorrem com a glicose e outros açúcares) ou ainda pela presença de enzimas como a ácido ascórbico oxidase¹⁷.

A vitamina C também é amplamente usada na indústria de alimentos como antioxidante para aromatizantes e gorduras em geral, para cura de carnes, e até em farinha para melhorar a textura das massas. Sua utilização no pão é bastante importante, principalmente depois da proibição do uso de bromato de potássio¹². O uso do ácido eritórbico ou *D*-isoascórbico vem sendo diminuído na indústria de alimentos com a utilização crescente do ácido ascórbico devido ao valor nutricional deste, e também à queda dos preços com a entrada de indústrias chinesas no mercado, que sintetizam a vitamina C.

A determinação do ácido ascórbico em alimentos é bastante complexa em função dos baixos níveis em que este pode ser encontrado, além da presença de substâncias interferentes da matriz estudada que podem, inclusive, contribuir para a sua degradação. Desta forma, métodos empregados facilmente para misturas multivitamínicas ou alimentos enriquecidos são de difícil aplicação para dosar somente a vitamina C presente naturalmente nos alimentos.

A separação de substâncias que se ionizam utilizando apenas cromatografia de fase reversa é bastante complexa, necessitando de controle rígido de pH para que não haja equilíbrio entre as formas iônica e molecular de uma mesma substância (pH de trabalho igual ao pK_a do analito).

A fase estacionária de uma coluna de troca iônica H^+ é constituída por uma resina de estireno divinilbenzeno em forma de gel e relativamente rígida devido às ligações cruzadas existentes. Esta coluna possui 8% de ligações cruzadas sendo

que, quanto menor o número destas, mais aberta será a estrutura da resina e, portanto, mais permeável para substâncias de maior massa molecular.

A utilização de uma coluna de troca iônica torna a determinação de vitamina C bastante seletiva em função da combinação de técnicas que este tipo de coluna permite, pois na verdade o mecanismo de separação nesta coluna consiste basicamente de exclusão iônica e partição por fase reversa. A força ácida do eluente (H_2SO_4 0,05 M) pode ser ajustada para melhorar a resolução do analito ou excluir interferentes. Desta forma, ácidos orgânicos, em geral, podem ser eluídos em ordem crescente de pKa. A resolução da coluna também pode ser controlada usando-se temperatura (máximo de 65 °C), o que não é recomendado para o ácido ascórbico. A adição de modificadores orgânicos como acetonitrila, que reduzem as interações hidrofóbicas e mantêm a solubilidade do analito orgânico também é possível. Isto ocorre porque um analito que não possui carga interage bastante com a parte interna da fase estacionária que é apolar. Diminuindo-se a polaridade da fase móvel pela adição de uma substância orgânica estes compostos eluem mais rapidamente da coluna, podendo-se inclusive utilizar gradiente de fase móvel.

A separação não ocorre por mecanismo de troca iônica uma vez que o pH da fase móvel (aproximadamente 1,3) aliado ao pH dos sítios $\text{SO}_3^- \text{H}^+$ (trocadores de cátions) da coluna produzem um pH de quase zero dentro da fase estacionária¹⁰, não permitindo, portanto, que o ácido ascórbico esteja na forma ionizada. Interferentes que se ionizam neste pH são separados pelo mecanismo de exclusão iônica.

O objetivo deste estudo foi apresentar um método simples e rápido para a determinação de vitamina C em alimentos, utilizando uma coluna de troca iônica forma H^+ . Este método também foi comparado a um método convencional²⁰ por coluna C18 e avaliado segundo o tipo de solução extratora utilizada.

2 Materiais e métodos

2.1 Reagentes e equipamentos

O padrão de vitamina C foi obtido de Sigma-Aldrich, o ácido sulfúrico suprapuro® de Merck CO e a água tipo I de sistema de ultrapurificação Milli-Q® A10.

A coluna de troca iônica forma hidrogênio Aminex® HPX87H (7,8 x 300 mm) e foi fabricada por BIORAD®.

Na comparação entre métodos a coluna C18 utilizada foi Waters Novapak® (4,6 x 150 mm) e o cromatógrafo líquido foi um modelo Shimadzu® 10A.

Na comparação entre soluções extratoras e demais análises de frutas e vegetais o cromatógrafo líquido utilizado foi Waters Alliance® 2695 com detector de arranjo de diodos Waters 2996.

O ácido oxálico, o ácido metafosfórico, o EDTA e o fosfato de potássio utilizados foram obtidos de Merck CO.

As amostras sólidas foram processadas em blender de maneira a produzir uma polpa fina e uniforme para que a extração fosse homogênea e reprodutiva.

Os vegetais estudados segundo o método proposto, por coluna de troca iônica, foram: batata, mandioca e tomate, além de sucos de goiaba, abacaxi, maracujá, maçã, laranja e água de coco.

A amostra estudada durante a comparação da separação entre os dois métodos foi polpa de manga.

A amostra utilizada na comparação entre soluções extratoras para o método de troca iônica foi suco de maracujá.

Todas as amostras foram obtidas no comércio varejista da cidade do Rio de Janeiro.

2.2 Preparo da amostra e condições de análise segundo método proposto por coluna de troca iônica

As amostras foram pesadas em balança analítica, extraídas com ácido sulfúrico suprapuro® 0,05 M em ultrassom por 10 minutos, levadas a volume conhecido, filtradas em unidade filtrante descartável de Teflon® hidrofílico e colocadas em frasco âmbar com tampa de rosca e septo de silicone.

A solução de ácido sulfúrico suprapuro® 0,05 M utilizada como solução extratora foi também escolhida como fase móvel. A coluna BIORAD Aminex® HPX87H foi escolhida como fase estacionária do sistema cromatográfico.

A vazão da fase móvel foi de 0,8 mL/minuto, o volume de injeção de 20 μL e o comprimento de onda, 242,6 nm.

2.3 Preparo da amostra e condições de análise segundo método convencional por coluna C18

As amostras foram pesadas em balança analítica e levadas a volume conhecido com ácido metafosfórico 3% (m.v^{-1}), filtradas em unidade filtrante descartável de Teflon® hidrofílico e colocadas em frasco âmbar com tampa de rosca e septo de silicone.

A fase móvel consistiu de tampão fosfato pH 2,5 e a coluna utilizada foi uma C18 Waters Novapak® 5 μm , 150 x 3,4 mm.

A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL/minuto, o volume de injeção de 20 μL e o comprimento de onda 254 nm.

2.4 Teste de estabilização do ácido ascórbico em função da solução extratora utilizada

- EDTA como agente estabilizante: foram preparadas 10 repetições de soluções padrão de vitamina C com concentração aproximada de 1 mg.mL^{-1} com solução de EDTA 0,05% (m.v^{-1}) em ácido sulfúrico PA 0,05 M. As soluções foram injetadas no sistema cromatográfico imediatamente após o preparo.
- Ácido oxálico como agente estabilizante: foram preparadas 10 repetições de soluções padrão de vitamina C com concentração aproximada de 1 mg.mL^{-1} com solução de ácido oxálico 6% (m.v^{-1}) em ácido sulfúrico PA 0,05 M.

As soluções foram injetadas no sistema cromatográfico imediatamente após o preparo.

- Ácido metafosfórico como agente estabilizante: foram preparadas 10 repetições de soluções padrão de vitamina C com concentração aproximada de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ com solução de ácido metafosfórico 3% (m.v⁻¹) em ácido sulfúrico PA 0,05 M. As soluções foram injetadas no sistema cromatográfico imediatamente após o preparo.
- Somente ácido sulfúrico suprapuro® como agente estabilizante: foram preparadas 10 repetições de soluções padrão de vitamina C com concentração aproximada de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ com solução de ácido sulfúrico suprapuro® 0,05 M, somente. As soluções foram injetadas no sistema cromatográfico imediatamente após o preparo.

Quantificação de amostra de suco de maracujá

Foram preparadas 10 repetições de preparo de uma amostra de suco de maracujá extraída com solução de EDTA 0,05% (m.v⁻¹) em ácido sulfúrico PA 0,05 M e quantificadas quanto ao teor de vitamina C a partir de um padrão de calibração preparado da mesma forma. Outras 10 replicatas da mesma amostra foram extraídas somente com ácido sulfúrico suprapuro® 0,05 M e também quantificadas quanto ao teor de vitamina C a partir de um padrão de calibração preparado da mesma forma. O teor de vitamina C informado no rótulo do suco de maracujá foi de 30 mg de vitamina C para 200 mL de suco.

3 Resultados e discussão

Com relação à rapidez e simplicidade o preparo da amostra foi fundamental. O uso da coluna de troca iônica diminuiu o envolvimento do operador, pois o manuseio e as perdas de amostra são mínimos. Os possíveis erros na execução das atividades foram assim minimizados.

A extração com a própria fase móvel (ácido sulfúrico suprapuro® 0,05 M) também fez parte deste processo de simplificação, pois não foi necessário preparar soluções tampão com extremo controle de pH ou soluções salinas a fim de estabilizar a vitamina C (vide item 3.3). Optou-se somente por utilizar um ácido sulfúrico de alta pureza (suprapuro®) para que este não trouxesse para o meio extrativo contaminações por íons metálicos que pudessem degradar a vitamina C recém extraída.

A rapidez do preparo da amostra e a ótima resolução cromatográfica deste método não excluem a possibilidade de que, frente a matrizes ainda não testadas, seja necessário incluir alguma etapa extra de limpeza da amostra como, por exemplo, extração em fase sólida com cartuchos C18 ou desengorduramento para o caso de matrizes animais.

A utilização do ácido sulfúrico 0,05 M (pH 1,3), como fase móvel, faz parte do mecanismo de separação da coluna utilizada, cuja forma iônica H⁺ é proveniente do ácido sulfônico ligado à resina. O ácido sulfúrico é utilizado, pois é um ácido forte o bastante para manter a maioria dos ácidos orgânicos na forma molecular. O ácido sulfônico (pKa < 1) da resina permanecerá ionizado no pH da fase móvel.

O controle do pH foi requerido para que ocorresse supressão iônica já que partículas com carga possuem baixa interação com a fase estacionária apolar. No caso do ácido ascórbico (pKa₁ 4,2), a diminuição do pH para valores menores que 4,2 além de evitar que o equilíbrio entre as formas iônica e molecular acontecesse, deslocou este equilíbrio no sentido da forma molecular da vitamina C devido ao aumento da concentração de íons hidrogênio em solução.

3.1 Avaliação de cromatogramas obtidos pelo método proposto com coluna de troca iônica

As Figuras 5 e 6 representam, respectivamente, cromatogramas com espectro UV de um padrão de vitamina C e de uma amostra de tomate. Os cromatogramas obtidos demonstram separação do pico da vitamina C em nível de linha base, e o espectro demonstra que a absorção máxima desta na região do ultravioleta foi de 242,6 nm.

A Figura 7 apresenta a avaliação de pureza espectral (*peak purity*) encontrada para a amostra de tomate. Esta é outra ferramenta importante do detector de arranjo de diodos. O critério estabelecido pelo equipamento é que o ângulo de pureza (*purity*) encontrado para a amostra deve ser menor que o ângulo limite (*Auto Threshold*) medido, levando-se em consideração várias tomadas de absorção máxima no UV ao longo do pico e também o nível de ruído encontrado. Como pode ser observado, o ângulo de pureza é menor que o ângulo limite. Desta forma o pico foi considerado espectralmente puro.

A Tabela 1 se refere a teores de vitamina C encontrados nas diversas matrizes vegetais estudadas.

A resolução obtida nas matrizes acima foi considerada também excelente, mas não exclui a possibilidade de que, frente a matrizes ainda não testadas, seja necessário incluir alguma etapa extra de limpeza da amostra como, por exemplo, extração em fase sólida com cartuchos C18 ou desengorduramento para o caso de matrizes animais para as quais o método ainda não foi testado.

A comparação do método descrito por RIZZOLLO e POLESELLO²⁰ e o método por coluna de troca iônica é demonstrada através das Figuras 8 e 9, respectivamente. Estas mostram os resultados de ambos os métodos na análise de uma amostra de polpa de manga irradiada. Pode-se notar a separação insuficiente da vitamina C das substâncias interferentes presentes na matriz da amostra (Figura 8b) coincidente com o tempo de retenção do padrão (Figura 8a) para o método RIZZOLLO e POLESELLO²⁰. A Figura 9 diz respeito ao método proposto com coluna de troca iônica e revela um pico deste analito resolvido em nível de linha base e sem deformações decorrentes da coeluição de interferentes (Figura 9b) que também coincide com o tempo de retenção do padrão (Figura 9a) nesta coluna.

O método por fase reversa demonstrou separação insuficiente e baixa resolução. O método por coluna de troca iônica, porém, demonstrou separação completa para o ácido ascórbico. A mudança de tipo de fase estacionária (sílica para polímero com trocador iônico) mostrou-se bastante eficiente, eliminando

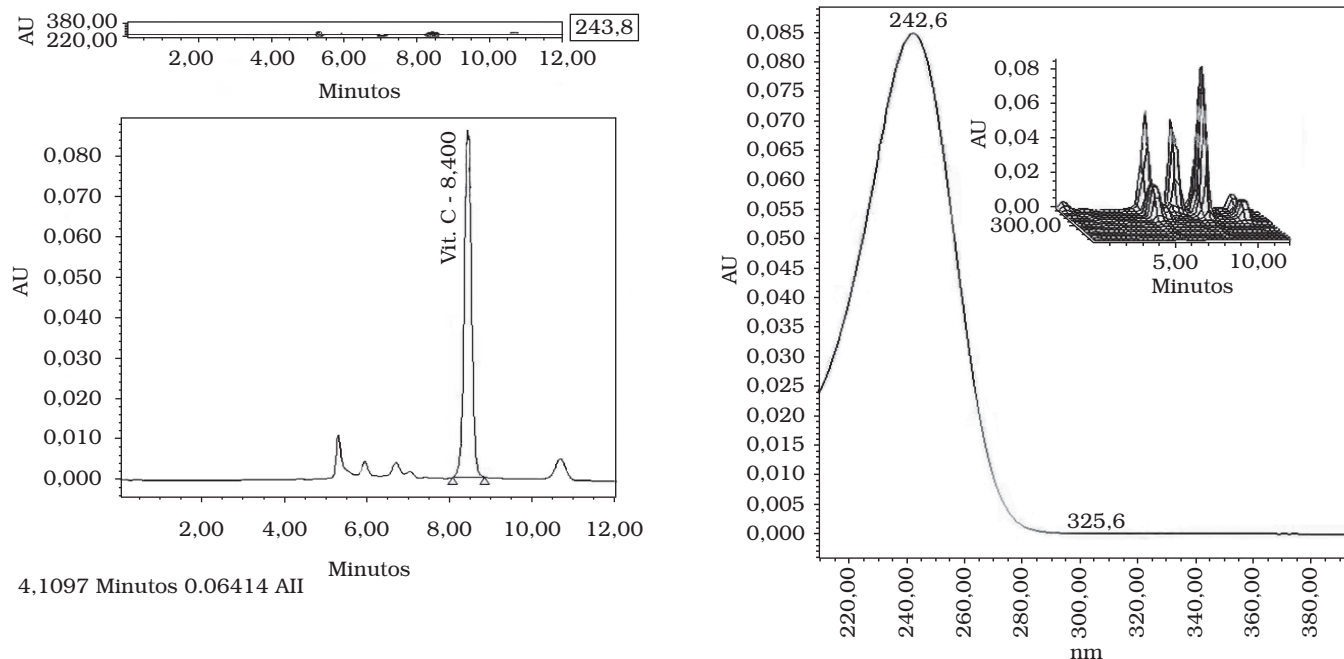


Figura 5. Cromatograma de um padrão de calibração de ácido ascórbico extraído do espectro a 242,6 nm, obtidos do detector de arranjo de diodos (PDA).

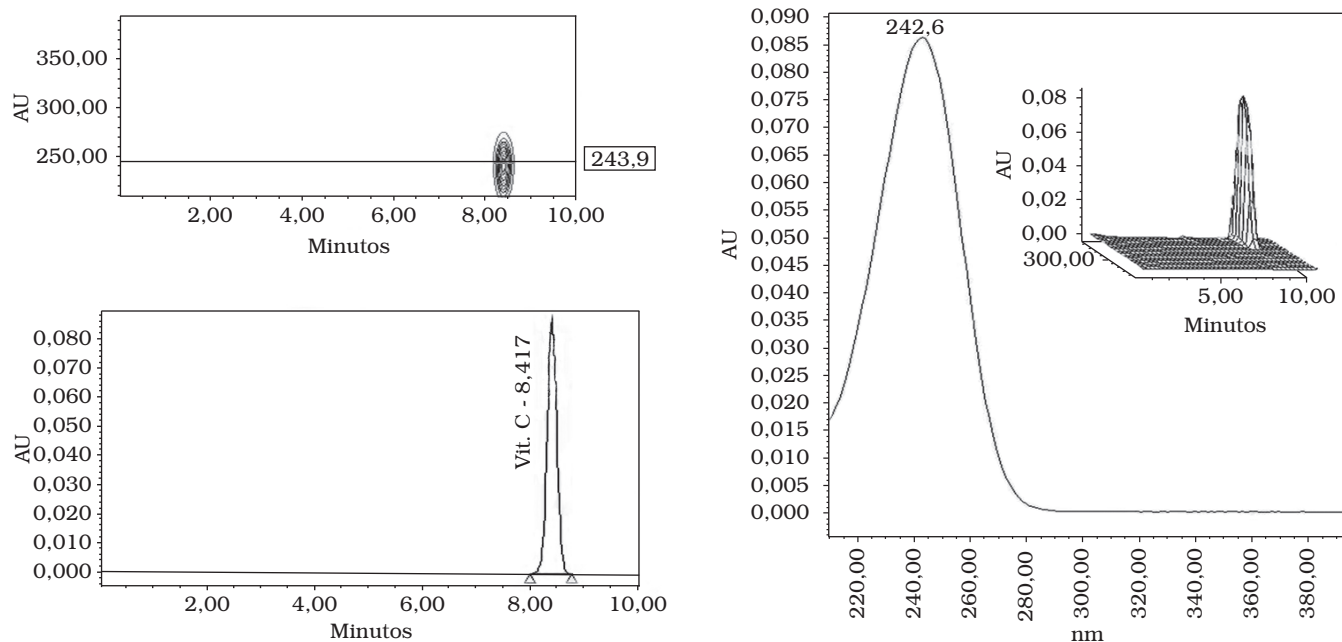


Figura 6. Cromatograma e espectro de UV obtidos pelo detector de arranjo de diodos (PDA).

os interferentes e permitindo uma resolução cromatográfica de linha base. A vazão de fase móvel utilizada nesta avaliação foi de 1,0 mL/min e o comprimento de onda 254 nm.

3.2 Teste de estabilização do ácido ascórbico em função da solução extratora utilizada

Este teste foi realizado em duas partes principais com o objetivo de verificar a capacidade de estabilização do ácido

ascórbico por soluções extratoras diferentes em solução padrão e em uma amostra escolhida aleatoriamente.

O processo de degradação do ácido ascórbico é bastante complexo e contém um grande número de processos de oxidação/redução e reações de rearranjos intermoleculares. A degradação é iniciada com a oxidação do grupo enediol mais reativo através da ação de grupos pró-oxidantes como peróxidos, radicais hidróxi e também íons metálicos. Quando o

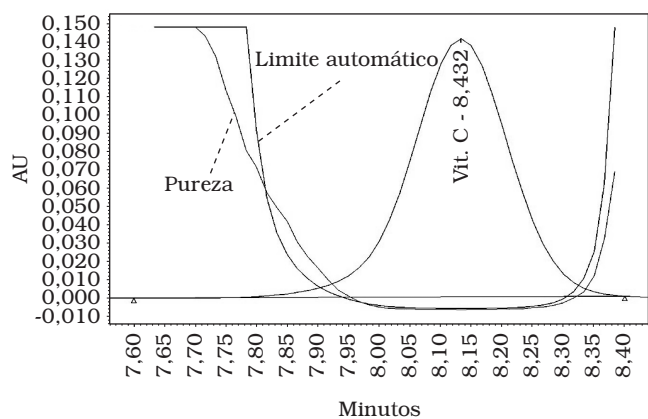


Figura 7. Gráfico de pureza espectral: o ângulo de pureza deve ser menor que o ângulo limite (Threshold).

Tabela 1. Teor de vitamina C em matrizes vegetais diversas.

Matriz da amostra	Teor de vitamina C encontrado (mg.100 g ⁻¹)
Água de coco	0,88
Tomate	21,03
Suco de abacaxi	51,18
Suco de manga	16,58
Suco de maçã	8,79
Suco de maracujá	15,60
Suco de caju	40,21
Suco de laranja	56,91
Suco de goiaba	16,30
Batata	39,82
Mandioca	85,33

ácido ascórbico é dissolvido em água, o pH da solução diminui devido à ionização parcial do grupo enediol no carbono 3¹¹. A estabilização do ácido ascórbico se dá através de acréscimo de H⁺, dificultando sua ionização, estabilizando o grupo hidroxila e conseqüentemente o anel da lactona, prevenindo a hidrólise irreversível ao ácido 2,3-dicetogulônico⁹.

Em formulações ou quando adicionada em alimentos a vitamina C pode ser estabilizada por esterificação da hidroxila com ácidos orgânicos de cadeia longa ou ainda ácidos inorgânicos⁴. Em uma análise de vitamina C, no entanto, a necessidade de aumentar a estabilidade do ácido ascórbico recém extraído da matriz de alimento está relacionada ao meio extrator e às condições de manipulação como luz e temperatura que afetam significativamente a recuperação do ácido ascórbico¹⁹.

Entre as soluções mais utilizadas para extrair o ácido ascórbico e também estabilizá-lo, pode-se citar o ácido oxálico ou o ácido metafosfórico 3-6% (m.v⁻¹). Estes ácidos são capazes de prevenir a oxidação do ácido ascórbico pela ação de íons cobre (II) ou ferro (III). Ao ácido metafosfórico também é reportada a habilidade de precipitar proteínas e com isso inativar enzimas como a ácido ascórbico oxidase¹³. Soluções de EDTA, um agente quelante que retira íons metálicos do meio, também são citadas como fatores de estabilização do ácido ascórbico.

Uma solução de EDTA 0,05% (m.v⁻¹) foi reportada como fator de aumento da estabilidade do ácido ascórbico em solução

Sample: vit c - manga

ID: PADRÃO

Sample Amount: 1

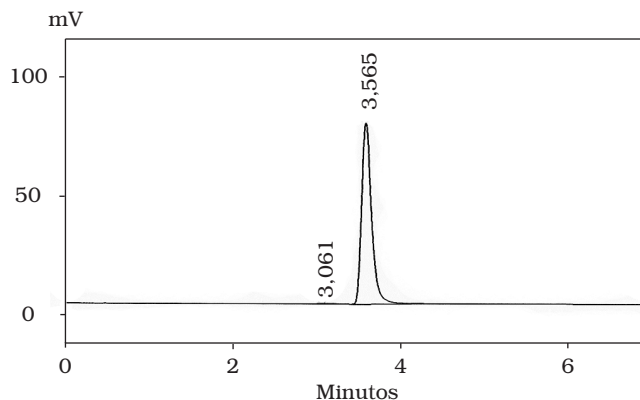
Type: Standard

Detector: Other

Operator:

Method Name: VITC3001.M01

Chromatogram Filename:VITC3001.C01



Peak Report

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3,061	1246	172		1		vit c
2	3,565	640603	76346				

Sample: vit c - manga irr.

ID: 141-1

Sample Amount: 9,9105

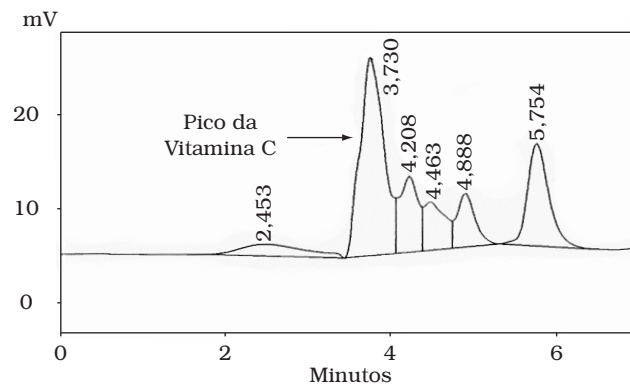
Type: Unknown

Detector: Other

Operator:

Method Name: VITC1903.035

Chromatogram Filename:VITC1903.C35



Peak Report

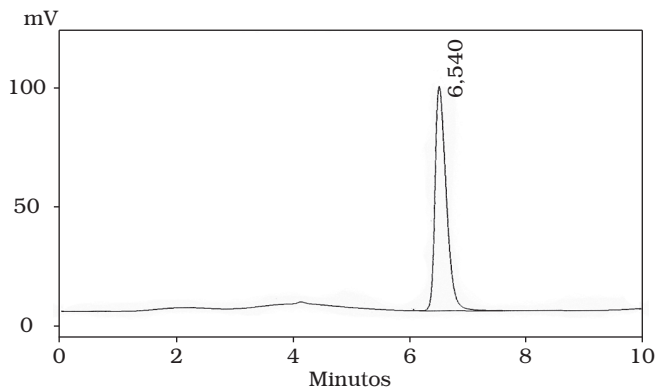
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2,453	71952	1266		1	7,3225	vit c
2	3,730	430906	21423				

Figura 8. Método RIZZOLLO e POLESELLO²⁰, sendo: a) Injeção de padrão de vitamina C; e b) Injeção de uma amostra de polpa de manga irradiada.

Sample: p cal final
 ID: met TI e ac.
 Sample Amount: 100
 Type: Unknown
 Detector: Other
 Operator:
 Method Name: VITCTI.MET

(a)

Chromatogram Filename: VITC2703.C07



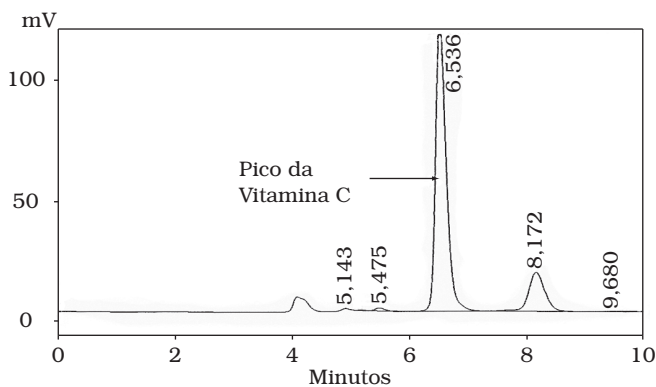
Peak Report

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	6,540	1279401	94089		1	0,2428	vit c

Sample: teste de manga
 ID:
 Sample Amount: 100
 Type: Unknown
 Detector: Other
 Operator:
 Method Name: VITCTI.MET

(b)

Chromatogram Filename: VITC2703.C06



Peak Report

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5,143	1988	275				
2	5,475	27977	2595				
3	6,536	3111466	241066		1	0,5904	vit c

Figura 9. Método proposto por coluna de troca iônica, sendo: a) Injeção de padrão de vitamina C; e b) Injeção de uma amostra de polpa de manga irradiada.

de ácido sulfúrico PA 0,05 M. ASHOOR et al.³ afirmam que a utilização de uma solução de EDTA aumentou a área do pico do padrão de ácido ascórbico três vezes, sendo este essencial para aumentar a sensibilidade e reprodutibilidade do método em questão.

O método acima citado também utilizou uma coluna HPX 87H BIORAD e ácido sulfúrico 0,005 M como fase móvel. Baseando-se nesta observação, resolveu-se testar as afirmações quanto ao uso de EDTA e também dos ácidos oxálico e metafosfórico na extração e estabilização e até mesmo no aumento da sensibilidade de detecção do ácido ascórbico. Estas hipóteses foram testadas em soluções padrão de vitamina C. Todas as soluções foram feitas em ácido sulfúrico PA 0,05 M em função da necessidade da coluna cromatográfica utilizar esta fase móvel e também para avaliar o efeito da pureza do ácido sulfúrico.

Ácido metafosfórico, ácido oxálico, EDTA e ácido sulfúrico suprapuro® 0,05 M como agentes estabilizantes

Os resultados foram reportados em termos de fator de resposta, pois quanto menor o fator de resposta, maior a área, e conseqüentemente menor terá sido a degradação do padrão de ácido ascórbico.

As soluções padrão foram preparadas e injetadas no sistema cromatográfico imediatamente após o preparo para evitar possíveis problemas de degradação da vitamina C com o tempo, embora estudos prévios tenham verificado que em aproximadamente 2 horas de espera no injetor automático, não houve mudança na resposta da solução padrão de ácido ascórbico²².

Os resultados (Figura 10) demonstraram que a maior degradação ocorreu na solução com ácido oxálico (pH 1,3), seguida pela solução com ácido metafosfórico (pH 1,4). A solução com EDTA (pH 1,2) obteve comportamento pouco menos eficiente que a de ácido sulfúrico suprapuro® 0,05 M (pH 1,3). Desta forma, considera-se que a solução de ácido sulfúrico suprapuro® 0,05 M é uma boa escolha para estabilizar a vitamina C e também manter a idéia de praticidade do método, não inserindo neste o preparo de outra solução extratora diferente da fase móvel.

A hipótese verificada por ASHOOR et al.³ de que a adição de EDTA aumentaria a área do pico da vitamina C no padrão de calibração não foi confirmada e, portanto, não mostrou, neste caso, aumento na sensibilidade do método.

Quantificação de amostra de suco de maracujá

Este experimento objetivou testar a eficiência das soluções extratoras que forneceram os melhores resultados na avaliação da solução padrão, verificando a estabilização da vitamina C em solução de EDTA 0,05% (m.v⁻¹) e ácido sulfúrico PA 0,05 M contra a solução de ácido sulfúrico suprapuro® 0,05 M na extração de uma amostra, e com isso avaliar o efeito de matriz. A amostra escolhida aleatoriamente foi suco de maracujá.

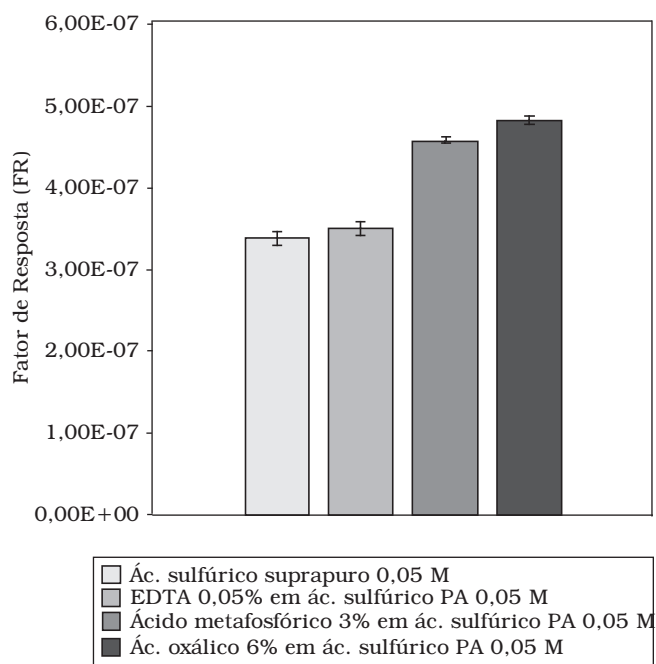


Figura 10. Comparação da resposta obtida após análise de ácido ascórbico em diversas soluções extratoras. Os resultados estão expressos pelo fator de resposta, o qual é inversamente proporcional à quantidade de AA extraída. Barras verticais representam o erro padrão da média.

Os teores médios em mg de vitamina C por 100 mL de suco, obtidos nas 10 repetições com a solução de EDTA e somente com ácido sulfúrico suprapuro® 0,05 M foram, respectivamente, $14,36 \pm 0,21$ e $15,60 \pm 0,13$ (Figura 11 e Tabela 2). O teor informado no rótulo foi de $15 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$. Somente a diferença de aproximadamente $1,2 \text{ mg}$ de vitamina C ocorrida entre as duas extrações não permite concluir que a solução de ácido sulfúrico suprapuro® extraia e/ou estabilize melhor a vitamina C no meio (embora não tenha ocorrido sobreposição das barras de erro e a variação entre as medidas para esta solução extratora tenha sido menor), mas permite concluir que a solução de EDTA não é imprescindível para o método e também não aumenta a sensibilidade deste.

Os níveis pouco mais altos encontrados para esta extração podem ser justificados pela adição de ácido ascórbico no suco (indicada no rótulo do produto) que funciona como antioxidante a fim de evitar mudanças de coloração²⁴.

4 Conclusões

A comparação entre os métodos por coluna de troca iônica (na verdade uma combinação de partição por fase reversa e exclusão iônica) e o método por fase reversa demonstraram a eficiência do primeiro até mesmo para uma matriz complexa e com baixo teor de vitamina C.

Os perfis cromatográficos obtidos, aliados aos dados de espectro UV, incluindo a ferramenta de pureza espectral, permitiram concluir que o método ofereceu excelente seletividade e separação para a vitamina C presente nas amostras testadas.

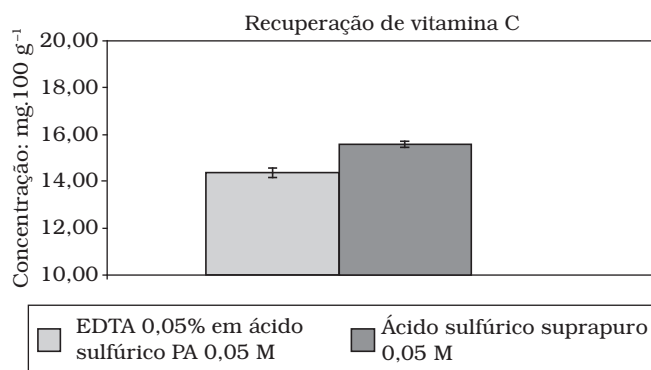


Figura 11. Extração de vitamina C em suco de maracujá utilizando soluções extratoras diferentes. Barras verticais representam o erro padrão da média.

Tabela 2. Teores em $\text{mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ encontrados nas duas soluções extratoras testadas.

Repetição	Ác. sulfúrico suprapuro 0,05 M	0,05% de EDTA em ác. sulfúrico PA 0,05 M
am 1	16,31	15,70
am 2	15,24	15,33
am 3	14,92	14,21
am 4	15,82	14,27
am 5	16,01	14,53
am 6	15,58	14,23
am 7	15,76	14,11
am 8	15,57	13,70
am 9	15,20	13,82
am 10	15,00	13,67
Média	15,54	14,36
Desvio padrão	0,45	0,67
CV (%)	2,90	4,69

Os testes que avaliaram a estabilização da vitamina C levam à conclusão de que o uso de fase móvel (solução de ácido sulfúrico suprapuro® 0,05 M), além de conferir maior rapidez ao método, não produz perdas de vitamina C.

Diante dos resultados obtidos pode-se afirmar que o método proposto neste estudo é bastante vantajoso para a análise de vitamina C em matrizes vegetais.

Referências bibliográficas

1. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria nº 41 de 14 de janeiro de 1998**, anexo A. Regulamento técnico para rotulagem nutricional de alimentos embalados. República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 de janeiro de 1998. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/>> Acesso em: 06 ago. 2005.
2. ARONSON, J. K. Forbidden fruit. **Nature Medicine**, v. 7, n. 1, p. 29-30, 2001.
3. ASHOOR, S. H.; WOODROW C. M.; WELTY J. Liquid chromatographic determination of ascorbic acid in foods. **Journal of International Association of Official Analytical Chemists**, v. 67, p. 78-80, 1984.

4. AUSTRIA, R.; SEMENZATO, A.; BETTERO, A. Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 795-801, 1997.
5. BASU, T. K.; SCHORAH, C. J. **Vitamin c in health and disease**. Londres: AVI Pub. Co., 1982. 152 p.
6. BIANCHI, J.; ROSE, R. C. The chromatographic separation and radiochemical quantification of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and diketoglucônic acid. **Journal of Micronutrient Analysis**, v. 1, p. 3-11, 1985.
7. CARR, A. C.; FREI, B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 6, p. 1086-1107, 1999.
8. CHEFTEL, J. C.; CHEFTEL, H.; BESANÇON, P. **Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos**. Tradução de Francisco López Capont. Zaragoza: Editorial Acribia, 1977. 404 p.
9. DAVEY, M. W. et al. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 825-860, 2000.
10. JUPILLE, T. et al. Ion moderated partition HPLC. **International Laboratory**, v. 11, n. 6, p. 84-89, 1981.
11. LEE, J. S. et al. The stabilization of L-ascorbic acid in aqueous solution and water-in-oil-in-water double emulsion by controlling de pH and electrolyte concentration. **Journal of Cosmetic Science**, v. 55, p. 1-12, 2004.
12. LU, X.; SEIB, P. A. Assay of dehydroascorbic acid in bread and dough added as a crystalline dimer. **Cereal Chemistry**, v. 75, n. 2, p. 200-206, 1998.
13. MACRAE, R.; SCHWEIGERT, B. **HPLC in food analysis**. Hardbound, Academic Press, 1988. 340 p.
14. MANELA-AZULAY, M. et al. Vitamin C. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S036505962003000300002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 16 Mar 2007. Pré-publicação. doi: 10.1590/S0365-05962003000300002.
15. MOSER, U.; BENDICH, A. Vitamin C. In: MACHLIN, L. J. **Handbook of vitamins**. 2º ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1991. p. 195-232.
16. NAIDU, K. A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. **Nutrition Journal**, v. 2, p. 2-7, 2003.
17. PÉREZ, A. G. et al. Rapid determination of sugar, nonvolatile acids and ascorbic acid in strawberry and other fruits. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 3545-3549, 1997.
18. PISCHESTRIEDER, M. Reaction of L-ascorbic acid with L-arginine derivatives. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p. 2081-2085, 1996.
19. RIZZOLO, A. et al. Evaluation of sampling and extraction procedures for the analysis of ascorbic acid from pear tissue. **Food Chemistry**, v. 77, p. 257-262, 2002.
20. RIZZOLO, A.; POLESELLO, A. HPLC assay of ascorbic acid in fresh and processed fruit and vegetables. **Food Chemistry**, v. 14, p. 189-199, 1984.
21. ROIG, M. G.; RIVERA, Z. S.; KENNEDY, J. G. L. Ascorbic acid: an overview. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 59-72, 1993.
22. ROSA, J. S. **Desenvolvimento de um método rápido para análise de vitamina C por cromatografia líquida de alta eficiência e coluna de troca iônica**. Seropédica, RJ: UFRRJ. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. 98 p. 2005.
23. STONE, I. Fifty years of research on ascorbate and the genetics of scurvy. **Orthomolecular Psychiatry**, v. 13, n. 4, p. 280, 1984.
24. TRAN, M. T. T.; FARID, M. Ultraviolet treatment of orange juices. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 5, p. 495-502, 2004.
25. WILLS, R. B. H.; PUSHPARANY, W.; GREENFIELD, H. Liquid chromatography, microfluorometry and dye-titration determination of vitamin C in fresh fruit and vegetables. **Journal of International Association of Official Analytical Chemists**, v. 66, n. 6, p. 1377-1379, 1983.
26. WOLUCKA, B. A.; DAVEY, M. W.; BOERJAN, W. A high-performance liquid chromatography radio method for determination of L-ascorbic acid and guanosine 5'-diphosphate-L-galactose, key metabolites of the plant vitamin C pathway. **Analytical Biochemistry**, v. 294, p. 161-168, 2001.