

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO RÁPIDO PARA**  
**ANÁLISE DE VITAMINA C POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA**  
**DE ALTA EFICIÊNCIA UTILIZANDO COLUNA DE TROCA**  
**IÔNICA**

**JEANE SANTOS DA ROSA**

**2005**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO RÁPIDO PARA  
ANÁLISE DE VITAMINA C POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA  
DE ALTA EFICIÊNCIA UTILIZANDO COLUNA DE TROCA  
IÔNICA**

**JEANE SANTOS DA ROSA**

Sob a Orientação do Pesquisador  
**Ronoel Luiz de Oliveira Godoy**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Magister  
Scientiae** em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos, Área de concentração em  
Propriedades Físicas, Químicas,  
Bioquímicas e Sensoriais de Alimentos.

Seropédica, RJ  
Setembro de 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

JEANE SANTOS DA ROSA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Propriedades físicas, químicas, bioquímicas e sensoriais de alimentos, como requisito parcial para obtenção do grau de **Magister Scientiae**, em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_/\_\_/2005

---

D.Sc. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy  
Embrapa Agroindústria de Alimentos  
(Orientador)

---

D. Sc. João Oiano Neto  
Embrapa Agroindústria de Alimentos

---

D.Sc. Leila Martins Quinteiro  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Instituto de Química

---

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
<b>2.1 Vitamina C</b> .....	3
2.1.1 Estrutura .....	3
2.1.2 Propriedades Físico-Químicas .....	5
2.1.3 Ácido diidroascórbico (DIA) .....	5
2.1.4 Ácido eritórbico .....	6
2.1.5 A vitamina C na história .....	7
2.1.6 Atividade vitamínica .....	8
2.1.7 A controvérsia Linus Pauling .....	10
2.1.8 Síntese do ácido ascórbico .....	12
2.1.9 Propriedades bioquímicas e fisiológicas da vitamina C .....	13
2.1.10 Propriedades anti-oxidantes .....	13
2.1.11 Vitamina C nos alimentos .....	14
<b>2.2 Métodos analíticos mais comuns para a determinação de ácido ascórbico</b> ..	16
<b>2.3 Cromatografia</b> .....	18
2.3.1 Cromatografia gasosa .....	19
2.3.2 Eletroforese capilar .....	20
2.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	22
<b>2.4 Métodos de quantificação mais usados em cromatografia</b> .....	38
2.4.1 Métodos cromatográficos para análise de vitamina C .....	39
<b>2.5 Dosagem de vitamina C total</b> .....	42
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
3.1 Método e amostras .....	44
3.2 Relação de materiais .....	44
3.3 Preparo da amostra .....	45
3.4 Testes iniciais .....	49
3.4.1 Linearidade .....	49
3.4.2 Teste de degradação .....	50
3.4.3 Teste de estabilização do ácido ascórbico em função da solução extrativa utilizada .....	51
3.4.3.1 Com EDTA .....	51
3.4.3.2 Com ácido oxálico .....	51
3.4.3.3 Com ácido metafosfórico .....	51
3.4.3.4 Quantificação de amostra de suco de maracujá .....	51
3.4.4 Testes de recuperação .....	52
3.4.4.1 A partir de amostras de Cewin® (lote 060304) – Parte I .....	52

3.4.4.2 A partir de matriz de fruta – Parte II.....	52
3.4.5 Teste de comparação com método titulométrico .....	52
3.4.6 Ensaio de proficiência .....	53
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Comparação com o método que utiliza coluna de troca iônica e o que utiliza     coluna de fase reversa.....</b>	<b>54</b>
<b>4.2 Preparo das amostras.....</b>	<b>58</b>
4.2.1 Efeito da homogeneização .....	58
4.2.2 Extração.....	59
4.2.3 Necessidade de água ultrapura.....	60
4.2.4 Fase móvel .....	62
4.2.5 Microfiltração da fase móvel.....	63
4.2.6 Microfiltração das amostras.....	63
4.2.7 Cuidados no preparo das amostras.....	64
<b>4.3 Coluna Cromatográfica .....</b>	<b>66</b>
<b>4.4 Equipamento utilizado e condições de análise .....</b>	<b>69</b>
<b>4.5 Cálculo da concentração de vitamina C .....</b>	<b>70</b>
<b>4.6 Avaliação dos teores encontrados em algumas matrizes .....</b>	<b>72</b>
<b>4.7 Avaliação de cromatogramas e espectros.....</b>	<b>74</b>
<b>4.8 Teste iniciais .....</b>	<b>78</b>
4.8.1 Curva de linearidade.....	78
4.8.2 Teste de degradação .....	79
4.8.3 Teste de estabilização do ácido ascórbico em função da solução extrativa utilizada .....	80
4.8.4 Testes de recuperação .....	84
4.8.4.1 Verificação da recuperação a partir de suplemento vitamínico .....	84
4.8.4.2 Verificação de recuperação a partir de matriz de fruta (mamão – <i>Carica papaya</i> L. var. Sunrise solo).....	85
4.8.5 Teste de comparação com método titulométrico .....	86
4.8.6 Ensaio de proficiência .....	87
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>92</b>

## RESUMO

ROSA, Jeane Santos da. **Desenvolvimento de um método rápido para análise de vitamina C por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna de troca iônica.** Seropédica: UFRRJ, 2005. 100p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Propriedades Físicas, Químicas, Bioquímicas e Sensoriais de Alimentos).

Os seres humanos não possuem a capacidade de sintetizar vitamina C devido a falta da enzima gulonolactona oxidase. Desta forma a fim de manter os níveis mínimos de ingestão diária recomendada para esta vitamina, deve-se consumir alimentos que contenham ácido ascórbico ou suplementos farmacêuticos deste. Apesar de estar presente abundantemente em frutas e vegetais, a vitamina C é sensível ao ar, luz e calor e é facilmente destruída em prolongados períodos de estocagem e processamento de alimentos. Devido a esta fácil degradação a determinação dos teores de vitamina C em alimentos tornou-se um desafio analítico no sentido de estabilizar a vitamina C recém extraída da matriz vegetal e com isto obter altos níveis de recuperação e reprodutibilidade destes teores. Existem diversos métodos analíticos propostos para a quantificação dos teores de ácido ascórbico em alimentos. O método titulométrico baseia-se na redução do corante 2,6 diclofenol-indofenol pela vitamina C, mas esse método é extremamente sujeito à interferência por parte de outras substâncias presentes na matriz que tenham também capacidade redutora como o ácido ascórbico. Os métodos espectrofotométricos são laboriosos, devido a extração de interferentes que podem fornecer absorvância no comprimento de onda utilizado. Os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência são utilizados atualmente devido a sua inerente capacidade de eliminação de interferentes e facilidade de preparo da amostra. Este estudo propôs o desenvolvimento de um método rápido e simples para a análise de vitamina C, utilizando uma coluna de troca iônica forma  $H^+$  e ácido sulfúrico 0,2M como fase móvel. O preparo da amostra consistiu somente em homogeneização, pesagem, extração com fase móvel e em ultrassom, diluição, filtração, microfiltração e injeção no sistema cromatográfico. A detecção é feita por detector de arranjo de diodos e o cromatograma extraído do espectro à 243nm. Os cromatogramas obtidos apresentaram um perfil límpido com o pico da vitamina C, resolvido à nível de linha base. As matrizes vegetais mais estudadas até agora foram mamão e morango e os teores médios obtidos foram respectivamente  $94,75 \pm 1,92$  e  $40,53 \pm 1,30$ mg de vitamina C/100g de amostra.

**Palavras-chave:** vitamina C; ácido diidroascórbico; cromatografia líquida de alta eficiência

## ABSTRACT

ROSA, Jeane Santos da. **Development of a rapid method for vitamin C analysis using ion exchange column.** Seropédica: UFRRJ, 2005. 100p. (Dissertation Master Science in Food Science and Technology, Physical, Chemical, Biochemical and Sensorial Properties of Food).

Humans are not able to synthesize vitamin C due to the lack of the enzyme *L-gulonolactone oxidase*. In order to maintain minimal levels recommended of daily ingestion food with ascorbic acid content or supplementation tabs must be consumed. Despite its presence in vegetables and fruits, vitamin C is very sensible to air (oxygen), light and heat and is easily destroyed at long storage periods and hard food **processment**. Due to this degradation process, measuring vitamin C levels is an analytical challenge. Stabilization of recently extracted ascorbic acid from food matrix to produce high recuperation levels and reproducibility is very difficult. There are many analytical methods to quantify ascorbic acid content in food. The titimetric method is based on 2,6-dichlorophenol-indophenol reduction of vitamin C. This method, however, suffers interference from the presence of another reductant agent like ascorbic acid. Spectrophotometric methods are laborious due to the extraction process of substances that may provide absorbance at the wavelength used. The liquid chromatography methods are the most used **nowadays**. Its interferent separation ability and fast sample preparations. This study meant to develop a simple and rapid method for vitamin C analysis in vegetables, using an ion exchange column in H<sup>+</sup> form and 0.2M sulfuric acid as mobile phase. Sample preparation was just homogenization, weighing, extraction with mobile phase and ultrasound, dilution, filtration, microfiltration and injection in chromatographic system. Detection was made at 243nm in a photodiode array detector. Chromatograms showed a clean profile with vitamin C peak resolved at baseline level. The vegetable matrix more tested until now were papaya and strawberries and the levels obtained, respectively 94.75 ± 1.92 and 40.53 ± 1.30 mg of vitamin C per 100g of sample.

**Keywords:** Vitamin C; dehydroascorbic acid and high performance liquid chromatography.

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1912, Casimir Funk formulou uma teoria em que dizia haver uma amina vital (vitamina) para a manutenção da saúde do organismo. Alguns anos mais tarde verificou-se que esta, na verdade, são várias substâncias de diferentes funções químicas.

As vitaminas são, então, grupos de substâncias heterogêneas constituintes normais dos alimentos, eficientes em quantidades mínimas e essenciais à vida.

A atividade de uma vitamina significa a remissão de uma lesão que foi provocada pela ausência desta no metabolismo, quando uma quantidade da vitamina em questão é ingerida. No caso da vitamina C a atividade vitamínica é medida em termos da ação antiescorbútica.

As funções fisiológicas do ácido ascórbico como suposta ação da cura de resfriados, metabolismo de lipídeos, aumento da imunidade e até prevenção e tratamento de certos tipos de câncer ainda são fontes de estudos no meio científico.

Apesar de toda controvérsia a vitamina C é considerada por muitos como a principal vitamina e antioxidante presente no organismo devido às suas inúmeras funções bioquímicas, como a capacidade de reação com oxigênio singlete e outros radicais livres a absorção de ferro, participação na formação do colágeno, síntese de alguns aminoácidos e auxílio na atividade de enzimas através da doação de elétrons.

Outra grande polêmica relacionada à vitamina C diz respeito às doses diárias recomendadas, que muitos cientistas afirmam ser somente suficiente para evitar que os sintomas do escorbuto apareçam. Estes cientistas sugerem então de altas doses por dia (acima de 10g). É importante notar que tal dosagem seria impossível de se obter através da alimentação.

Com exceção da acerola, pode possuir até 10% de seu peso constituído de ácido ascórbico, a maioria dos vegetais possuem teores de vitamina C bem abaixo de 100mg/100g de tecido. A extrema instabilidade do ácido ascórbico que é oxidado a ácido diidroascórbico e depois facilmente hidrolisado a ácido 2,3-dicetogulônico, que não possui atividade vitamínica, é outro fator que contribui para os baixos teores de vitamina C em alimentos. Processamentos onde ocorre exposição do material vegetal ao calor, luz, oxigênio e enzimas (no rompimento das células), os tornam mais susceptíveis ainda à degradação do ácido ascórbico.

Monitorar os teores de vitamina C em alimentos torna-se importante no sentido de controlar fatores pré e pós-colheita para o alimento possa produzir e manter os maiores teores de vitamina C possíveis.

Existem diversas técnicas analíticas utilizadas na determinação do teor de vitamina C em alimentos, entre elas estão a titulometria, espectrometria, fluorimetria, voltometria e cromatografia, sendo os mais utilizados o método titulométrico e o cromatográfico. As técnicas de titulometria e espectrometria oferecem problemas com interferentes redutores ou coloridos e necessitam de laboriosos preparos para a retirada destes. Nos métodos fluorimétricos é necessário deve-se fazer uma reação de derivatização uma vez que o ácido ascórbico não fluoresce naturalmente. Nos métodos por voltometria são utilizados eletrodos específicos e de vida útil limitada.

Os métodos cromatográficos em geral oferecem os procedimentos analíticos mais simples, pois é possível isolar a banda do ácido ascórbico dos demais componentes da amostra que também produzem sinal no detector utilizado. Estes métodos podem ser divididos em métodos que utilizam coluna de fase reversa e aqueles que utilizam colunas de troca iônica.

Os métodos que utilizam fase reversa necessitam de extremo controle de pH conseguindo através de preparo de solução tampão para extração da vitamina C e também para a fase móvel. A utilização de solução tampão é conhecidamente problemática para os equipamentos de CLAE, especialmente os selos da bomba e do injetor, e também para os filtros da coluna. Além desta desvantagem a análise por fase reversa não apresentou resolução adequada para matrizes vegetais com baixos níveis de vitamina C.

Nos métodos que utilizam colunas de troca iônica, a vitamina C, na verdade, é separada por mecanismo de fase reversa que ocorre na superfície da resina. e é modulado pelo contra íon. Para substâncias que se ionizam no pH da fase móvel (interferentes) esta coluna utiliza mecanismo de exclusão iônica na separação.

O objetivo em desenvolver o presente método foi obter uma separação adequada e visivelmente livre de interferentes com um preparo de amostra simples que expusesse o menos possível a vitamina C ao ar, luz ou calor. Para tanto, o preparo da amostra foi somente a homogeneização, pesagem, extração em ultrassom, diluição, filtração, microfiltração e injeção no sistema cromatográfico. A detecção é feita por detector de arranjo de diodos e o cromatograma extraído do espectro à 243nm.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

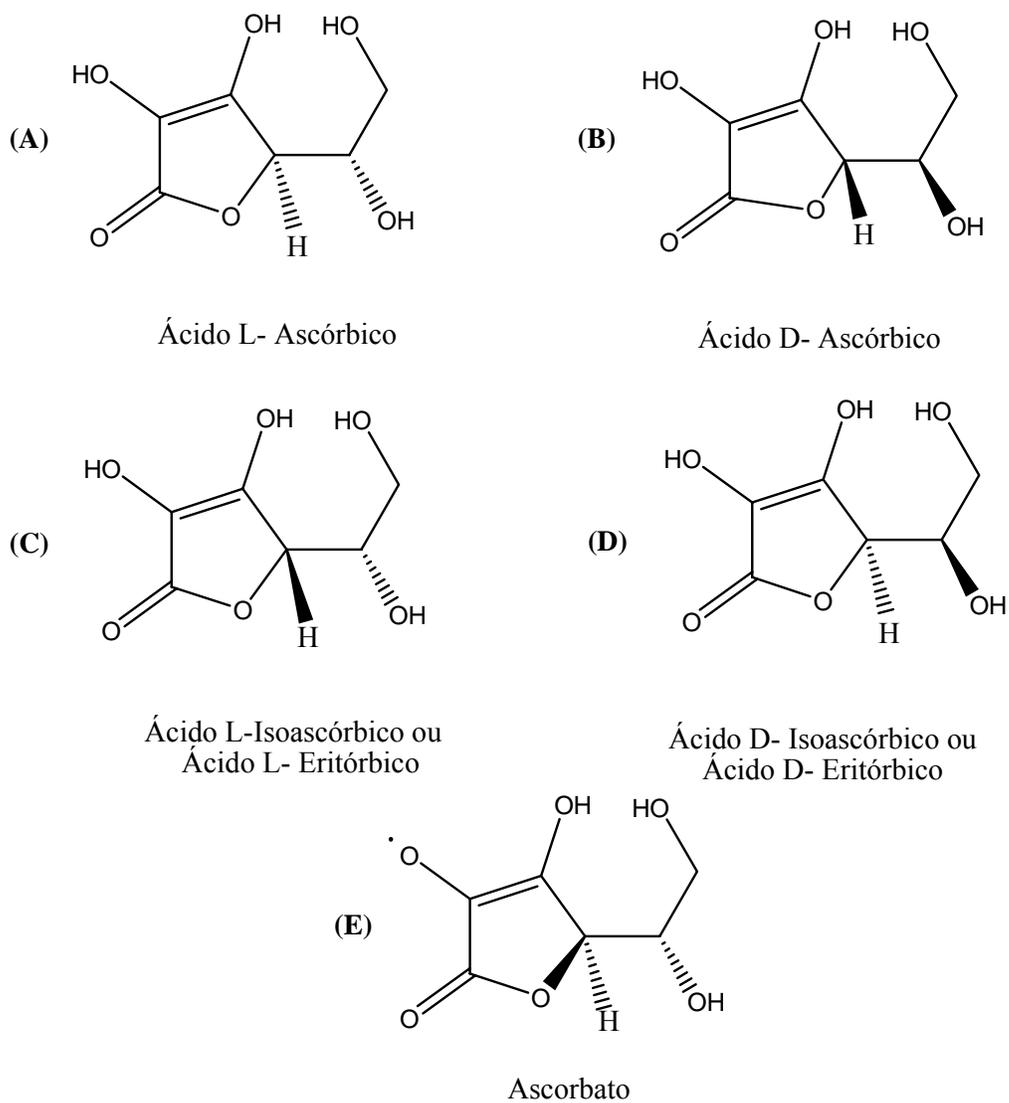
### 2.1 Vitamina C

#### 2.1.1 Estrutura

A designação do nome *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) (IUPAC-IUB, 1965). A molécula tem um anel de  $\gamma$ -lactona quase planar com dois centros quirais nas posições 4 e 5 (MOSER & BENDICH, 1991), determinando dois pares de estereoisômeros: Os ácidos *L* e *D* ascórbico (Figura 1 A e B, respectivamente) e os ácidos *D* e *L* isoascórbicos (Figura 1 C e D, respectivamente). São epímeros (par de diastereômeros que diferem entre si somente na configuração de um único átomo) os ácidos *L*-ascórbico e *D*-isoascórbico e os ácidos *D*-ascórbico e *L*-isoascórbico.

A designação estereoquímica *L* para a vitamina C é confirmada pela síntese do ácido ascórbico a partir da *L*-Xilose. É importante notar que este tipo de designação (*L* ou *D*) para estereoisômeros praticamente só é adotado atualmente em bioquímica. Este sistema foi sugerido por M. A. Rosanoff, Universidade de Nova Iorque, no início do século 20 e utiliza os gliceraldeídos enantioméricos como padrões configuracionais. Dessa forma, uma substância que possui o estereocentro mais distante da função principal, com a mesma configuração do *D*-(+)-gliceraldeído, é designado um estereoisômero *D* desta molécula (SOLOMONS, 1996).

Este tipo de nomenclatura tem a desvantagem de especificar a configuração de somente um estereocentro da molécula (o mais distante). Atualmente, uma outra convenção, proposta por Cahn-Ingol-Prelog que designa os centros quirais como *R* e *S* é norma da IUPAC, para nomenclatura de estereoisômeros. A designação *D*, *L*, tal como *R*,*S*, não é necessariamente relacionada à rotação óptica da substância (+ e - ou *D* e *L*). Desta forma é possível encontrar substâncias que possuem configuração *D* (+) ou *D* (-), e outras *L* (+) ou *L* (-) (SOLOMONS, 1996). Cabe ressaltar que estas designações estabelecem configurações relativas.



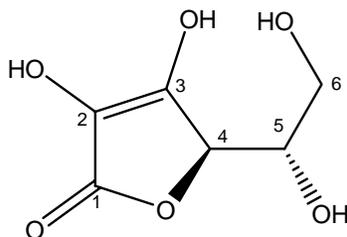
**Figura 1:** Isômeros do Ácido ascórbico e radical livre (ascorbato).

O radical livre ascorbato (ascorbil - HA), também chamado de ácido monodihidroascórbico ou semidihidroascórbico (Figura 1 E) é formado pela redução do ácido ascórbico com a perda de um elétron. Esta redução é reversível e quando a espécie **HA** se dissocia, forma o radical **A<sup>•</sup>** e com a perda de outro elétron há a formação do ácido dihidroascórbico (PENTEADO, 2003).

## 2.1.2 Propriedades Físico-Químicas

O ácido ascórbico possui peso molecular 176. Puro apresenta-se sob a forma de cristais brancos com ponto de fusão de  $191 \pm 1^\circ\text{C}$ . Em preparos impuros ou produtos naturais a vitamina C é oxidada em contato com o ar e luz. Sua solubilidade é de 1g em: 3mL de água, 30mL de álcool etílico 95%, 50mL álcool etílico absoluto, 100mL de Glicerina ou 20mL de Propileno Glicol, respectivamente. É insolúvel em Éter, Clorofórmio, Benzeno, Éter de Petróleo, óleos e gorduras. A rotação óptica  $[\alpha]_D^{25}$  é de +20,5 a +21,5 (MERCK & CO, INC., 1976).

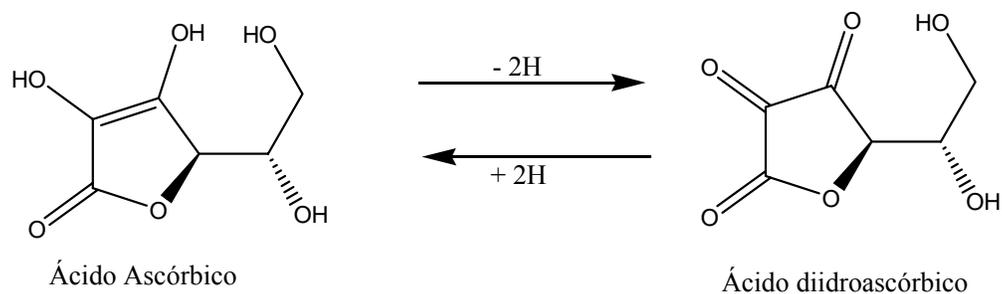
O ácido *L*-ascórbico é forte agente redutor, possui um anel 1,4 lactona estável (ROIG *et al.*, 1993) e deriva de açúcares (hexoses). Apresenta características ácidas apesar de não possuir grupos carboxílicos, pois, devido à subestrutura de enediol nos carbono 2 e 3 (Figura 2) no anel da lactona, as hidroxilas apresentam acidez. O Hidrogênio ligado da hidroxila em no Carbono 3, por exemplo, é altamente ácido ( $pK_1=4,17$ ). A oxidação reversível (perda de 1 elétron) para o radical semidiidroascórbico e depois para o ácido *L*-diidroascórbico é a propriedade química mais importante e a base da atividade fisiológica da vitamina C (MOSEK & BENDICH, 1991).



**Figura 2:** Átomos de carbono no ácido ascórbico.

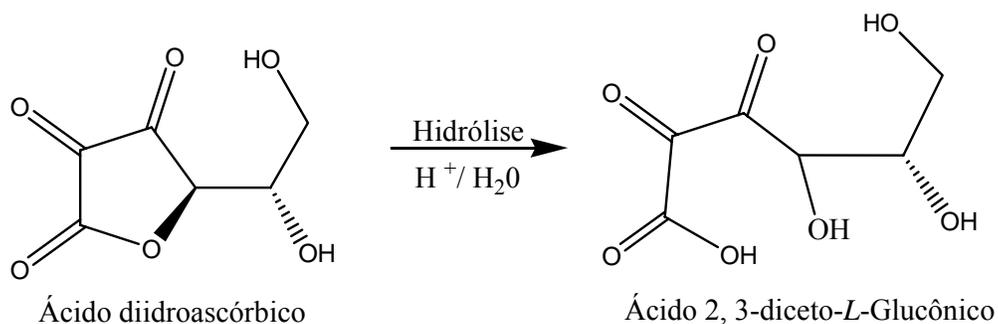
## 2.1.3 Ácido diidroascórbico (DIA)

O ácido diidroascórbico é a forma oxidada do ácido ascórbico (Figura 3) e possui atividade vitamínica idêntica a este por que é facilmente reduzido e novamente retido como ácido ascórbico nos tecidos intracelulares (NAIDU, 2003).



**Figura 3:** Reação de oxidação do ácido ascórbico a ácido diidroascórbico.

O ácido diidroascórbico 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, entre outros. Como é extremamente lábil, pode ser rapidamente hidrolisado a ácido 2,3- diceto-*L*-Glucônico (Figura 4) em pH neutro e 37°C, através de uma abertura irreversível no anel da lactona. (BIANCHI *et al.*, 1985). O ácido 2,3-diceto-*L*-Glucônico não tem atividade antiescorbútica e a hidrólise é irreversível *in vivo*. Há também evidências da conversão espontânea *in vitro* do DIA à ácido *L*-Isoascórbico (Figura 1 D). A conversão é maior com o aumento da temperatura e pH alcalino, sendo evidenciada por um aumento de absorvância da radiação UV à 265nm (JUNG *et al.*, 1997).



**Figura 4:** Degradação do ácido diidroascórbico.

#### 2.1.4 Ácido eritórbico

Também chamado de ácido *D-eritoascórbico*, ácido *D-isoascórbico* ou ainda ácido araboascórbico, não é encontrado livre na natureza, mas pode ser encontrado em

várias espécies de fungos ao passo que seu enantiômero ácido *L*-eritórbico é detectado como produto do catabolismo do ácido *L*-ascórbico em animais (LOEWUS, 1999).

Observando a estrutura da vitamina C e do ácido *D*-eritórbico (Figura 1 A e C, respectivamente) pode-se perceber que estes diferenciam-se somente na configuração espacial do Carbono 5, onde há uma reversão do hidrogênio e da hidroxila em relação ao plano da molécula (GEIGERT *et al.*, 1981). Esta similaridade dificulta a diferenciação dos dois compostos que é baseada em relação ao grupo enediol do anel lactona comum a ambos, mas é suficiente para determinar que o ácido *D*-eritórbico possua somente 5% da atividade vitamínica atribuída ao ácido *L*-ascórbico (HIDIROGLOU *et al.*, 1998). Esta significativa falta de atividade biológica torna o ácido *D*-eritórbico um agente redutor, mas não um nutriente ao passo que o ácido *L*-ascórbico é um antioxidante e um nutriente. Por razões econômicas, o ácido *D*-eritórbico é freqüentemente utilizado como antioxidante em alimentos (BEHRENS *et al.*, 1994), substituindo a vitamina C.

### 2.1.5 A vitamina C na história

Pode-se dizer que ao longo da história da humanidade e avanços na pesquisa científica, a vitamina C foi várias vezes redescoberta quanto as suas inúmeras propriedades fisiológicas.

**Tabela 1:** A vitamina C na história

---

<b>400 AC</b>	• Os sintomas do escorbuto foram descritos por Hipócrates.
<b>1747</b>	• James Lind receita laranjas e limões como cura para o escorbuto em marinheiros.
<b>1907</b>	• Axel Holst e Teodor Frolich induziram escorbuto em porquinhos da índia
<b>1912</b>	• Funk postulou o conceito de uma vitamina antiescorbútica
<b>1917</b>	• Chick e Hume fizeram bioensaios para determinar as propriedades anti-escorbúticas de alimentos.
<b>1921</b>	• Zilva e colaboradores isolaram a atividade antiescorbútica em limões <i>in natura</i> . Como os fatores de crescimento haviam sido chamados de A e B, J. C. Drummond propôs chamar o fator antiescorbuto de C, o qual posteriormente tornou-se vitamina C.

---

- 
- 1928** • Albert Szent-Gyorgyi isolou uma substância redutora a partir de glândulas supra renais e o chamou de ácido hexurônico.
  - 1932** • King e Waugh descobriram um composto idêntico ao ácido hexurônico em suco de limão.
  - 1932** • Haworth e Hist estabeleceram a estrutura química da vitamina C.
  - 1933** • Szent-Gyorgyi, Hist e Haworth sugeriram o uso do nome ácido *L*-ascórbico para a vitamina C, como inferência à suas propriedades antiescorbúticas.
    - T. Reichstein publicaram as sínteses do ácido *D*-ascórbico e *L*-ascórbico que ainda hoje são a base da produção industrial de vitamina C.
  - 1937** • Norman Haworth ( química) e Albert Szent-Gyorgyi (medicina) receberam o prêmio Nobel por seus trabalhos com a vitamina C.
  - 1970** • O Professor Linus Pauling, único ganhador de dois prêmios Nobel, gerou controvérsia ao afirmar que altas doses diárias de vitamina C poderiam prevenir doenças como a gripe e o câncer.
  - 1975-79** • Estudos experimentais *in vitro* provaram as propriedades anti-oxidantes e de extinção de oxigênio singlete pela vitamina C.
  - 1982** • Niki demonstrou a regeneração da vitamina E pela vitamina C.
  - 1985** • As necessidades mundiais de vitamina C foram estimadas em 30.000-35.000 toneladas por ano.
  - 1988** • O Instituto Nacional do Câncer (EUA) reconheceu a relação inversa entre a ingestão de vitamina C e várias formas de câncer e emite indicação para aumento da vitamina na dieta.
- 

Fonte: Adaptado de Lester *et al.*, 1997.

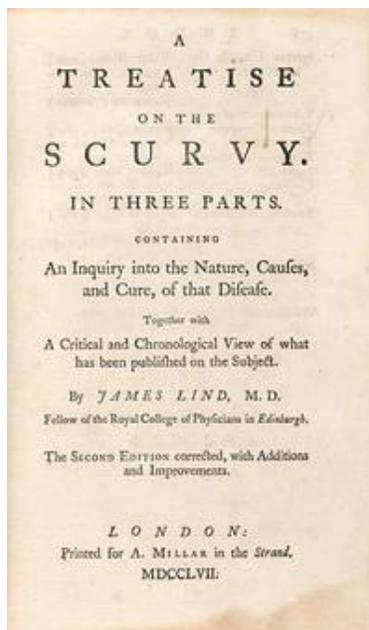
### **2.1.6 Atividade vitamínica**

A atividade vitamínica do ácido ascórbico é medida em termos de 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 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 capilar (Figura 5) (BASU *et al.*, 1982). O escorbuto apareceu ao longo da história como um grande vilão nas campanhas militares e nas navegações, onde a dieta dos soldados ou marinheiros não continha quantidades adequadas de vitamina C. Estima-se que aproximadamente 1.000.000 de pessoas tenham morrido devido ao escorbuto no período de 1600 a 1800. Do século XV ao século XVIII muitas observações foram feitas com respeito à cura desta doença e à alimentação com determinados alimentos frescos até que um cirurgião da marinha britânica chamado James Lind (Figura 6) conduziu, provavelmente, o primeiro estudo clínico controlado da história da medicina, provando que a falta de um determinado componente da dieta provocava a doença e que laranjas e limões eram os melhores remédios contra a mesma (CARPENTER, 1966). A dose diária média de vitamina C necessária para prevenir o escorbuto é 46 mg (ARONSON, 2001). No Brasil, a Ingestão Diária Recomendada (IDR) é de 60mg (ANVISA, 1998).



**Figura 5:** Sintoma do escorbuto: fragilidade capilar



**Figura 6:** Capa do livro histórico de James Lind (segunda edição 1757): “A treatise on the Scurvy”, Museu Nacional da Marinha, Inglaterra.

### 2.1.7 A controvérsia Linus Pauling

Linus Pauling, revolucionou o conceito das ligações químicas. Foi um dos primeiros químicos a reconhecer a importância da mecânica quântica. Sua teoria da ressonância explicou muita coisa que até então confundia os químicos orgânicos tais como as propriedades dos anéis benzênicos, tornou-se uma autoridade em ligações de hidrogênio e propôs a teoria das ligações metálicas (NYE, 2000). Defendeu e, juntamente com seus colegas, estabeleceu a existência de estruturas helicoidais em proteínas (REIF, 2000). Sua habilidade intuitiva para entender e interpretar complexas estruturas moleculares é famosa, recebendo o prêmio Nobel de química pelos postulados da Teoria da ressonância em 1954. Pauling também era profundamente sensível ao bem estar da humanidade e trabalhou energicamente para despertar a consciência da sociedade sobre suas novas responsabilidades numa era nuclear. Participou de muitos tribunais e debates públicos, e por isso foi premiado com o Nobel da paz em 1962 (NYE, 1999).

Em 1960, Linus Pauling usou pela primeira vez o termo ortomolecular, lançando as bases para este ramo da medicina. A medicina ortomolecular é o uso terapêutico de altas doses de vitaminas para tratar doenças crônicas. Este ramo da medicina visa

melhorar a saúde e tratar as doenças usando concentrações ótimas de substâncias normalmente presente no corpo (WEISS, 1998). Na prática, seria a correção das moléculas do organismo, que faz uso de produtos industrializados, com vitaminas e oligoelementos para manter ou restaurar o equilíbrio.

Ao estudar a vitamina C e constatar sua ausência de toxicidade, Pauling publicou o livro *Vitamina C e o resfriado comum* (em 1970) e irritou o meio científico. No livro, afirmava que ao tomar 1g de vitamina C por dia, a incidência de resfriados seria reduzida em 45% na maioria das pessoas, mas algumas pessoas poderiam necessitar de doses muito maiores. Ele mesmo aumentou sua suplementação gradualmente de 3 g/dia nos anos 60 para 18 g/dia nos anos 90 e chegava a 40g quando os primeiros sintomas de um resfriado apareciam (PAULING, 1982).

As afirmações e métodos de Pauling com relação à vitamina C foram bastante questionados, principalmente por que ele não fez experimentos próprios e sim derivou suas conclusões de estudos prévios (HEMILÄ,1996). Desde as declarações de Pauling em 1970, aproximadamente 30 experimentos científicos foram feitos em todo mundo para tentar provar a eficiência ou não da vitamina C em evitar resfriados e a maioria destes afirma que a alegação de Pauling não tem sustentação, exceto por uma redução insignificante na severidade dos sintomas (TRUSWELL, 1986). Por outro lado, alguns estudos questionam as doses utilizadas nestes experimentos e afirmam que os níveis de vitamina C no sangue são reduzidos durante um episódio de um resfriado (HEMILÄ,1992). No que diz respeito a ingestão de altas doses de vitamina C e seu efeito sobre gripes e resfriados, estudos terapêuticos bem planejados devem ainda ser executados para se obter estimativas quantitativas das doses ótimas e efeitos terapêuticos máximos para entender a diferença potencial entre vários grupos de pessoas (HEMILÄ, 1999).

As declarações de Pauling, porém, não se ativeram ao resfriado comum ou gripe. Em suas teorias, chegou a postular que a vitamina C seria capaz de prevenir o câncer e até mesmo aumentar a sobrevivência de pacientes terminais (AUSTIN *et al.*, 1995). Este procedimento, no entanto, também é questionado por grupos de médicos que afirmam que a vitamina C pode atrapalhar o mecanismo oxidante de ação dos tratamentos quimioterápicos e radioterápicos (DRISKO *et al.*, 2003). Linus Pauling também afirmava que a vitamina C, por sua conhecida capacidade de proteger os tecidos e participar na síntese do colágeno, teria grande importância na proteção e fortalecimento de vasos e artérias (RATH *et al.*, 1990). A diminuição dos níveis de vitamina C no

sangue faria com que o organismo necessitasse proteger as artérias (estas sofrem maior desgaste natural devido à intensidade do trabalho mecânico que executam) utilizando lipoproteínas (placas de gordura).

Outra teoria interessante afirma que o ser humano sofre de escorbuto crônico e que na verdade as doses IDR servem somente para evitar o aparecimento do escorbuto. O médico Albert Szent-Gyorgyi, ganhador do prêmio Nobel pelo descobrimento da vitamina C confirma esta teoria com a seguinte observação: “falta de ácido ascórbico causa escorbuto, então se não há escorbuto, os médicos assumem que não há falta de ácido ascórbico no organismo. O único problema é 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 o escorbuto e saúde completa”. Diante de tantas teorias ainda não comprovadas sobre a vitamina C resta uma grande dúvida sobre qual seria o teor ideal para ingestão diária (CARR *et al.*, 1999).

Alguns cientistas questionam a alta ingestão de suplementos de vitamina C sugerindo que esta pode levar ao acúmulo de ácido oxálico no organismo (produto de degradação do ácido ascórbico) e a formação de cálculos renais. Alega-se até mesmo que pode haver escorbuto de rebote quando os níveis baixam subitamente, ou seja, a suplementação deixa de ser ministrada por qualquer motivo. Os defensores de Pauling e suas teorias, porém, refutam estes argumentos alegando que até hoje não foi comprovada toxicidade alguma para a vitamina C (KLENNER, 1971).

### **2.1.8 Síntese do ácido ascórbico**

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 organismo (MOSER & BENDICH, 1991). Desta forma a necessidade de ingestão desta vitamina é vital para a saúde e até mesmo para a sobrevivência do homem, pois o ácido ascórbico participa de inúmeras atividades fisiológicas.

Um gene defeituoso no genoma humano impede a produção da enzima *L*-gulonalactona oxidase (GLO) e desta forma os seres humanos não conseguem transformar a glicose do sangue em ácido ascórbico. A maioria dos mamíferos não primatas tem esta capacidade e possuem um mecanismo de retorno através do qual o fígado aumenta a síntese de ácido ascórbico em resposta a um “stress” fisiológico

(STONE, 1984). Insetos, Répteis, alguns pássaros e peixes também não são capazes de sintetizar o ácido ascórbico.

O metabolismo do ácido ascórbico em plantas é pouco conhecido e mesmo sua síntese ainda hoje é questão de especulação, ao passo que a biosíntese em animais foi elucidada desde os anos 60 (DAVEY *et al.*, 2000).

Os suplementos de vitamina C, disponíveis comercialmente também são sintetizados a partir da glicose e praticamente liberaram o ser humano da total dependência de alimentos naturais como fonte desta vitamina (DAVEY *et al.*, 2000).

### **2.1.9 Propriedades bioquímicas e fisiológicas da vitamina C**

A maioria das funções bioquímicas do ácido ascórbico são consequência de sua habilidade em doar um ou dois elétrons. O ácido ascórbico participa da biosíntese de aminoácidos, formação da adrenalina (YAHIA *et al.*, 2001), fixação de ferro, induz a síntese do colágeno, funciona como anti-inflamatório e anti-histamínico, previne doenças como resfriados e escorbuto (ANTONELLI *et al.*, 2002), recicla a vitamina E, participa na hidroxilação da prolina para formar a hidroxiprolina, auxilia na oxidação da tirosina e da fenilalanina e na conversão de folacina em ácido tetra-hidrofólico (PENTEADO, 2003).

Devido à sua grande atividade anti-oxidante é associado a profilaxia de doenças como arteriosclerose e câncer (GARDNER *et al.*, 1999). O ascorbato (ânion do ácido ascórbico formado em soluções aquosas) bloqueia a formação de compostos nitrogenados que dão origem às nitrosaminas, uma classe de compostos carcinogênicos formados quando estes compostos nitrogenados reagem com nitritos no trato estomacal (MOSER & BENDICH, 1991).

### **2.1.10 Propriedades anti-oxidantes**

A relação entre os níveis de ácido ascórbico e ácido diidroascórbico podem servir como indicador do estado de oxigenação de uma célula. O “stress” oxidativo tem importante contribuição em inúmeros processos degenerativos e doenças crônicas; evidências experimentais correlacionam a produção de Espécies Oxigênio Reativas (EOR) com o dano biológico que produz a base para a inicialização e/ou progressão

destas doenças (McCALL *et al.*, 1998). Os maiores danos oxidativos causados pelos radicais livres passíveis de ocorrer *in vivo* são com lípidios, DNA e proteínas.

As modificações nas proteínas podem resultar em mudanças na sua carga e/ou conformação e produção de ligações cruzadas (ARGIROV *et al.*, 2003). A vitamina C é a principal vitamina antioxidante que pode retirar diretamente oxigênio singlete, radicais superóxido e hidroxil, além de inibir a oxidação de colesterol LDL (Low Density Lipoprotein) (YARDIM-AKAYDIN *et al.*, 2003). Podem ser responsáveis também pela redução da aderência e estabilidade das placas de gordura nos vasos e artérias (MOSCA *et al.*, 1997). Estudos *in vitro*, usando plasma humano, demonstraram que a vitamina C forma a primeira linha de defesa contra a peroxidação de lipídios induzida por inúmeros oxidantes, embora *in vivo* não haja estudos suficientes, pois uma das maiores limitações para este tipo de estudo é a não aplicabilidade da maioria dos métodos utilizados para dosagem de capacidade antioxidante em estudos *in vivo* com seres humanos (McCAL,1998).

#### **2.1.11 Vitamina C nos alimentos**

Uma acurada e específica determinação do teor de um nutriente em alimentos está se tornando extremamente importante à medida que pesquisadores aprendem mais sobre a relação entre a ingestão destes na dieta e a saúde humana (GÖKMEN *et al.*, 2000). As vitaminas são substâncias essenciais ao processo metabólico que ocorre na nutrição de seres vivos. A vitamina C é a mais importante vitamina para a nutrição humana e está presente em frutas e vegetais.

Recomendações de dieta para uma alimentação saudável incluem o consumo de frutas e vegetais frescos. Estes dois grupos de alimentos fornecem mais 90% da vitamina C da dieta humana e entre estes estão principalmente as frutas cítricas e a batata, em função de seu alto consumo, principalmente no ocidente (LEE *et al.*, 2000). Frutas como a acerola, que dependendo do estágio de desenvolvimento chegam a possuir pouco mais de 2 gramas de vitamina C por 100g de fruta, garantem excelente suplemento natural de vitamina C (VENDRAMINI *et al.*, 2000; ASSIS *et al.*, 2000).

No caso de não haver suplementação de vitamina C, uma dieta balanceada deverá suprir a IDR desta vitamina. O leite de vaca, por exemplo, possui baixo teor de ácido ascórbico e este ainda sofre perdas devido a presença de ar, luz e as altas temperaturas usadas na pasteurização e esterilização (ESTEVE *et al.*, 1994). Casos de

escorbuto infantil já foram relatados devido à alimentação exclusiva de lactentes com leite de vaca. Os teores de vitamina C em leite humano, por sua vez, são suficientes para manter os níveis necessários contra o escorbuto (NYSSÖNEM *et al.*, 1988). Níveis de ácido ascórbico e concentração de leucócitos, respectivamente, abaixo de 0,2mg/dL e  $2\text{mg}/10^8$  células no plasma, indicam deficiência de vitamina C (MOSER & BENDICH, 1991).

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 alimentos (ASHOOR, *et al.*, 1982). 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) (CHEFTEL *et al.*, 1977) ou 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 (NAGARAJ *et al.*, 1995), o produto destas reações também alterações de cor em sucos de fruta e ressecamento de alimentos em geral (PISCHETSRIEDER, 1996).

Devido às suas propriedades redutoras, o ácido ascórbico é também é amplamente usado na indústria de alimentos como anti-oxidante para aromatizantes e gorduras em geral, para cura de carnes, em farinha para melhorar a textura das massas, em cerveja como estabilizante e principalmente para enriquecimento de vitamina C (ASSIS *et al.*, 2000). A utilização da vitamina C no pão é bastante importante, principalmente depois da proibição do uso de bromato de potássio (LU *et al.*, 1998). O ácido ascórbico e o ácido diidroascórbico existem como um par redox, este equilíbrio  $\text{AA} \rightleftharpoons \text{DIA}$  permite que no pão o ácido ascórbico seja utilizado com a função de oxidante, e como antioxidante em outros alimentos (LOOKHART *et al.*, 1982).

No processamento dos alimentos, ocorrem reações químicas e bioquímicas que são dependentes da temperatura. Estas reações não somente destroem os microorganismos, mas também destroem nutrientes importantes como as vitaminas. A destruição das vitaminas é uma reação de primeira ordem, similar a de destruição dos microorganismos (GHANI *et al.*, 2002), isto é, diretamente proporcional à temperatura empregada.

A conservação da vitamina C em alimentos processados necessita de muitos cuidados. Um congelamento rápido pode produzir perdas por oxidação com a destruição

das membranas dos tecidos vegetais e liberação de enzimas como as oxidases que entram em contato com o ácido ascórbico. As perdas na lavagem e cozimento dão-se, primeiramente, por difusão da vitamina C em água. A batata, por exemplo pode perder até 50% do conteúdo após o cozimento (CHEFTEL *et al.*, 1977).

Nos estudos de pós-colheita é vital entender a evolução da produção e perdas de vitamina C durante o desenvolvimento do vegetal, maturação e senescência, principalmente na estocagem. Estas informações podem determinar o tempo de colheita ideal para conseguir o maior teor de vitamina C, meios para melhorar sua produção e diminuir as perdas desta vitamina (YAHIA, 2001). Da mesma forma em produtos frescos pronto para o consumo, as operações como seleção, descasca, fatiamento e sanificação causam aumento da atividade enzimática e aceleração de reações fisiológicas com a conseqüente perda de ácido ascórbico (PIGA *et al.*, 2003).

## **2.2 Métodos analíticos mais comuns para a determinação de ácido ascórbico**

A determinação de vitaminas em alimentos é um desafio analítico devido à necessidade de quantificação em matrizes diferentes, os baixos níveis de concentração encontrados em matrizes não fortificadas, as várias formas químicas e a sensibilidade da maioria destas ao aquecimento, luz, pHs extremos, presença de enzimas e exposição ao ar (ALMAGRO *et al.*, 2002).

Existem várias técnicas analíticas e inúmeros métodos para determinar o teor de vitamina C em alimentos, produtos farmacêuticos (na maioria suplementos vitamínicos) e material biológico. Toda técnica possui vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas principalmente pela acurácia e também pelo ponto de vista econômico. A maioria dos equipamentos requeridos para uma análise instrumental do teor de vitamina C tem custo elevado e utilizam tecnologia de ponta o que requer treinamento especializado e manutenção periódica (preventiva). A escolha de um método para análise de vitamina C deve, então, levar em conta os tipos de matrizes a serem analisadas e seus interferentes frente os recursos analíticos disponíveis.

Os testes biológicos para determinação de vitamina C estão em desuso, sendo usados hoje somente para dosagem de atividade vitamínica de derivados do ácido ascórbico (MOSER & BENDICH, 1991).

O método titulométrico é considerado um método oficial da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) e baseia-se na redução do corante 2,6-diclorofenol-

indofenol pelo ácido ascórbico. Este método apresenta como única vantagem o baixo custo, mas é extremamente sujeito à presença de interferentes que são também redutores como a cisteína, taninos, fenóis, tiosulfatos, dentre outros (PENTEADO, 2003). A análise de substâncias coloridas necessita de uma etapa de limpeza da amostra (“clean up”) visando retirar corantes como antocianinas, que interferem na visualização do ponto de viragem. Este tipo de limpeza pode ser feita em cartuchos de fase estacionária tipo C18 (RAPISARDA *et al.*, 1996). Este método também não quantifica diretamente o teor de ácido diidroascórbico, pois este já se encontra oxidado (KABASAKALIS *et al.*, 2000).

Métodos espectrofotométricos são bastante laboriosos uma vez que várias etapas são necessárias para a retirada de interferentes que podem fornecer alguma absorvância de radiação UV. Em geral utilizam dois princípios básicos para a quantificação do ácido ascórbico: um indicador tipo redox ou uma reação de derivatização onde há produção de um grupo cromóforo. Os reagentes redox utilizados podem ser 2,6-diclorofenol-indofenol ou íons metálicos como Ferro III ou Cu II com um agente complexante (GÜÇLÜ *et al.*, 2004).

Os métodos com derivatização incluem reagentes como 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH), diazotos e *o*-fenileno-diaminas (OPDA) (PACHLA *et al.*, 1985). Apesar das etapas de limpeza de amostra, ainda há relatos de interferência que variam entre 30-50% da absorvância total com o método de DNFH em algumas matrizes biológicas (DABROWSKI *et al.*, 1989).

O método microfluorimétrico baseia-se na oxidação do ácido ascórbico a diidroascórbico (DIA) e posterior derivatização por *o*-fenilenodiamina para formação de fluoróforo. (AOAC, 1967). É um método vantajoso do ponto de vista nutricional, pois fornece valores de vitamina C total e permite quantificação de baixos níveis de DIA. (WILLS *et al.*, 1983). Possui a desvantagem de necessitar de determinações em branco, devido à interferência química na reação de produção do fluoróforo que pode ser fonte de erros (SPEEK *et al.*, 1984).

Nos primeiros métodos enzimáticos reportados era necessário isolar a enzima de material vegetal e por isso poucos métodos práticos foram desenvolvidos. Atualmente a enzima ácido ascórbico oxidase está disponível comercialmente em forma de kits (GÖKMEN *et al.*, 2000), o que torna o método mais executável no sentido de rapidez de preparo. Este método tem a vantagem do ácido ascórbico ser quantificado especificamente após a reação com a enzima. Há também relatos de eletrodos

ascorbato-seletivos à base de ácido ascórbico oxidase imobilizada em colágeno que permaneceram estáveis por 3 semanas (PACHLA *et al.*, 1985). A grande desvantagem deste método é o alto custo da enzima empregada.

A maioria dos métodos eletroquímicos comuns são extremamente laboriosos, mas aqueles que se baseiam no uso de eletrodos de membrana específicos para um determinado composto, são mais práticos. Entre eles estão eletrodos íon seletivos à base de Cu (II), iodeto, Co (II) e ácido ascórbico oxidase. Há também métodos voltamétricos com eletrodos à base do composto grafite-epoxi ou fibra de carbono (VERDINI & LAGIER, 2000). Estes métodos requerem poucos passos para preparo da amostra (ESTEVE *et al.*, 1995), mas equipamentos mais modernos possuem a desvantagem de necessitarem de reagentes e eletrodos muito específicos, nem sempre disponíveis ou de custo acessível, também devido à vida útil destes últimos que é restrita.

### **2.3 Cromatografia**

Esta técnica pode ser definida como um método físico de separação na qual os componentes de uma amostra a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fixa e de grande área superficial denominada fase estacionária e um fluido que percola a fase estacionária e por isto é chamado de fase móvel (LANÇAS, 1993). A separação entre dois, ou mais, componentes de uma amostra, resultará da diferença de suas constantes de equilíbrio entre estas duas fases (AQUINO NETO & NUNES, 2003).

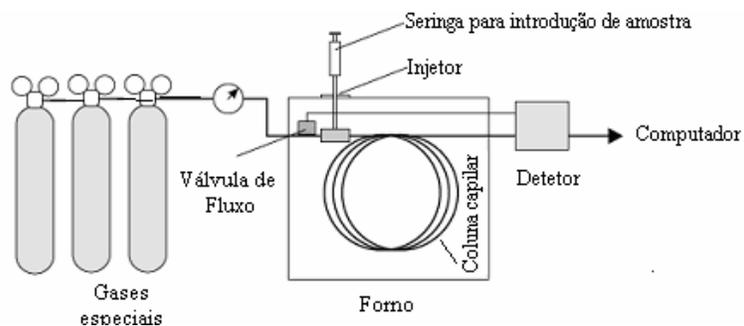
No início do século XX, o botânico russo M. Tswett conseguiu separar pigmentos de plantas em uma coluna de vidro com carbonato de cálcio e foi o primeiro a utilizar o termo cromatografia para descrever as zonas coloridas dentro da coluna de vidro (daí a origem do nome cromatografia). Pouco antes disso D. T. Day separou frações de petróleo utilizando a mesma técnica. A Tswett, no entanto, é atribuída a honra de ter sido o primeiro a interpretar o processo cromatográfico como é aceito hoje (LANÇAS, 1993).

A cromatografia permaneceu praticamente ignorada até a década de 30 quando os pesquisadores Kuhn e Lederer conseguiram separar alfa e beta carotenos. Em 1952 Martin e James introduziram a cromatografia a gás, mas apesar do primeiro experimento de cromatografia ter sido uma forma de cromatografia líquida, só a partir de 1969 a CLAE começou a ser desenvolvida devido a utilização de altas pressões (CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000).

### 2.3.1 Cromatografia gasosa

Cromatografia gasosa (CG) é uma técnica de separação em que a fase móvel é um gás e a fase estacionária pode ser um líquido ou um sólido. Esta técnica é um dos procedimentos mais utilizados nos laboratórios modernos, pois, devido à sua excelente sensibilidade, é capaz de separar e detectar centenas de compostos termolábeis simultaneamente (CECCHI, 2003).

A instrumentação em GC consiste basicamente de um sistema de injeção de amostras na qual estas são vaporizadas e carreadas pela fase móvel (gasosa) para o interior de uma coluna cromatográfica (Figura 7). A coluna se localiza em um compartimento denominado forno cromatográfico, onde a temperatura de aquecimento é controlada por micro processadores (Figura 7). Após interagir diferencialmente com a fase estacionária da coluna, os componentes da amostra eluem desta e chegam até um detector que percebe a presença do componente e emite um sinal elétrico geralmente proporcional à concentração desta espécie química (Figura 7) (CECCHI, 2003).



**Figura 7:** Esquema descritivo da instrumentação básica em cromatografia gasosa (CG).

A cromatografia gasosa pode ser dividida em convencional (CG) e de alta resolução (CGAR). A CG utiliza colunas de aço com diâmetro interno entre 2 e 4mm e altas vazões de gás de arraste (10-60mL/min). Estas colunas são recheadas com um suporte inerte e, normalmente, uma fase líquida depositada ou quimicamente ligada ao suporte. Os comprimentos destas colunas variam de 1,5 à 6m e a eficiência é pequena comparada com as colunas tubulares abertas.

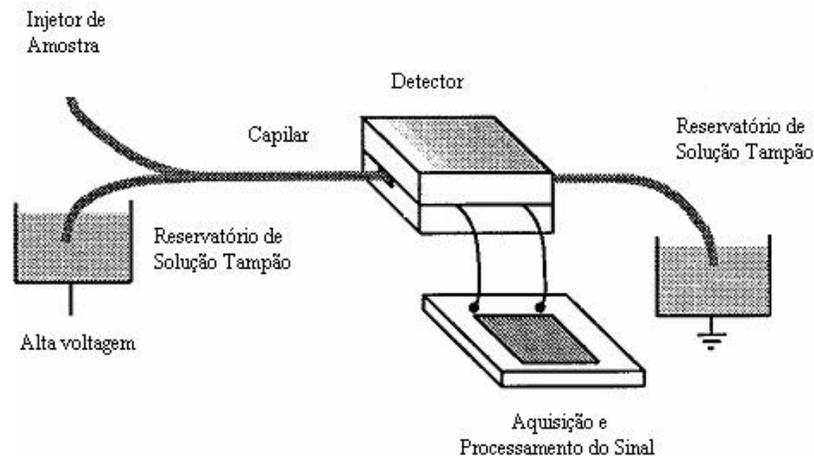
A CGAR utiliza colunas tubulares abertas de sílica fundida ou vidro onde um filme líquido de fase estacionária é depositado. Estas colunas possuem um DI de 0,2 à 0,7mm e comprimento variando entre 5 e 50m. As vazões de gás de arraste são reduzidas ( 0,5-15mL/min), sendo necessária adaptação nos injetores e detectores da CG , pois as quantidades de amostras também são mínimas. A CG dita convencional foi utilizada até o início da década de 80 quando começou a dar lugar à CGAR. Pode-se dizer que hoje a Cromatografia gasosa convencional praticamente não é mais utilizada, isto ocorreu devido a grande diferença de eficiência de separação, pois na Cromatografia gasosa de alta resolução os picos são extremamente finos e bem resolvidos permitindo análises mais rápidas.

O grande desafio da CGAR atualmente é o aperfeiçoamento das técnicas de injeção de forma que os espalhamento da banda cromatográfica após esta seja minimizado. Há dois tipos de alargamento de banda: alargamento no tempo, causado pela lenta transferência de amostra da câmara de vaporização para a coluna e alargamento no espaço, onde o soluto sofre espalhamento sobre um trecho da extensão da coluna. Nestes casos é necessário focalizar o soluto antes que a distribuição cromatográfica comece (HYVER & SANDRA, 1989).

### **2.3.2 Eletroforese capilar**

A eletroforese é um método de separação baseado na taxa de migração diferencial de espécies carregadas em uma solução tampão, através da qual é aplicado um campo elétrico de corrente contínua (Figura 8). Esta técnica de separação foi desenvolvida pelo químico sueco Arne Tiselius nos anos 30, para estudos de proteína do sangue (WILLARD *et al.*, 1992).

Esta técnica pode ser sub-dividida em dois tipos principais, eletroforese de gel (acrilamida) e capilar. O primeiro é o método clássico que tem sido utilizado por muitos anos para separar moléculas complexas e de alto peso molecular. As separações ocorrem em uma camada plana de um gel semi-sólido poroso, contendo uma solução tampão aquosa dentro dos seus poros. A amostra é introduzida em bandas sobre a placa, e um potencial de corrente contínua é aplicado durante um período de tempo. Quando a separação é completada, a aplicação da corrente é descontinuada, e as espécies identificadas são visualizadas através de manchas semelhantes às produzidas em cromatografia de camada delgada (SKOOG *et al.*, 1997).



**Figura 8:** Esquema descritivo da instrumentação requerida na técnica de eletroforese capilar (EC).

A eletroforese capilar, por sua vez, surgiu no final dos anos 80, e permite uma alta resolução aliada a velocidades de separação e volumes de amostras excepcionalmente pequenos, de 0,1 a 10nL; em contraste com os microlitros ( $\mu\text{L}$ ) requeridos para a amostra em gel (SOGA & HEIGER, 2000). A eletroforese capilar tem lugar em tubos capilares de sílica fundida, as espécies separadas são eluídas no fim do capilar, então detectores quantitativos de cromatografia líquida de alta eficiência podem ser usados ao invés da técnica de mancha da eletroforese em gel (SKOOG *et al.*, 1998).

Na eletroforese em gel, o aquecimento limita o potencial aplicado por volta de 500V. O longo comprimento e a pequena área do capilar permitem uma resistência excepcionalmente alta para a solução; devido a isto, altos potenciais podem ser aplicados (20.000 a 60.000V). Esses altos potenciais melhoram a velocidade e a resolução de tal forma que a eletroforese capilar normalmente produz 100.000 a 200.000 pratos teóricos de eficiência de resolução, contra os usuais 5.000 a 20.000 pratos típicos de cromatografia líquida de alta eficiência (SKOOG *et al.*, 1998).

Apesar das suas vantagens apresentadas, aspectos da instrumentação, como as dificuldades na introdução da amostra e detecção, devidos aos pequenos volumes envolvidos; bem como a falta de reprodutibilidade em tempo de migração e na

quantificação, devido a instabilidade do fluxo eletrosmótico podem tornar a sua aplicação desvantajosa (TERABE *et al.*, 2001).

Na eletroforese capilar de zona (ECZ) a composição do tampão é constante através da região de separação, o potencial aplicado permite que os diferentes componentes iônicos da mistura migrem de acordo com a sua própria mobilidade (WALLINGFORD & EWING, 1988), e sejam separados em zonas, as quais podem ser resolvidos completamente ou parcialmente sobrepostos (SMITH *et al.*, 1988).

Outra variação na técnica de eletroforese capilar pode ser observada com a eletrocromatografia capilar (ECC), que é um híbrido da eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência. Essa oferece algumas das melhores vantagens de ambas as técnicas (OGURI, 2000). A separação de compostos pode ser conseguida com a partição diferencial entre duas fases (normalmente uma estacionária e outra móvel), a eletromigração diferencial, ou a combinação de ambos (OGURI, 2000).

A técnica de cromatografia capilar eletrocinética micelar (CCEM) envolve a introdução de um surfactante, como dodecilsulfato de sódio, à um sistema de eletroforese capilar de zona (EC). As micelas se formam em soluções aquosas quando a concentração de uma espécie iônica que possui uma longa cadeia hidrocarbônica é aumentada a um nível chamado concentração crítica de micela. Neste ponto os íons começam a formar agregados esféricos. Essas micelas constituem uma segunda fase estável capaz de absorver compostos não polares dentro do interior da cadeia hidrocarbônica, permitindo dessa forma a separação de solutos não carregados (TERABE *et al.*, 2001).

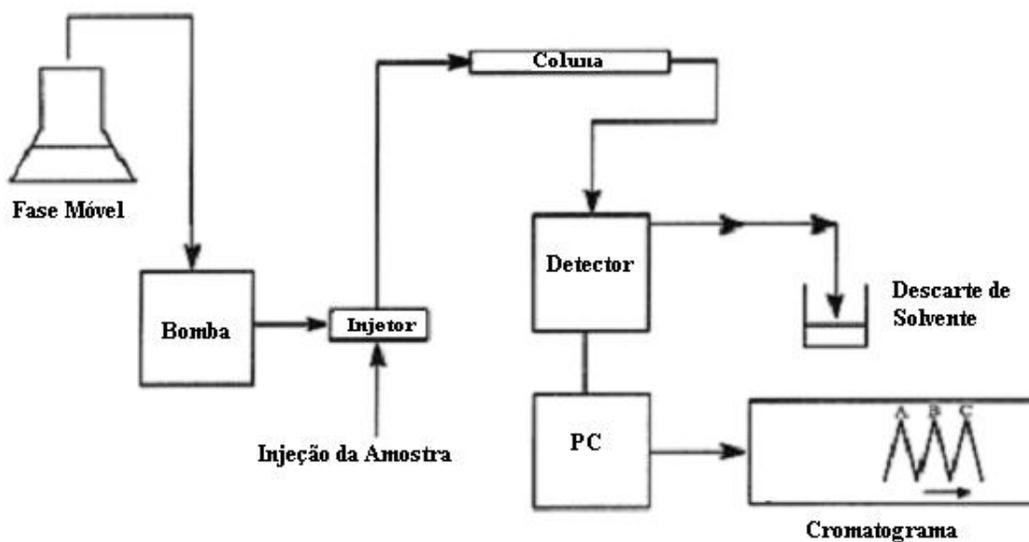
Realmente, a sensibilidade das técnicas por eletroforese capilar são altíssimas, capazes de alcançar limites de detecção na ordem de attomoles ( $10^{-18}$ ), entretanto ainda não está claro como esse nível de sensibilidade pode ser utilizado em práticas de laboratório (COHEN & MICHAUD, 1993).

### **2.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica instrumental que utiliza os princípios da cromatografia líquida clássica em equipamentos (figura 9) que possuem grande acurácia e precisão. Um sistema de CLAE está descrito na figura 10.



**Figura 9:** Modelo comercial de um cromatógrafo líquido.



**Figura 10:** Esquema básico de um cromatógrafo líquido.

### **Reservatório de solvente**

Um sistema moderno de CLAE utiliza um ou mais reservatórios de solvente. Esses reservatórios são frequentemente equipados com meios de remover gases dissolvidos ( $O_2$  e  $N_2$ ), os quais interferem formando bolhas na bomba e no sistema de detecção. Os degaseificadores podem consistir de uma bomba de vácuo que permeia o

ar por tubos de teflon, ou até mesmo um sistema de introdução de gases inertes (He ou Ar).

O solvente é retirado por meio de filtros de aço sinterizado, que impedem que partículas maiores danifiquem os selos e pistões da bomba ou provoquem obstrução nos filtros de entrada da coluna.

### **Bomba e Misturador de Solventes**

Em CLAE, uma separação que emprega um único solvente ultra puro de composição constante é denominada eluição isocrática, mas freqüentemente a eficiência de uma separação é muito melhorada ou até resolvida por eluição com gradiente. Neste caso, dois ou três sistemas de solvente que diferem em polaridade são empregados. Depois que a eluição começa, a taxa de solvente varia de uma forma programada, algumas vezes continuamente, outra vezes em uma série de passos (LINDSEY, 1992). A eluição por gradiente produz efeitos similares àqueles produzidos por programação de temperatura em cromatografia gasosa (SKOOG *et al.*, 1998).

Os requisitos para um sistema analítico de bombeamento de solventes, incluem a capacidade de suportar pressões de até 5.000psi (lb/in<sup>2</sup>), fluxos de 0,1 a 10mL/min, taxas de fluxo livres de pulsação e reprodutiva, resistência a corrosão e ataque químico por parte dos solventes (COLLINS & BRAGA, 1990).

### **Introdução da amostra**

O método de injeção de amostras mais utilizado em cromatografia líquida é baseado na utilização de válvulas rotatórias equipadas com uma pequena tubulação de volume conhecido (“loops”), esse dispositivo pode ser substituído a qualquer momento por outros de volumes diferentes. É importante notar que o diâmetro e o comprimento dessa tubulação define o volume a ser introduzido no sistema. Esse tipo de injeção permite a introdução de amostras sob pressões de até 5000psi com grande precisão e os volumes podem variar de 0,5 a 100µL (sistema analítico). Todo esse processo pode ser automatizado (mediante o uso de injetores automáticos), dispensando a necessidade de manipulação direta da amostra por parte do operador (CECHI, 2003).

### **Fase estacionária, colunas e interações**

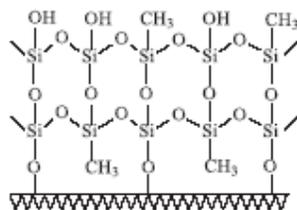
As colunas de cromatografia líquida são normalmente constituídas de uma tubulação altamente polida de aço inox, e diferem entre si em tamanho, diâmetro e tipo

de recheio. A maior parte das colunas analíticas tem uma faixa de comprimento de 10 a 30cm, diâmetro interno de 4 a 10mm, e tamanho de partícula do recheio (fase estacionária) de 3,5 a 10 $\mu$ m (SKOOG *et al.*, 1998).

A fase estacionária mais comum em CLAE é formada por partículas de sílica sintéticas, porosas, esféricas, de grande área superficial e diâmetro em torno de 3-5 $\mu$ m. Estas partículas apresentam normalmente em sua superfície, grupos funcionais silanóis que conferem a este suporte uma grande acidez, mas acima de pH 8 a solubilidade da sílica cresce exponencialmente. Atualmente, resinas poliméricas como estireno-divinilbenzeno tem sido bastante utilizadas como suporte em substituição à sílica. Muitas inovações tem sido feitas na tentativa de otimizar as partículas do suporte, tais como o desenvolvimento de partículas de sílica monolíticas ou híbridas.

O conceito de fases monolíticas à base de sílica foi introduzido recentemente em CLAE. Essas colunas diferem das colunas convencionais por não serem recheadas com partículas porosas de sílica, mas sim com um material poroso que apresenta poros com diferentes tamanhos. Nas colunas convencionais, o material particulado apresenta poros de tamanho de 6 até 30nm, enquanto que na fase monolítica o suporte cromatográfico possui uma estrutura tridimensional, com poros em torno de 10nm e poros de 2 $\mu$ m de diâmetro (SILVA *et al.*, 2004). Essas fases foram desenvolvidas por pesquisadores da Universidade de Kyoto em colaboração com a Merck KGaA da Alemanha. Essas colunas podem ser do tipo C<sub>8</sub> ou C<sub>18</sub> e estão disponíveis comercialmente desde 2000, com o nome de Chromolith Columns<sup>®</sup>.

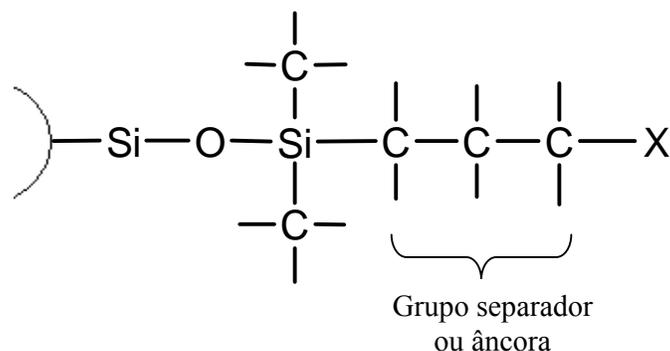
A síntese da sílica híbrida através do processo sol-gel. Foi desenvolvida pela Waters corporation em 2001. Uma mistura de 2:1 tetraetoxissilano (TEOS) e metiltrietoxissilano (MTEOS) sintetiza partículas esféricas de sílica híbrida, com tamanho apropriado e porosidade controlada. A estrutura química das partículas porosas da sílica híbrida, sintetizadas, usando os dois organossilanos, está representada na Figura 11.



**Figura 11:** Estrutura da partícula de sílica híbrida de acordo com o processo sol-gel desenvolvido pela Waters Corporation.

São consideradas como normal (Figura 12) as fases estacionárias que possuem grupos funcionais ligados à sílica que apresentam polaridade, dentre elas pode-se citar a própria sílica, Diol (OH), amino (NH<sub>2</sub>), Ciano (CN) e Fenil (Ø).

As fases estacionárias consideradas reversas são aquelas que possuem grupos funcionais apolares (C8, C18 e C30) quimicamente ligados ao suporte de sílica.



**Figura 12:** Estrutura de uma fase ligada à sílica. X = Ø, OH, CN, NH<sub>2</sub>, C8, C18 ou C30.

As interações entre os componentes de uma amostra dissolvida na fase móvel e a fase estacionária dependem basicamente do tipo de amostra. Desta forma, solutos de alto peso molecular podem ser separados por exclusão de tamanho: uma técnica que geralmente utiliza resinas de porosidade controlada, onde as maiores moléculas tem pouca retenção, e as menores são capazes de penetrar nos poros da resina. Para espécies iônicas de menor peso molecular, a cromatografia de troca iônica é muito empregada, utilizando também resinas poliméricas em cuja extremidade há um grupo trocador de íons (COLLINS & BRAGA, 1990).

Espécies químicas polares de baixo peso molecular são melhores separadas por métodos de partição. Este procedimento é bastante utilizado para separar séries homólogas, e consiste na maioria dos casos, de um filme de fase quimicamente ligada, freqüentemente um hidrocarboneto ( $C_{30}$ ,  $C_{18}$ ,  $C_8$ ) tanto para fase reversa e grupos funcionais polares para fase normal. Desta forma em um método de fase reversa o componente mais polar elui primeiro, e aumentando a polaridade da fase móvel aumenta-se a retenção. Atualmente, aproximadamente  $\frac{3}{4}$  de todas as aplicações em CLAE é realizada em colunas de fase reversa (LINDSAY, 1992).

Cromatografia de adsorção (líquido-sólido) é utilizada para separar espécies não polares, isômeros estruturais e compostos alifáticos. As fases estacionárias utilizadas para este tipo de técnica compreendem somente sílica ou alumina, sendo o componente menos polar aquele que elui primeiro. Diminuindo-se a polaridade da fase móvel aumenta-se a retenção dos componentes. A cromatografia de adsorção não admite solventes aquosos (COLLINS & BRAGA, 1990).

Os analitos podem se distribuir entre as fases móvel e estacionária segundo combinações de polaridade pré-estabelecidas. Na fase normal, a fase estacionária é apolar e a fase líquida é mais polar. Na fase reversa, a fase estacionária é apolar e a líquida é mais polar. No mecanismo de troca iônica onde a fase sólida possui íons que são capazes de reter contra-íons e estes por sua vez são capazes de serem deslocados por íons presentes na amostra. Na exclusão por tamanho a fase sólida possui poros de tamanhos fixos onde moléculas menores são capazes de penetrar, mas moléculas maiores são excluídas. Além destas existem também mecanismos de separação por exclusão iônica, grupos quelantes e afinidade biológica, onde, neste último, há grande afinidade entre o anticorpo da fase estacionária e um analito que induz a formação deste receptor biológico (AQUINO NETO & NUNES, 2003).

As interações intermoleculares são responsáveis pela distribuição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel e a fase estacionária e determinam o grau de separação entre os componentes. As forças de van der Waals ocorrem nas separações por fase reversa, nas separações por fase normal todos os tipos de interações podem ocorrer, já nas separações por troca e exclusão iônica ocorrem interações eletrostáticas.

A adequação do sistema e do processo cromatográfico pode ser medida através de vários parâmetros que avaliam a capacidade de separação do conjunto fase estacionária-fase móvel, são eles:

**Fator de capacidade ou retenção (k)** - É a razão entre o tempo que o soluto permanece na fase estacionária em relação ao tempo que fica na fase móvel (também chamado de relação de partição ou relação de distribuição). Pode ser expresso como:

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

Onde :  $t_r$  = tempo de retenção do soluto  
 $t_o$  = tempo de retenção de um soluto não retido (tempo morto)

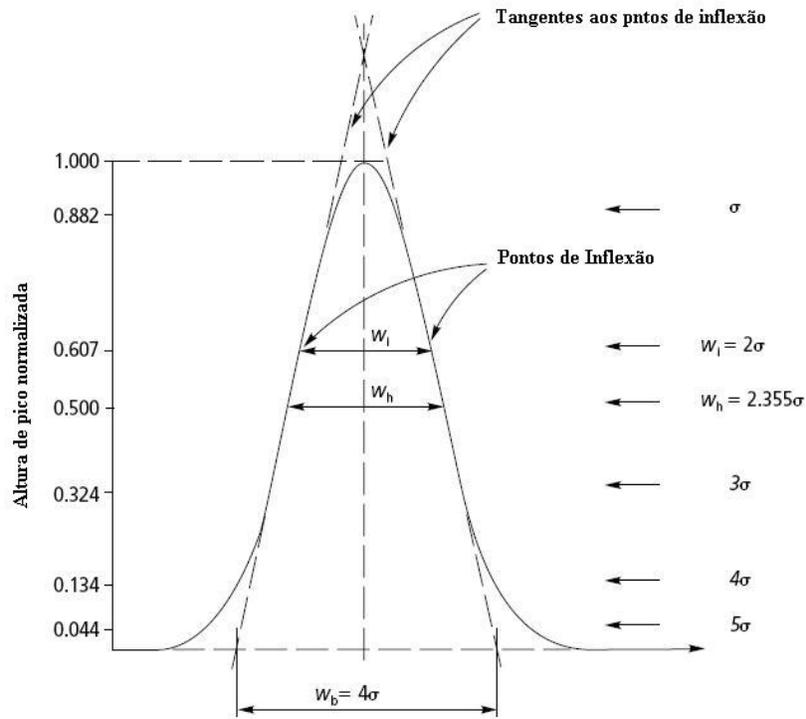
O fator de capacidade está relacionado diretamente com o coeficiente de partição (K ou KD) também chamado de constante de distribuição ou razão de partição.

$$K = \frac{C_{1e}}{C_{1m}}$$

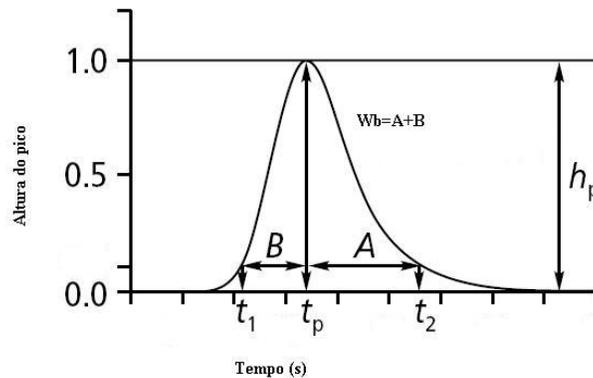
Onde :  $C_{1e}$  = concentração do componente 1 na fase estacionária  
 $C_{1m}$  = concentração do componente 1 na fase móvel

A relação de partição (K) é a medida da distribuição molar do componente entre a fase líquida e gasosa. Sua medida experimental é o fator de capacidade.

**Eficiência** - É a medida do alargamento do plug de soluto através da coluna. É definido em termos do tempo de retenção do soluto e o desvio padrão do pico. Assumindo que a banda possui uma simetria perfeita, ou seja, um aspecto de pico gaussiano (Figura 13), a largura da base será igual a  $4\sigma$  e a largura à meia altura igual a  $2,35\sigma$ . Em um pico com cauda (Figura 14) a medida da largura na base é irregular.

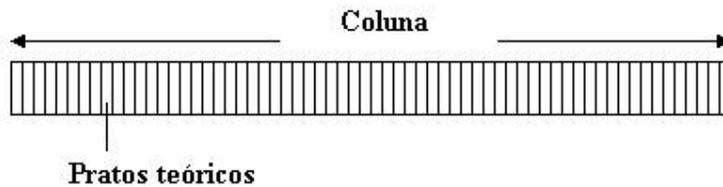


**Figura 13:** Exemplos de larguras de um pico Gaussiano à diversas alturas.



**Figura 14:** Exemplos da medida de largura da base em um pico com cauda.

A eficiência da coluna é expressa em número de pratos teóricos. O conceito de pratos teóricos é proveniente dos estágios em destilação fracionada (Figura 15). A utilização desta terminologia para os dois processos, embora imperfeita, descreve a eficiência de uma coluna cromatográfica. O número de pratos teóricos pode ser definido como a raiz quadrada da razão entre o tempo de retenção e a largura da banda que é dada pelo desvio padrão da curva de Gauss.



**Figura 15:** Conceito de pratos teóricos numa coluna

$$n = \left( \frac{tr}{\sigma} \right)^2$$

onde:  $tr$  = tempo de retenção do composto em mm  
 $\sigma$  = desvio padrão da curva de Gauss  
 $n$  = número de pratos teóricos

O desvio padrão ( $\sigma$ ) de um pico gaussiano pode ser estimado pela sua largura através das da largura da base ou da largura a meia altura, respectivamente:

$$n = 16 \left( \frac{tr}{wb} \right)^2$$

onde:  $wb$  = largura na linha base

$$n = 5,54 \left( \frac{tr}{wh} \right)^2$$

onde:  $wh$  = largura à meia altura

Para o cálculo do número de pratos teóricos nos cromatogramas teste que acompanham cada coluna de fase reversa, os fabricantes geralmente utilizam substâncias que não se ionizam e são de fácil separação como tolueno ou acenafeno. Isto ocorre por que bandas que eluem muito rápido, bandas muito retidas ou que apresentam ionização parcial apresentam baixa eficiência. Este número, portanto, pode facilmente ser manipulado a fim de ser o maior possível.

A CLAE não possui um procedimento padrão para teste de colunas cromatográficas como o teste de Grob em cromatografia gasosa, onde substâncias sondas são utilizadas para verificar parâmetros de eficiência da coluna como atividade ou contaminação (presença de metais, acidez e basicidade) e espessura de filme. Cada

laboratório, portanto, deve manter procedimento de verificação de eficiência das suas colunas, mas quando o objetivo for confirmar se a coluna possui realmente a mesma eficiência declarada no cromatograma-padrão, o exato procedimento descrito pelo fabricante deve ser seguido.

A altura equivalente de um prato teórico é utilizada para comparar a eficiência entre colunas de diferentes comprimentos. Quanto menor a altura do prato teórico, maior será a eficiência da coluna.

$$h = \frac{L}{n}$$

onde: L = comprimento da coluna  
n = número de pratos teóricos  
h = altura equivalente ao prato teórico

A eficiência também pode ser expressa em termos de tempo de retenção ajustado ( $t'_r$ ). O tempo de retenção ajustado corresponde ao tempo real em que uma substância passou interagindo na fase estacionária, pois o volume que passaria na fase móvel ( $t_0$ ) não é levado em consideração.

$$t'_r = t_r - t_0$$

$$N = 5,54 \left( \frac{t'_r}{wh} \right)^2$$

onde: N = número efetivo de pratos teóricos  
 $t'_r$  = Tempo de retenção ajustado.

Do mesmo modo, a altura equivalente a um prato teórico também pode ser expressa em termos de tempo de retenção ajustado:

$$H = \frac{L}{N}$$

onde: H - Altura equivalente a um prato teórico ajustado  
L = comprimento da coluna  
N = número efetivo de pratos teóricos

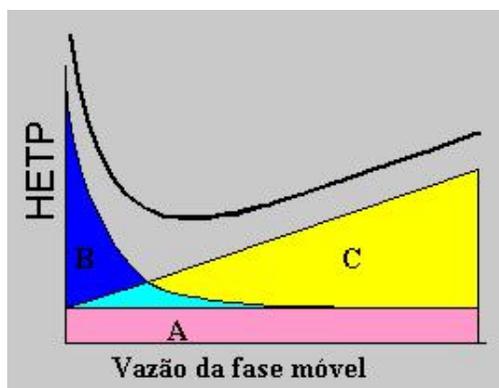
A altura equivalente a um prato teórico é a expressão básica para teorias que descrevem a influência dos parâmetros cromatográficos sobre a eficiência da coluna. A medida da eficiência é uma grandeza adimensional e deve-se levar em consideração que

seus valores variam bastante em função do analito utilizado para sua medida e de sua retenção.

O espalhamento da banda de moléculas de uma substância ao longo do trajeto cromatográfico prejudica extremamente a separação uma vez que uma banda pode penetrar em outra e também prejudica a sensibilidade de detecção uma vez que as moléculas não chegam ao detector rapidamente na forma de um plug, mas sim lentamente espalhadas. É importante notar que a partir do momento da injeção da amostra no sistema cromatográfico, o mesmo tende somente a separar as moléculas das substâncias componentes, não sendo capaz de reuni-las novamente. Desta forma é importante garantir que o espalhamento das bandas seja mínimo até a chegada do plug de amostra à entrada da coluna cromatográfica.

Uma baixa eficiência de separação pode ser explicada pelo espalhamento da banda de uma substância por fatores extra ou intra coluna. Os fatores extra coluna são todos aqueles resultantes de tubulações e conexões, válvulas de injeção, células de detecção, pré-colunas e filtros de linha que apresentam diâmetro maior, comprimento excessivo e/ou presença de volume morto.

Os fatores intra colunares podem ser explicados pelos termos da equação de Van Deemter que é a equação fundamental para descrição da performance de uma coluna. Mediante esta equação a eficiência é descrita como função da velocidade média linear da fase móvel ( $\mu$ ). A curva de van Deemter descreve a relação entre HEPT x  $\mu$  para uma coluna cromatográfica. O ponto de inflexão da curva corresponde ao menor valor de HEPT e conseqüentemente o maior valor de eficiência. Os termos da equação têm sua influência nas regiões demarcadas na curva (Figura 16).

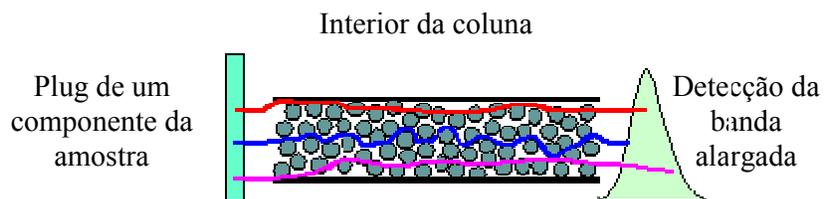


**Figura 16:** Curva de velocidade linear x HEPT (Van Deemter)

$$h = A + \frac{B}{\mu} + c\mu$$

Onde: A = difusão por turbilhonamento  
 B = difusão longitudinal  
 C = resistência à transferência de massa  
 $\mu$  = velocidade linear da fase móvel

A difusão por turbilhonamento (A) ou difusão de eddy considera os múltiplos caminhos da fase móvel através da coluna (Figura 17), onde as variações nas distâncias percorridas por cada molécula originam o alargamento de banda. Tem baixa importância em CLAE e não depende da velocidade linear da fase móvel.



**Figura 17:** Migração diferencial das moléculas de um soluto ao longo da coluna cromatográfica.

A difusão molecular (B) – determina a difusão longitudinal, ou seja, a difusão das moléculas de um soluto ao longo do eixo da coluna. A velocidade de difusão de um soluto depende da temperatura e da pressão da fase móvel, diminui com a diminuição da temperatura e com o aumento da pressão.

A resistência à transferência de massa (C) - mede o processo de movimentação do soluto dentro e fora da fase estacionária e da fase móvel. Quanto mais rápido for o processo de transferência de massa, maior eficiência da coluna, este processo é melhorado pelo uso de partículas menores, camadas mais finas de fase estacionária, fases móveis de baixa viscosidade e temperaturas mais altas. É o fator mais importante que afeta a coluna cromatográfica em CLAE.

**Seletividade** - Em cromatografia líquida a seletividade é determinada pela natureza química de ambas as fases (líquida e estacionária). A seletividade é expressa

em termos da retenção relativa de um par crítico dos componentes da amostra e mede o quanto o sistema consegue diferenciar estas duas bandas

$$\alpha = \frac{t' r_2}{t' r_1}$$

Onde:  $t' r_2 > t' r_1$   
 $\alpha$  = seletividade

Um valor de seletividade ( $\alpha$ ) maior que a unidade, indica que a separação foi conseguida.

**Resolução** - Determina o grau de separação necessário entre duas bandas (Figura 18). O objetivo de uma análise cromatográfica é encontrar uma resolução adequada no menor tempo de análise possível (AQUINO NETO & NUNES, 2003).

$$R_s = \frac{2(tr_2 - tr_1)}{wb_2 + wb_1}$$

$R_s = 1,0$  separação de 98% ou sobreposição de 2%

$R_s = 1,25$  separação de 99,4% ou sobreposição de 0,6%(quase total)

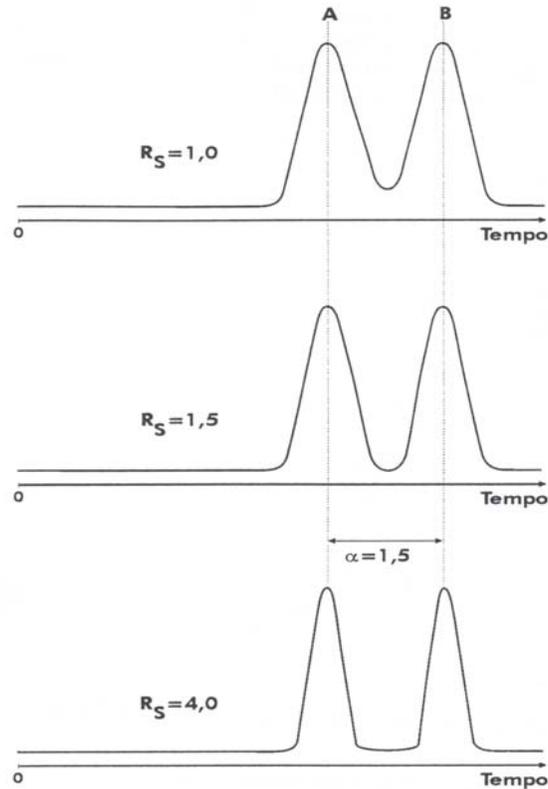
$R_s > 1,0$  é suficiente para quantificar as bandas

$R_s \leq 0,7$  não apresenta separação suficiente para serem quantificados (interpenetração muito grande das bases).

A habilidade do sistema cromatográfico separar um par de substâncias que possuem interações semelhantes não depende somente de tempos de retenção absolutos destas mas também do alargamento das respectivos picos (eficiência de separação da coluna) e do quanto o sistema as diferencia quimicamente.

A resolução é, na verdade, uma relação complexa entre a eficiência (N), seletividade ( $\alpha$ ) e retenção (k):

$$R_s = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left( \frac{k_2}{1 + k_2} \right)$$



**Figura 18:** Graus de resolução entre dois picos adjacentes.

### Detectores

Um detector é um dispositivo mecânico, elétrico ou químico que identifica, registra ou indica uma mudança em uma das variáveis em seu meio ambiente. Um transdutor é um dispositivo que converte uma informação de domínio não elétrico em domínio elétrico e um sensor é um dispositivo capaz de monitorar espécies químicas contínua e reversivelmente, na verdade são transdutores acoplados a uma fase de reconhecimento quimicamente seletiva (SKOOG et al., 1997).

A função do detector em um sistema cromatográfico é acusar a presença e medir a quantidade de componentes no efluente da coluna. De acordo com a forma de resposta os detectores podem ser classificados em integrais e diferenciais. Os detectores diferenciais medem a diferença instantânea na composição efluente da coluna, enquanto que os integrais medem a quantidade acumulada do(s) componente(s) da amostra que chega(m) ao detector.

Os detectores podem ser sensíveis à concentração ou à massa de um dado analito. Os detectores sensíveis à massa apresentam resposta proporcional à quantidade do componente que chega ao detector por unidade de tempo, enquanto que os sensíveis à concentração apresentam resposta proporcional à concentração de um componente da amostra na fase móvel.

Com respeito à seletividade, os detectores podem ser universais, seletivos ou específicos. Os detectores universais respondem a todos os compostos presentes no efluente da coluna, com exceção da fase móvel; os seletivos respondem a um determinado grupo de componentes presentes na fase móvel, enquanto que os específicos respondem a um único componente ou a um número limitado de componentes de características químicas similares.

Dentre as diversas características desejáveis para um bom detector, as principais são:

- Sensibilidade Elevada - A sensibilidade de um detector (S) é igual a saída de sinal por unidade de concentração ou unidade de massa de uma substância, na fase móvel, que entra no detector. Assim sendo, um detector sensível irá gerar um sinal elétrico grande para uma determinada quantidade de amostra.
- Baixo Nível de Ruído - O ruído de um detector (N) é medido pela amplitude, geralmente expressa em milivolts ou âmpères, do envelope da linha de base a qual inclui todas as variações aleatórias do sinal do detector. O detector ideal apresenta baixo nível de ruído, o que permite trabalhar em condições operacionais mais extremas detectando-se quantidades muito pequenas da amostra.
- Resposta - A resposta de um detector é o valor do sinal elétrico gerado a partir de uma certa quantidade de amostra que chega até ele. Dependendo da resposta que o detector consiga gerar, ele será classificado como universal ou seletivo. Um detector apresenta resposta UNIVERSAL quando ele responde a todos os componentes presentes na amostra; o detector de condutividade térmica é um exemplo desta classe. A resposta de um detector é SELETIVA quando responde apenas à determinadas classes de compostos; o detector de ionização de chama, por exemplo, é seletivo aos compostos.
- Ampla Faixa de Linearidade - Lançando-se em gráfico o logaritmo de concentrações conhecidas de uma amostra contra o logaritmo da resposta que o

detector gera para aquelas concentrações obtém-se uma curva de calibração para o referido detector.

- Quantidade Mínima Detectada - A detectabilidade mínima é a concentração ou fluxo de massa de um componente da amostra na fase móvel que produz um sinal no detector igual a duas vezes o nível do ruído.

Além destas características, é desejável que um detector apresente também: baixo custo, simplicidade, fácil disponibilidade e durabilidade elevada.

A função de um detector em CLAE é monitorar a fase móvel que emerge da coluna. O detector é capaz de medir o sinal elétrico que é proporcional à alguma propriedade da fase móvel e/ou dos solutos. O índice de refração, por exemplo, é uma propriedade de ambos, soluto e fase móvel (CIOLA, 2003).

O detector capaz de medir esse tipo de propriedade é chamado de detector de propriedade de massa (“bulk property”). Alternativamente, se a propriedade a ser medida é possuída somente pelo soluto, como absorção por radiação UV-Visível, ou atividade eletroquímica, o detector é chamado de detector por propriedade de soluto (CIOLA, 1998).

As propriedades desejadas para um detector de CLAE são: sensibilidade, resposta seletiva ou universal, baixo volume morto, não destruição da amostra e por fim, facilidade de uso (COLLINS & BRAGA. 1990).

Os detectores de absorbância de radiação ultra-violeta são os detectores mais populares em CLAE. O princípio de funcionamento é que a fase móvel que emerge da coluna passa através de uma pequena célula que é mantida no caminho de um feixe de radiação UV-Visível, provinda de uma lâmpada de deutério (UV), ou tungstênio (Visível). A radiação não absorvida é medida em um dispositivo denominado fotodiodo. Esses são transdutores (dispositivos capazes de transformar informação de domínio não elétrico em domínio elétrico) de diodo de silicone, o qual caracteriza-se por ser uma junção polarizada formada em um “chip” de silicone que possui condutância próxima do zero. Se o chip é atingido por energia radiante, há formação de elétrons de forma a produzir uma corrente elétrica proporcional ao poder da radiação incidente (SKOOG et al., 1998).

Em um detector de arranjo de fotodiodos (PDA) a radiação policromática após passar através da amostra é dispersada por uma grade fixa (monocromadores), atingindo o arranjo de fotodiodos (de 512 a 1024 diodos). Cada diodo mede uma banda estreita de

comprimento de onda no espectro, dessa forma o PDA tem uma aquisição de dados paralela, todos os pontos do espectro sendo medidos simultaneamente. Devido a essa aquisição paralela, processar e estocar um espectro pode ser feito em aproximadamente 0,5seg, comparado com vários minutos de um instrumento convencional. A habilidade de fazer medidas de múltiplos comprimentos de onda e a alta velocidade de aquisição significa que várias técnicas de amostragem de sinal podem ser usadas para reduzir o ruído e aumentar a sensibilidade (SKOOG *et al.*, 1998).

Muitos compostos são capazes de absorver radiação UV e subseqüentemente emitir radiação em um comprimento de onda ainda maior. Esta emissão pode ser instantânea (fluorescência) ou após um período de tempo (fosforescência). Compostos que fluorescem naturalmente possuem uma estrutura cíclica conjugada, a exemplo dos hidrocarbontos polinucleares. Muitos compostos não fluorescentes podem ser convertidos para derivados fluorescentes por tratamento com reagentes apropriados (derivatização) (SKOOG *et al.*, 1998).

Os detectores de fluorescência pra CLAE são similares em desenho aos fluorímetros. A fluorescência é observada por um detector fotoelétrico localizado a 90° do feixe de excitação. Os detectores mais antigos empregam uma fonte de mercúrio e filtros para isolar a banda de radiação emitida. Instrumentos mais sofisticados possuem uma fonte de xenônio e empregam uma grade monocromadora para isolar a radiação fluorescente. A vantagem inerente dos detectores de fluorescência é a sua alta sensibilidade, que é tipicamente maior do que uma ordem de magnitude na maioria dos procedimentos por absorbância. Outros detectores utilizados em CLAE são: índice de refração (universal), eletroquímico, amperométrico, evaporativo de espalhamento de luz (universal) e massas (LC-MS) (SKOOG *et al.*, 1998).

## **2.4 Métodos de quantificação mais usados em cromatografia**

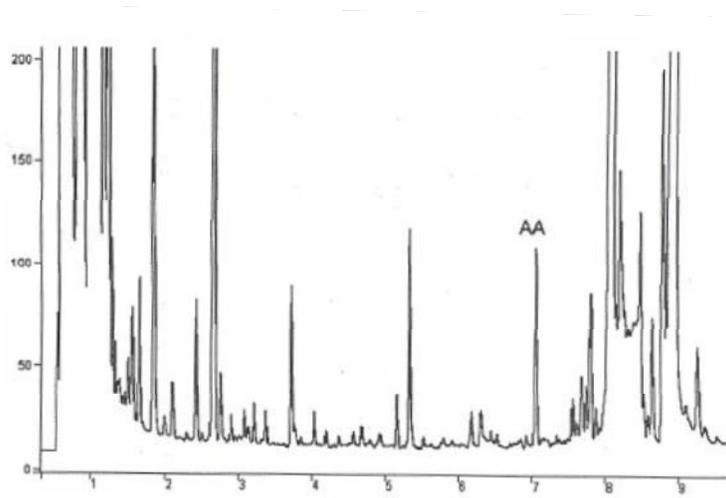
Os métodos de quantificação utilizados em cromatografia líquida atualmente podem ser resumidos em padronização externa e padronização interna. No método por padronização interna utiliza-se além do padrão das substâncias de interesse uma substância que possui estruturas semelhante ao composto de interesse e que não esteja presente na amostra. O padrão interno é adicionado à amostra e desta forma erros de preparo podem ser minimizados.

O método de padronização externa ainda é o mais utilizado em CLAE, provavelmente devido a dificuldade na aquisição de substâncias estáveis que possam funcionar como padrão interno. Neste método são utilizados padrões de cada uma das substâncias de interesse que serão utilizados para ajustar a resposta do detetor através de um fator de resposta ou de uma curva de calibração.

#### 2.4.1 Métodos cromatográficos para análise de vitamina C

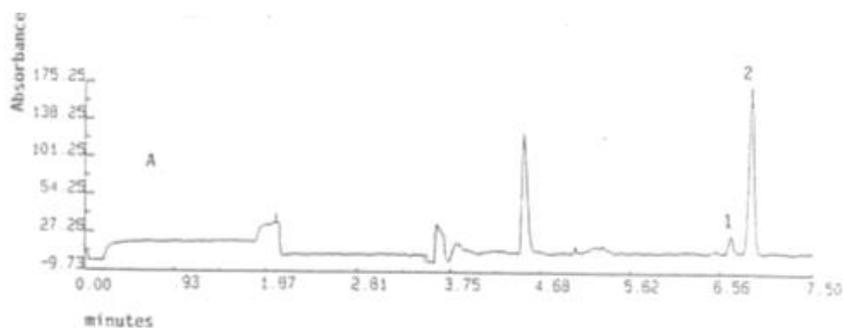
Os métodos cromatográficos são os mais utilizados atualmente, na determinação de ácido ascórbico, principalmente, por sua inerente capacidade de separação de interferentes, não necessitando de preparos laboriosos que expõem a vitamina C à maiores probabilidades de degradação. Os métodos cromatográficos podem ser divididos entre as técnicas existentes, sendo a análise por cromatografia líquida de alta eficiência a mais utilizada.

Métodos que empregam Cromatografia Gasosa necessitam de uma etapa de derivatização com um agente silanizante como um éster de trimetilsilano (SILVA,2005) (Figura 19). Agentes silanizantes são amplamente utilizados em cromatografia gasosa, embora exijam pré tratamentos de amostra como secagem e controle de temperatura para garantir uma reação quantitativa (VECCHI & KAISER, 1967).



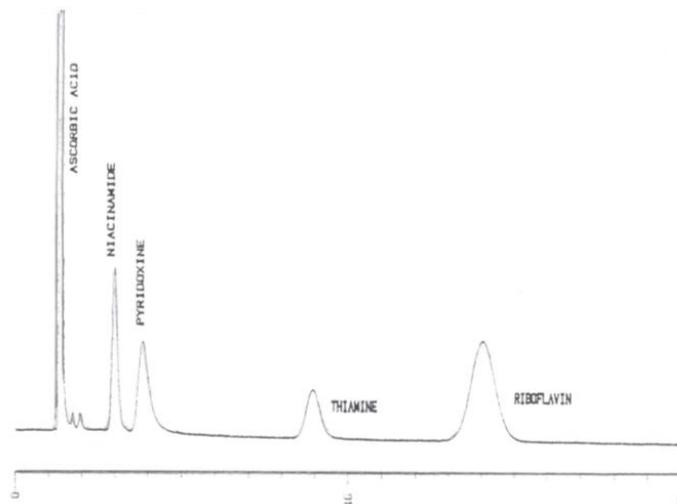
**Figura 19:** Cromatograma de uma determinação de ácido ascórbico (AA) em suco de laranja, através de cromatografia gasosa de alta resolução (SILVA,2005).

As técnicas por afinidade elétrica como eletrocromatografia e eletroforese capilar também apresentam alguma aplicação, mas ainda possuem desvantagens como o uso de padrões internos, necessários para minimizar a imprecisão da injeção neste tipo de equipamento (THOMPSON & TRENERRY, 1995) (Figura 20), os custos dos equipamentos e a falta de reprodutibilidade em tempo de migração e na quantificação, devido à instabilidade do fluxo eletrosmótico (TERABE *et al.*, 2001); além de possuírem menor robustez que os métodos por CLAE (DAVEY *et al.*, 2003).



**Figura 20:** Eletroferograma da separação de um extrato de uva por cromatografia eletrocinética capilar micelar (THOMPSON & TRENERRY, 1994). Pico 1 é referente ao ácido ascórbico e pico 2 referente ao ácido *D*-isoascórbico.

Ao selecionar-se um método cromatográfico para análise de vitamina C, além da interferência da matriz da amostra deve-se levar em consideração também os níveis desta vitamina que estão presentes. Em alimentos fortificados ou preparações farmacêuticas os teores são relativamente elevados e o efeito de interferência da matriz reduzido, tornando a análise de vitamina C bastante facilitada, permitindo inclusive determinações simultâneas de vitaminas hidrossolúveis (IVANOVIC *et al.*, 1999 e LAM, *et al.*, 1984) (Figura 21).



**Figura 21:** Cromatograma de uma determinação de vitamina C e outras vitaminas hidrossolúveis em uma mistura multivitamínica (IVANOVIC *et al.*, 1999).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é a técnica cromatográfica mais utilizada devido a maior simplicidade de preparo da amostra, não necessitando de processos de derivatização para detecção eletroquímica ou por UV e, quando muito, utilizam um processo de limpeza da amostra tipo extração em fase sólida, normalmente cartuchos comercialmente disponíveis recheados com fase estacionária tipo C18. Nesta técnica, um dos maiores problemas consiste na estabilização da vitamina C após sua extração da matriz (PENTEADO, 2003).

A maioria dos métodos por CLAE utiliza separação por fase reversa (C18) e o uso de soluções como tampão fosfato, Hidróxido de tetrabutil amônio (TBAH) ou reagentes de pareamento iônico na fase móvel (GÖKMEN *et al.*, 2000, PAPPALOUISI & PASCALIDOU, 1998 e CHANG & CHANG, 2003), visando inibir a ionização do ácido ascórbico e também sua estabilização durante o processo cromatográfico.

Há também métodos que utilizam fase amino (NH<sub>2</sub>) que consiste em um processo de troca iônica fraca (RIZZOLO & POLESSELLO, 1984 e WIMALASIRI & WILLS, 1983). A utilização destas colunas tem sido muito pequena com os avanços nas tecnologias de partículas para fase reversa e exclusão iônica.

As técnicas de fase reversa e pareamento iônico em sílica requerem eluentes complexos para obterem separações efetivas de moléculas que se ionizam. Estes mecanismos funcionam modificando o composto a ser analisado até ser compatível com

a fase estacionária. Uma fase móvel composta por brometo de miristiltrimetil amônio 25mM, hidróxido de sódio 0,05 M, ácido acético 0,06M e 7,5% de Acetonitrila, sendo EDTA 200mg/mL e homocisteína 100mg/mL adicionados antes do uso (GARDNER *et al.*, 1999), pode ser citada como exemplo de complexidade de separação de ácido ascórbico (somente) em suco de frutas, utilizando fase reversa C18 e detecção UV. Este tipo de procedimento torna uma análise que deveria ser relativamente simples, por demais complexa e custosa.

As colunas à base de resinas com trocadores iônicos ainda são pouco usadas na análise de vitamina C (isto pode ocorrer devido ao seu custo mais elevado). Na verdade estas colunas separam a vitamina C por mecanismo de partição em fase reversa (sem as desvantagens da fase quimicamente ligada à sílica), pois o ácido ascórbico durante o processo de separação encontra-se sob a forma protonada. Ocorre também mecanismo de exclusão iônica, onde substâncias ionizadas no pH da fase móvel sofrem repulsão devido a carga fixa da resina. Desta forma, partículas com maior carga eluirão primeiro (JUPILLE *et al.*, 1981). Estas colunas oferecem boa resolução cromatográfica, porém vida útil menor.

## **2.5 Dosagem de vitamina C total**

O ácido diidroascórbico representa menos de 10% da vitamina C total dos vegetais, mas estes níveis tendem a aumentar com o período de estocagem, devido a isto existem muitos trabalhos cujo escopo é dosar os teores de ácido ascórbico e também diidroascórbico (WILLS *et al.*, 1984). A separação conjunta de ambas as formas é complicada pela sensibilidade de detecção para o ácido diidroascórbico que ocorre à 210nm, 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 (KIM, 1989) que normalmente se apresenta em baixos níveis, é bastante complicada, além disso este também não apresenta resposta em detecção eletroquímica (KALL & ANDERSEN, 1999). A estabilização do ácido diidroascórbico em solução também requer ótimo controle de pH, pois a hidrólise deste à ácido 2,3 dicetogulônico é muito pH dependente (WOLUCKA *et al.*, 2001).

Uma alternativa bastante empregada é a redução do DIA a ácido ascórbico mediante reação com substâncias como Ditiotreitól (DTT), Homocisteína, L-cisteína (GÖKMEN *et al.*, 2000) ou bromina. (NISPEROS-CARRIEDO *et al.*, 1992). A

vitamina C, então, é quantificada como ácido ascórbico total. Neste caso é necessário fazer duas corridas cromatográficas, uma para quantificar o ácido ascórbico presente na amostra naturalmente e outra para quantificar o ácido ascórbico total (após a redução). O teor de ácido diidroascórbico é fornecido por diferença entre estes dois teores.

Como em alimentos naturais o ácido diidroascórbico está presente em níveis baixos, a escolha de um método de dosagem de vitamina C total deve considerar o custo/benefício dos resultados obtidos. Análises como as representadas na Figura 22 (NISPEROS-CARRIEDO *et al.*, 1992) demonstram que esta escolha deveria ser feita em nome da obtenção de uma separação cromatográfica efetiva.

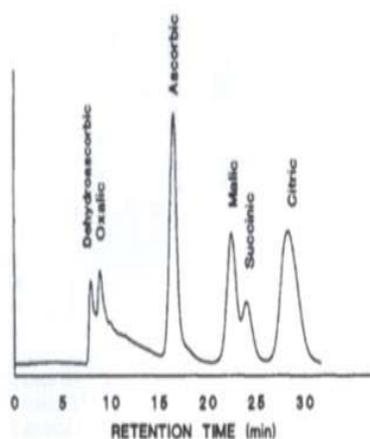


Figure 1. Retention times of standard acid solutions as detected by coupling Spheri-5 RP-18 and Polypore H columns with 2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 2.3) as mobile phase at a flow rate of 0.4 mL/min.

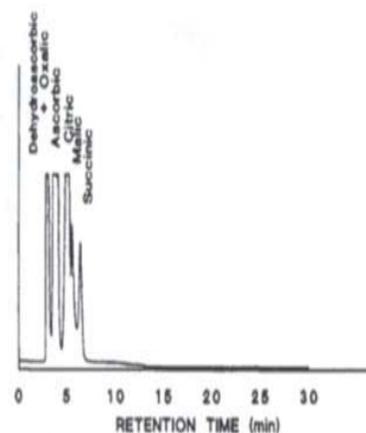


Figure 2. Elution profile of standard acid solutions by Spheri-5 RP-18 with 2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 2.3) as mobile phase at a flow rate of 0.4 mL/min.

**Figura 22:** Cromatogramas de soluções padrão de DIA e ácido ascórbico além de outros ácidos orgânicos. A separação é visivelmente deficiente mesmo para soluções padrão (NISPEROS-CARRIEDO *et al.*, 1992).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Método e amostras

O objetivo deste projeto de mestrado foi desenvolver no laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos um método rápido e simples para análise de vitamina C em alimentos. A técnica analítica por CLAE baseou-se no princípio de exclusão iônica (ARSHOOR *et al.*, 1984) e as principais matrizes para as quais o método foi testado foram: morango, mamão, manga, mandioca, batata, tomate, água de coco e sucos de frutas.

#### 3.2 Relação de materiais

Consumíveis, Reagentes e vidrarias

- Pipetas Pasteur - Corning® 401516
- Balão volumétrico capacidade 2L
- Balão volumétrico âmbar capacidade 25, 10 ou 5mL
- Pipeta automática com ponteira capacidade de 100-1000µL - Brand Transferpette®
- Pipeta automática com ponteira capacidade de 500-5000µL - Brand Transferpette®
- Papel de filtro quantitativo – J. Prolab JP40
- Kit de filtração à vácuo - Millipore®
- Membrana filtrante 0,45µm para solventes aquosos tipo HA (acetato de celulose) – Schleicher & Schuell OE67;
- Unidades filtrantes descartáveis tipo Teflon hidrofílico 0,22µm - Millex® GV
- Seringa de vidro capacidade 10 ou 5mL
- “Vials” com capacidade de aproximadamente 1,5mL e tampa de rosca - Waters® 186001131c.
- Ácido Sulfúrico concentrado Suprapuro – Merck 1.00714.0250
- Padrão de ácido L-ascórbico (99% pureza) - Spectrum Chemical Mfg. Corp A1370

- Coluna de troca iônica forma ácida - BIO RAD AMINEX HPX 87H (7,8 x 300 mm) 125.0140.
- Água Ultrapura (Milli-Q)

#### Equipamentos

- Balança Analítica (0,1mg) - Bel Engineering 2104
- Politron - Omni Homogenizer 17105
- Blender - Waring commercial
- Ultrassom - Branson 2210
- Cromatógrafo Líquido não modular - Waters Alliance 2695
- Detetor de UV Waters 2487 ou PDA Waters 2996
- Microcentrífuga (opcional) - Hsiangtai
- Sistema de purificação de água (tipo II) - Millipore<sup>®</sup> Elix- 5
- Sistema de Ultrapurificação de água (tipo I) - Millipore<sup>®</sup> Milli-Q Gradient – A10

### 3.3 Preparo da amostra

A água ultra pura utilizada em todo o procedimento foi obtida a partir de um sistema de purificação de água (Figura 23) constituído por um equipamento Elix<sup>®</sup>, um reservatório de 60 L e um equipamento para utrapurificação de água, Milli-Q<sup>®</sup> Gradient. 10A.



**Figura 23:** Sistema de Purificação e ultra purificação de água utilizado no desenvolvimento e nas análises do método de Determinação do teor de vitamina C em vegetais.

Todo o processo de diluição e extração das amostras, além das diluições do padrão de ácido ascórbico foram realizados em sala escura, iluminada por luz negra e sem incidência de radiação ultra-violeta direta (Figura 24).



**Figura 24:** Instalações da sala escura – ausência de radiação UV para o preparo das amostras.

O cromatógrafo líquido utilizado foi um Waters Alliance 2695 com detector de arranjo de diodos (PDA) Waters 2996 (Figura 25) e coluna Aminex HPX 87H da Biorad (Figura 26) constituída de fase estacionária à base de resinas estireno divinil benzeno e grupos trocadores de hidrogênio. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 0,2M (pH

1,8) sob vazão de 0,7mL/min e a pressão monitorada em torno de 800psi (Libra por Polegada Quadrada).



**Figura 25:** Sistema Cromatográfico Waters Alliance 2695, utilizado no desenvolvimento e nas análises do método de Determinação do teor de vitamina C em vegetais.



**Figura 26:** Coluna analítica BioRad Aminex HPX87H.

A fase móvel (ácido sulfúrico 0,2M) que também é utilizada para extrair a vitamina C da matriz do alimento foi preparada adicionando-se 5,6mL de ácido sulfúrico suprapuro Merck à 2L de água ultrapura (Milli-Q). Após o preparo a fase móvel foi filtrada em membrana de acetato de celulose (tipo HA) de 0,22 $\mu$ m. A

estocagem da fase móvel é feita em geladeira e esta deve ser microfiltrada novamente a cada dois dias em uso.

O preparo das amostras consistiu da sua homogeneização em blender ou Politron, seguida da pesagem e extração com fase móvel durante 10 minutos em ultrassom. Após a etapa de extração, as amostras foram levadas a volume conhecido segundo a Tabela 2.

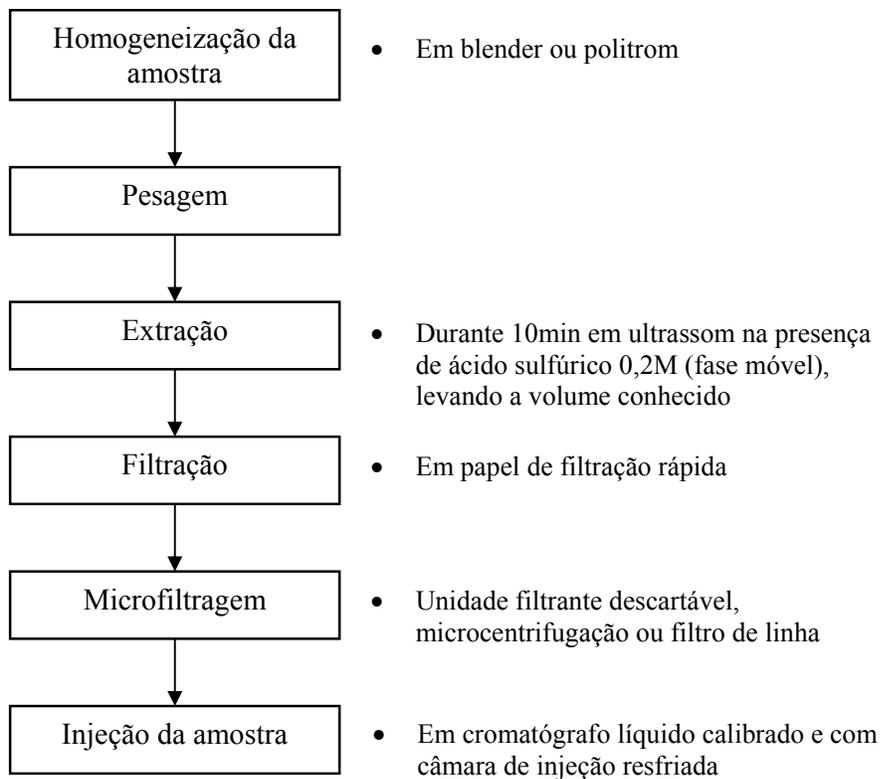
As amostras foram, então, filtradas em papel de filtro e micro filtradas em unidade descartável de Teflon<sup>®</sup> hidrofílico para frascos de vidro âmbar com tampa de rosca e septo de teflon. O sistema cromatográfico, equipado com injetor automático, teve sua câmara do injeção resfriada à 5°C.

Para calibração do cromatógrafo, foi feita uma solução padrão de ácido ascórbico na concentração de 1µg/mL (Tabela 2). O procedimento de calibração consistiu em injetar 20µl da solução padrão de ácido ascórbico em duplicata e avaliar a resposta fornecida pelo equipamento. A integração, calibração, processamento, quantificação e estocagem dos dados cromatográficos foram feitos através do software Empower<sup>®</sup> (Waters Corp.).

**Tabela 2:** Variação de massas e volumes para padrão e amostras.

<b>Diluições*</b> <b>(mL)</b>	<b>Massa do padrão</b> <b>(mg)</b>	<b>Massa da</b> <b>amostra sólida</b> <b>(g)</b>	<b>Volume da</b> <b>amostra líquida</b> <b>(mL)</b>
25	25	2,5	2,5
10	10	1,0	1,0
5	5	0,5	0,5

\* Volume das diluições realizadas em balão volumétrico



**Figura 27:** Fluxograma do método analítico.

### 3.4 Testes iniciais

Após as condições cromatográficas e de extração da vitamina C das matrizes de alimentos terem sido estabelecidas foi necessário realizar testes iniciais a fim de verificar a resposta do método. Estes testes, porém, não fazem parte do processo validação do método e sim somente uma verificação inicial do mesmo a fim de confirmar ou modificar condições de trabalho.

#### 3.4.1 Linearidade

A linearidade do método foi verificada construindo-se uma curva que consistiu no preparo de uma solução padrão de Vitamina C para cada ponto da curva com aproximadamente 25mg de Ácido Ascórbico em balão volumétrico (bv) âmbar de 100mL. Tomaram-se alíquotas destas soluções para construir os pontos da curva em 5 repetições de preparo de cada ponto, conforme Tabela3.

**Tabela 3:** Construção dos pontos da curva de linearidade.

Solução	Concentração da solução (mg/100mL)	Alíquotas	Ponto da Curva	Concentração do ponto (mg/25mL)	Concentração do ponto (mg/100mL)
1		10 mL para bv de 25 mL	7	2,740	104,04
2		7 mL para bv de 25mL	6	1,85	70,25
3		5 mL para bv de 25mL	5	1,270	48,22
4		3 mL para bv de 25mL	4	0,792	30,07
5		1 mL para bv de 25 mL	3	0,248	9,42
6		0,1 mL para bv de 25 mL	2	0,026	0,99
7		0,05 mL para bv de 25 mL	1	0,013	0,49

\*bv – Balão volumétrico

Cada ponto e suas respectivas repetições foram injetados uma única vez logo após o preparo. Os resultados obtidos foram estudados por regressão linear e avaliados quanto a presença de valores discordante.

### 3.4.2 Teste de degradação

A degradação do ácido ascórbico ao longo de uma seqüência de injeções foi verificada em duas partes:

Parte 1- Foram feitas injeções de solução padrão de vitamina C (Tabela 4) à 5°C. Logo após o preparo, estas soluções foram injetadas no sistema cromatográfico por 10 vezes, seqüencialmente.

**Tabela 4:** Concentração das soluções padrão utilizadas na primeira parte do teste de degradação.

<b>Solução Padrão</b>	<b>Concentração (mg/25mL)</b>
<i>1</i>	0,503
<i>2</i>	0,513
<i>3</i>	0,499

### **3.4.3 Teste de estabilização do ácido ascórbico em função da solução extrativa utilizada**

#### **3.4.3.1 Com EDTA**

Foram preparadas dez soluções padrão de vitamina C com concentração aproximada de 1mg/mL que foram diluídas em uma solução de EDTA 0,05% em ácido sulfúrico 0,2M. As soluções foram injetadas no sistema cromatográfico imediatamente após o preparo.

#### **3.4.3.2 Com ácido oxálico**

Foram preparadas dez soluções padrão de vitamina C com concentração aproximada de 1mg/mL que foram diluídas em uma solução de Ácido Oxálico 6% em ácido sulfúrico 0,2M. As soluções foram injetadas no sistema cromatográfico imediatamente após o preparo.

#### **3.4.3.3 Com ácido metafosfórico**

Foram preparadas dez soluções padrão de vitamina C com concentração aproximada de 1mg/mL que foram diluídas em uma solução de Ácido Metafosfórico 3% em ácido sulfúrico 0,2M. As soluções foram injetadas no sistema cromatográfico imediatamente após o preparo.

#### **3.4.3.4 Quantificação de amostra de suco de maracujá**

Foram preparadas 10 repetições de preparo de uma amostras de suco de Maracujá de mesmo lote extraída com solução de EDTA em ácido sulfúrico 0,2M e

quantificadas quanto ao teor de vitamina C a partir de um padrão de calibração extraído da mesma forma. Outras 10 replicatas da mesma amostra foram extraídas somente com ácido sulfúrico 0,2M e também quantificadas quanto ao teor de vitamina C a partir de um padrão de calibração extraído da mesma forma. O teor de vitamina C informado no rótulo do suco de maracujá foi de 30mg de vitamina C para 200mL de suco (15mg/100mL).

#### **3.4.4 Testes de recuperação**

##### **3.4.4.1 A partir de amostras de Cewin® (lote 060304) – Parte I**

Foram preparadas 10 repetições de uma amostra do suplemento de Vitamina C em gotas (concentração de 200mg/mL), tomando-se 0,3mL e diluindo-se a 100mL com solução extrativa. As replicatas foram injetadas em cromatógrafo líquido previamente calibrado com solução padrão externo de ácido ascórbico e o teor de vitamina C por mL de amostra foi determinado.

##### **3.4.4.2 A partir de matriz de fruta – Parte II**

A fim de estabelecer os teores possíveis de recuperar a partir de uma matriz comumente analisada, foram feitos 5 extrações de amostra de polpa de mamão variedade Sunrise Solo comprada no CEASA da cidade do Rio de Janeiro, e seus teores de vitamina C determinados a partir do presente método. Da mesma polpa de mamão foram feitas outras 6 extrações sendo que estas foram contaminadas com 0,1mL de uma solução padrão de ácido ascórbico na concentração de 22,65mg/mL. Os teores de vitamina C para estas amostras, onde foi feita a contaminação com o padrão, foram determinados e comparados com os teores sem adição de padrão.

#### **3.4.5 Teste de comparação com método titulométrico**

Foram feitas 12 análises de vitamina C em uma amostra de suco de laranja comercial. Os resultados destas análises a partir do presente método cromatográfico (CLAE) foram comparados com o mesmo procedimento de amostragem a partir do

método titulométrico com 2,6- dicloroindofenol (AOAC Official Method 967.21, 2000) modificado. A rotulagem do produto não informou o teor esperado de vitamina C.

### **3.4.6 Ensaio de proficiência**

Uma das formas de verificação da confiabilidade deste método foi a participação em teste de proficiência FAPAS (*Food Analysis Performance Assessment Scheme*) delineado para a quantificação de mg/100g de ácido ascórbico, onde 50 laboratórios participaram. O objetivo foi quantificar o teor de ácido ascórbico em uma amostra de suco de limão artificial (Cordial Lemon Juice). Cada participante deste teste de proficiência descreveu em um formulário apropriado todas as informações sobre o método utilizado por seu laboratório e as observações pertinentes ao preparo da amostra recebida para o teste.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Comparação com o método que utiliza coluna de troca iônica e o que utiliza coluna de fase reversa

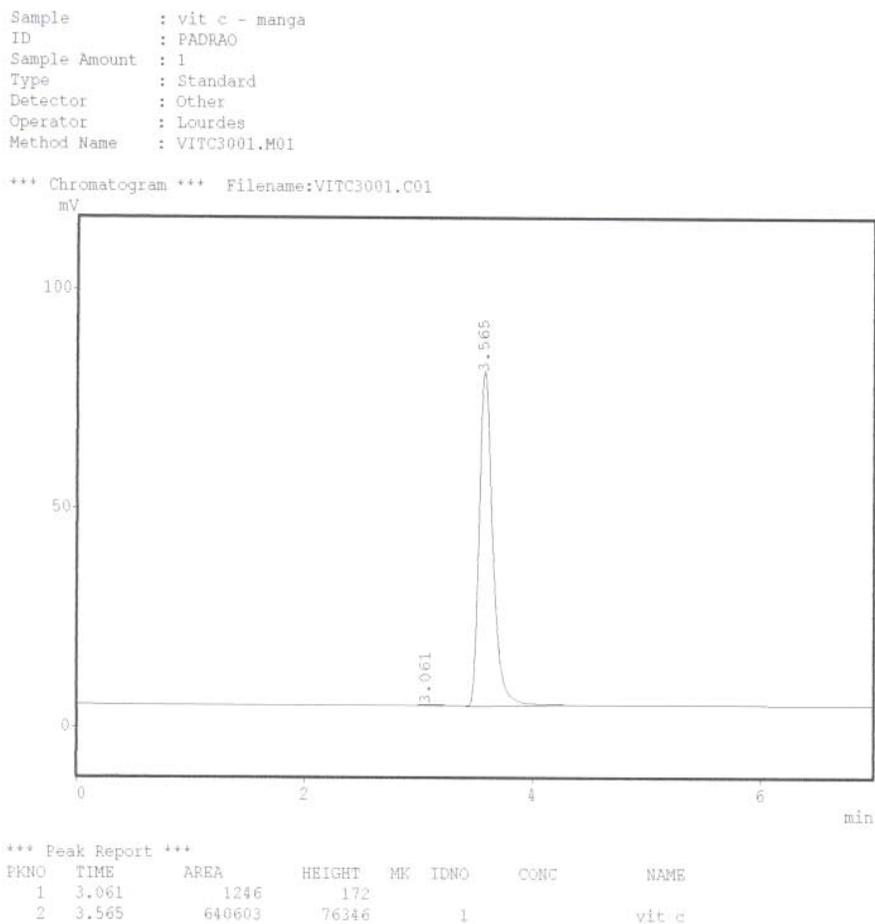
A separação de substâncias que se ionizam por cromatografia de fase reversa é bastante complexa, necessitando de controle rígido de pH para que não haja equilíbrio entre as formas iônica e molecular de uma mesma substância (pH de trabalho igual ao pKa). A modulação de pH também é requerida para que ocorra supressão iônica já que uma partícula com carga possuirá baixíssima interação com a fase estacionária apolar. No caso do ácido ascórbico ( $Pka_1$  4,2), portanto a diminuição de pH visa, além de evitar que o equilíbrio entre as formas iônica e molecular aconteça, deslocar este equilíbrio para a forma molecular da vitamina C, devido o aumento da concentração de íons hidrogênio em solução.

O método de análise de vitamina C utilizado anteriormente no laboratório de cromatografia líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos (POLESELLO & RIZZOLLO, 1990) consistia de 1,0mL/min. O volume de injeção era de 20 $\mu$ L e a detecção por UV, feita à 254nm. As Figuras 28 e 29 demonstram os resultados deste método em análise de uma amostra de manga. As Figuras 30 e 31 dizem respeito aos primeiros testes com a coluna de troca iônica para a análise de vitamina C e demonstram a separação completa para uma amostra de manga do mesmo grupo da usada no método anterior.

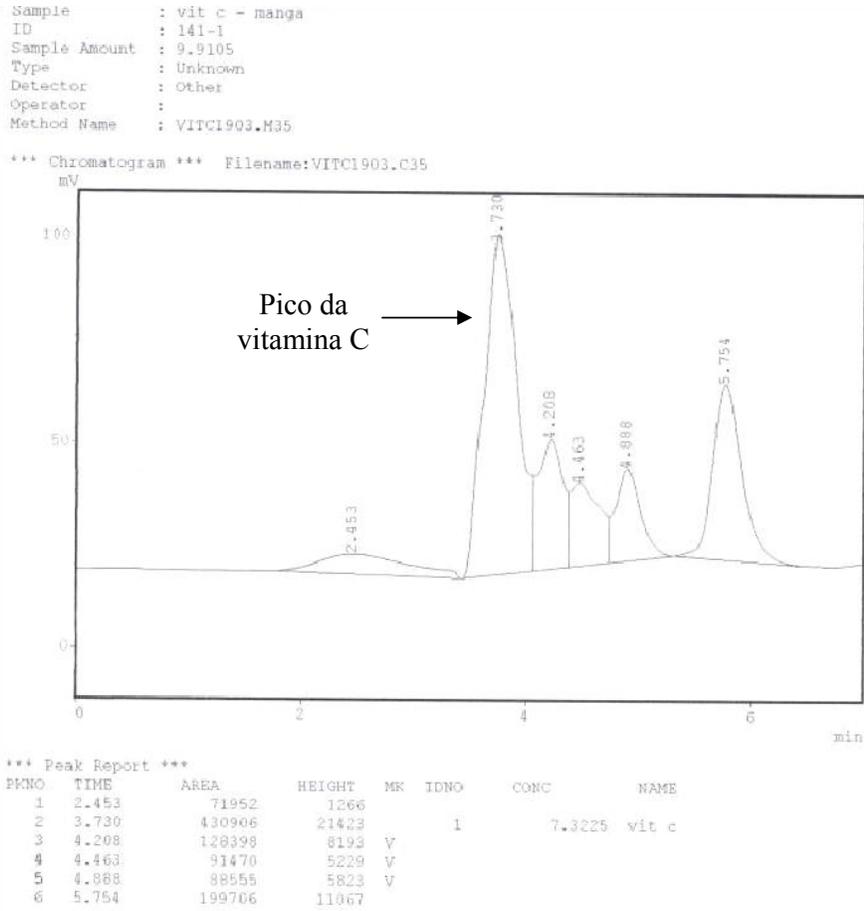
Em ambas análises, utilizou-se um cromatógrafo Shimadzu que consistiu em uma bomba quaternária modelo 10AD e detetor de UV modelo 10A à 254nm. Os dados foram adquiridos e processados pelo software Shimadzu CLASS-CR10, atualmente em desuso no laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Nas matrizes vegetais que vinham sendo utilizadas (inclusive manga) o método por fase reversa demonstrou separação insuficiente e baixa resolução. O método por exclusão iônica, porém, demonstrou separação completa para o ácido ascórbico nesta e em todas as matrizes testadas até o momento (vide cromatogramas no apêndice I).

A mudança de técnica de separação de fase reversa (forças de Van der Waals) para exclusão iônica mostrou-se bastante eficiente, eliminando a maioria dos

interferentes e permitindo uma resolução cromatográfica a nível de linha base. A vazão de fase móvel utilizada nestes primeiros testes foi de 1,0mL/min.



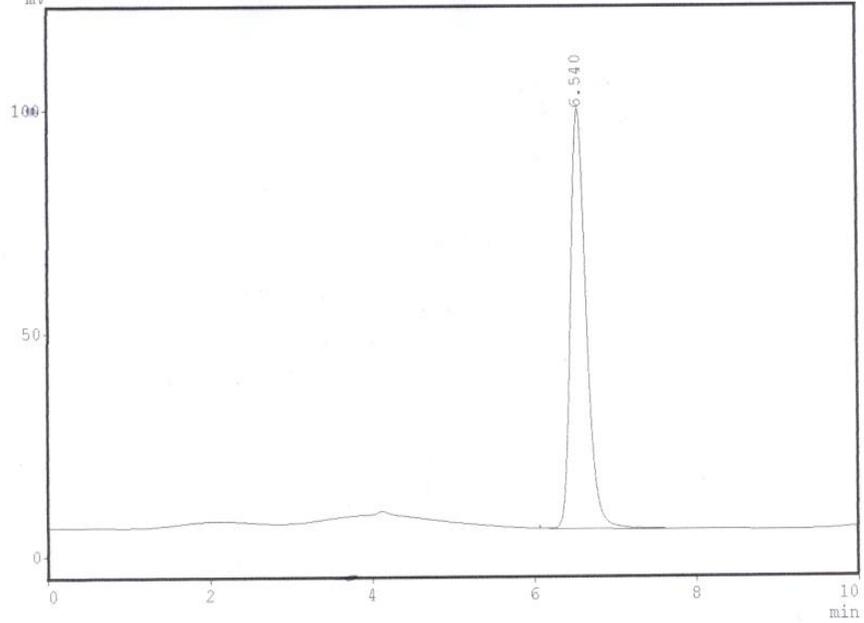
**Figura 28:** Padrão de ácido ascórbico segundo método anteriormente utilizado no laboratório de cromatografia líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos.



**Figura 29:** Amostra de suco de manga analisada segundo o método anteriormente utilizado no laboratório de cromatografia líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

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

\*\*\* Chromatogram \*\*\* Filename:VITC2703.C07  
mV



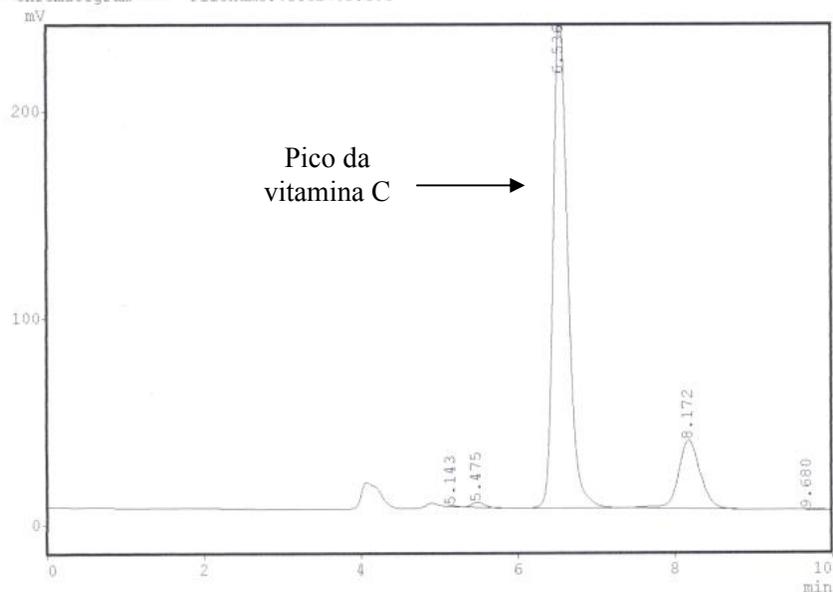
\*\*\* Peak Report \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	6.540	1279401	94089		1	0.2428	vit c

**Figura 30:** Padrão de ácido ascórbico segundo método desenvolvido através deste estudo, no laboratório de cromatografia líquida da Empresa Agroindústria de Alimentos.

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

\*\*\* 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
4	8.172	638064	33020				
5	9.680	5070	267				

**Figura 31:** Amostra de suco de manga analisada segundo método desenvolvido através deste estudo, no laboratório de cromatografia líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

## 4.2 Preparo das amostras

### 4.2.1 Efeito da homogeneização

A homogeneização das amostras é importante para garantir a maior superfície de contato possível da solução extrativa (fase móvel) com a matriz vegetal. Frações da amostra com tamanhos diferentes tornam a extração heterogênea e não representativa, ocorrendo grande variação de teores entre duplicatas. Isto ocorre por que a solução extrativa não consegue atingir pontos da matriz da mesma forma em amostras com tamanhos irregulares.

O uso de processadores ou homogenizadores tipo blender ou politron também visa provocar o rompimento das paredes celulares e ajudar a liberar o ácido ascórbico na matriz.

#### **4.2.2 Extração**

O objetivo maior deste estudo foi desenvolver um método rápido e simples para a análise de vitamina C que possibilitasse bons resultados em separação cromatográfica e recuperação. Com relação à rapidez e simplicidade o preparo da amostra foi fundamental. O uso da coluna de exclusão iônica diminui o envolvimento do operador, pois o manuseio e as perdas de amostra são mínimos. O erro do método, então, tende a diminuir.

A extração com a própria fase móvel (ácido sulfúrico 0,2M) também faz parte deste processo de simplificação, pois não é necessário preparar soluções tampão com extremo controle de pH ou soluções salinas a fim de estabilizar a vitamina C (vide item 3.4.3 - Teste de estabilização do ácido ascórbico em função da solução extrativa utilizada). Optou-se, somente, por utilizar um ácido sulfúrico de grande pureza (suprapuro) que não trouxesse para o meio extrativo contaminações por íons metálicos que pudessem degradar a vitamina C recém extraída.

A rapidez do preparo da amostra neste método 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. Também é possível utilizar acetonitrila como modificador orgânico na fase móvel (máximo de 40%) para melhorar a seletividade da separação cromatográfica.

Como a vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel e bastante sensível, a extração por ultrassom é suave, visando não gerar artefatos ou degradar o analito, mas somente facilitar a ruptura de células vegetais da matriz do alimento onde o ácido ascórbico está contido. As ondas de som de alta frequência provocam cavitação na água usada como meio de extração, ou seja, a formação de bolhas de vácuo que colapsam sobre a superfície da matriz. A agitação gerada pelo fenômeno de cavitação provoca a extração da vitamina C e também de outras substâncias componentes da amostra.

A tabela de diluições aplicada ao método visa somente estabelecer a proporcionalidade entre concentração de padrão e amostras, pelo menos até que os valores de linearidade e limites de detecção sejam estabelecidos para o método.

#### 4.2.3 Necessidade de água ultrapura

A utilização de água ultrapura para o preparo da fase móvel e solução extrativa é uma necessidade inerente à técnica de CLAE. A água é o solvente mais problemático para ser usado como fase móvel, pois traz impurezas como partículas de poeira, ferrugem, compostos ionizados ou não e gases dissolvidos, além de microorganismos. Nenhum dos processos mais comuns de purificação da água atende aos requisitos de proteção de um sistema cromatográfico que incluem não possuir partículas que provoquem riscos nos selos, pistões ou válvulas da bomba (“check valves”) e também provoquem entupimento nos filtros das colunas cromatográficas, além de não possuir compostos orgânicos ou íons que funcionem como interferentes no processo de separação e detecção.

De acordo com as especificações publicadas pela ACS - American Chemical Society, ASTM-American Society for Testing and Materials (**manual Milli-Q e Ellix**), os tipos de água reagente podem variar do tipo I ao tipo IV. De acordo com o seu tipo, deve possuir determinadas especificações que são mostradas na Tabela 5.

**Tabela 5:** Especificações da água reagente segundo norma D1193-91 ASTM.

Parâmetro	TIPO I	TIPO II	TIPO III	TIPO IV
PH	N.E. <sup>1</sup>	N.E. <sup>1</sup>	N.E. <sup>1</sup>	5.0 a 8.0
Resistência específica, <i>megohm-cm</i> à 25°C, min	18.0	1.0	4.0	0.2
Condutividade, <i>uS/cm</i> à 25°C, max	0.056	1.0	0.25	5.0
Silicatos (SiO <sub>2</sub> ) - <i>ug/L</i> , max	3	3	500	SL <sup>2</sup>
Sódio <i>ug/L</i> , max	1	5	10	50
Substâncias orgânicas (TOC), <i>ug/L</i> , max	50	50	200	SL <sup>2</sup>
Cloreto <i>ug/L</i> , max	1	5	10	50

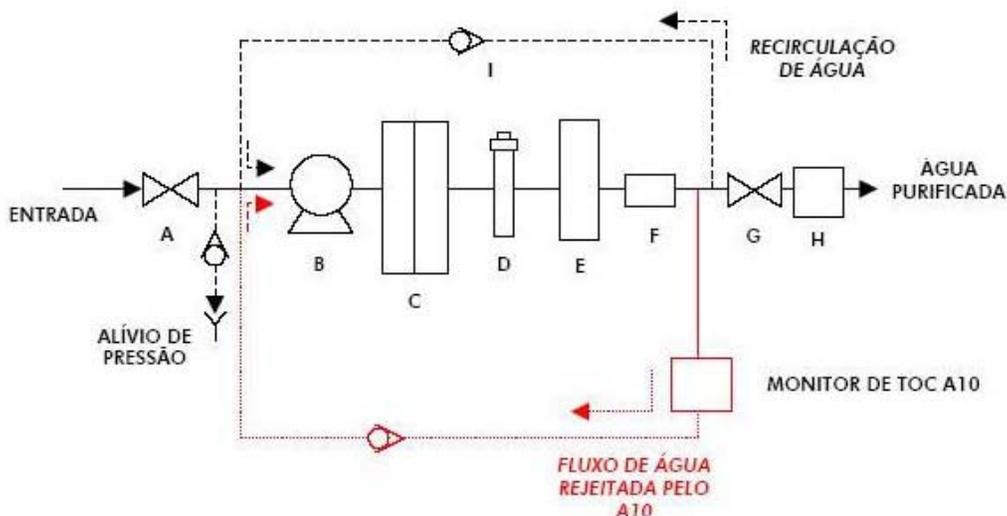
<sup>1</sup>NE: Não especificado pois a água não possui constituintes suficientes para medida de pH

<sup>2</sup>SL: Sem limite

Os métodos mais comuns de purificação da água possuem desvantagens diretas para sua aplicação isolada em CLAE. Um simples processo de destilação, por exemplo, pode remover sólidos, microorganismos e a maioria dos compostos não ionizados, mas os voláteis destilarão junto com a água (SOARES *et al.*, 1988). A deionização pode contaminar a água com resíduos de compostos orgânicos e até de microorganismos provenientes das resinas trocadoras além de não possuir a eficiência necessária para uma análise via CLAE e a osmose reversa somente, não remove contaminantes suficiente para produzir água do tipo II (CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000). A água requerida para análises via CLAE é conseguida através da combinação de tratamentos iniciando com a produção de água tipo II que alimentará um equipamento de ultrapurificação culminando na produção de água tipo I ou ultrapura.

O equipamento de purificação de água usado neste estudo consistiu em um modelo Millipore ElliX<sup>®</sup> para osmose reversa e eletrodeionização que fornece água tipo II. Um sistema de auto sanificação por radiação UV, garante a destruição de microorganismos e por isso a água pode ser estocada em um tanque de polietileno de 60L que abastece o sistema de ultrapurificação. Este sistema consiste em um equipamento Milli-Q Gradient A10 cuja configuração está descrita na Figura 32. Ao final do processo a água tipo I obtida é microfiltrada em membrana de 0,22 $\mu$ m.

É importante lembrar que a água ultrapura não pode ser estocada por mais de um dia, pois constitui um meio para a proliferação de microorganismos além de ser capaz de extrair íons ou plastificantes dos frascos que a contém.



**Figura 32:** Diagrama de funcionamento do sistema de ultrapurificação de água do laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos – Milli-Q Gradient. (A) Válvula solenóide de entrada; (B) bomba; (C) módulo de purificação (para retirada de compostos orgânicos); (D) lâmpada UV (fotooxidação de compostos orgânicos); (E) cartucho de ultrapurificação (resinas trocadoras de leito misto); (F) Sensor de resistividade; (G) válvula 2 vias; (H) filtro de membrana 0,22 $\mu$ m (retira microorganismos e micro partículas) e (I) Válvula de não retorno.

#### 4.2.4 Fase móvel

A utilização do ácido sulfúrico 0,2M (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 por que é um ácido forte o bastante ( $pK_a < 0$ ) para manter a maioria dos ácidos orgânicos protonados. O ácido sulfônico da resina permanecerá ionizado no pH da fase móvel ( $pK_a < 1$ ).

Devido a seu pH baixo, esta fase móvel não pode permanecer parada no sistema cromatográfico. Assim que as análises terminam a coluna deve ser retirada, pois deve estocada na própria fase móvel e em geladeira. Deve-se, então, passar água ultrapura, por aproximadamente 2 horas, no sistema cromatográfico, seguida de uma mistura contendo aproximadamente 10% de acetonitrila em água por 30 minutos.

#### **4.2.5 Microfiltração da fase móvel**

A fase móvel depois de preparada e usada por mais de dois dias deve ser microfiltrada novamente, pois apesar do pH baixo, este meio é altamente propício à formação de algas. Esta fase móvel deve ser estocada em geladeira quando não estiver sendo usada no cromatógrafo e microfiltrada novamente a cada dois dias de uso para evitar o entupimento do filtro solvente (aço sinterizado com poros de aproximadamente 3µm de diâmetro) além dos filtros da coluna. A membrana tipo HA (Millipore) é constituída por acetato de celulose e não é compatível com solventes orgânicos sendo totalmente dissolvida ao entrar em contato com estes. Uma alternativa para o uso deste tipo de membrana que também é altamente inflamável é a membrana de Teflon<sup>®</sup> hidrofílico que tem como desvantagem o alto custo. As membranas de Teflon<sup>®</sup> hidrofóbico também podem ser usadas, mas antes de utilizá-las é preciso passar uma pequena quantidade de metanol ou THF (tetrahydrofurano) para permitir sua molhabilidade e logo depois rinsá-la com a fase móvel a ser microfiltrada. Para este tipo de fase móvel (aquosa) todos os tipos de membranas de microfiltração existentes no mercado seriam quimicamente compatíveis, mas seu uso caracterizaria um custo desnecessário.

A degaseificação da fase móvel, neste método é necessária não somente para evitar a produção de bolhas na bomba do cromatógrafo, mas também para evitar que haja degradação da vitamina C pelo oxigênio dissolvido na fase móvel, durante o processo cromatográfico. No equipamento utilizado (cromatógrafo Waters Alliance 2695), há degaseificação da fase móvel em linha, através de pequenas câmaras de vácuo e tubos de Teflon<sup>®</sup> que permeiam o gás dissolvido na fase móvel, para o ambiente.

#### **4.2.6 Microfiltração das amostras**

A filtração das amostras é igualmente necessária para a proteção dos filtros da coluna (poros de aproximadamente 0,5µm de diâmetro) e do sistema de injeção. Todos os tipos de membrana disponíveis para a filtração de solventes são também utilizados para filtração das amostras, sendo que neste caso o diferencial é o suporte para esta membrana. Os suportes à base de polímeros são descartáveis e os de aço inox reutilizáveis. Estes últimos são pouco usados atualmente devido ao tedioso

procedimento de abertura, retirada, lavagem, rinsagem ou secagem, colocação da membrana e fechamento (vedação) do filtro. Atualmente, os suportes mais utilizados são os de polipropileno, pois possuem maior estabilidade química que os de polietileno. Estes filtros constituem um alto custo para os laboratórios de CLAE e sua reutilização tornou-se uma realidade necessária, tomando-se, é claro, os devidos cuidados com a lavagem e secagem, principalmente para que a membrana em seu interior não seja danificada ou se transforme em fonte de contaminação para as amostras.

Uma alternativa para a dispendiosa microfiltração de amostras é a centrifugação que necessita somente de microtubos reutilizáveis e de uma microcentrífuga. Dois minutos à 12000rpm são o suficiente para depositar no fundo do tubo todo material particulado da amostra. O uso de filtros de linha (em aço e com a mesma porosidade dos filtros de coluna) posicionados logo após o injetor do cromatógrafo é uma outra alternativa viável para não microfiltrar a amostra. A pressão do sistema cromatográfico deve ser constantemente monitorada, pois seu aumento significa que o filtro precisa ser limpo ou trocado.

#### **4.2.7 Cuidados no preparo das amostras**

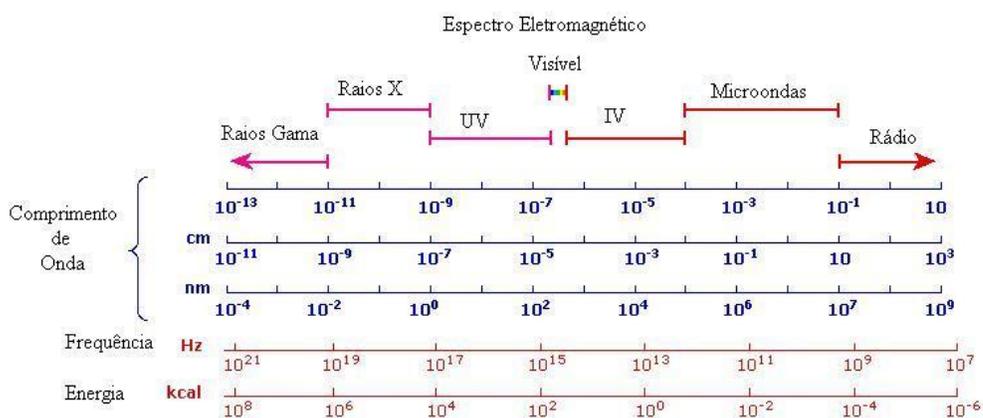
Todas as amostras consistiram de vegetais frescos ou material processado recém aberto, para evitar a degradação da vitamina C mesmo antes do início da análise. As amostras não permaneceram no injetor automático por mais de duas horas (vide item 4.8.2 – Teste de degradação).

A vitamina C é conhecidamente degradada pela ação da luz (radiação ultra violeta). A radiação UV Uma substância antioxidante pode ser degradada pela luz através de absorção direta de energia radiante ou interação com espécies reativas de oxigênio e substâncias fotossensibilizadoras como  $\text{Fe}^{+2}$  (ROPKE *et al.*, 2003). A ação da riboflavina fotoexcitada também catalisa a transferência de elétrons entre o ácido ascórbico e o oxigênio, formando peróxidos (LAVOIE *et al.*, 2004).

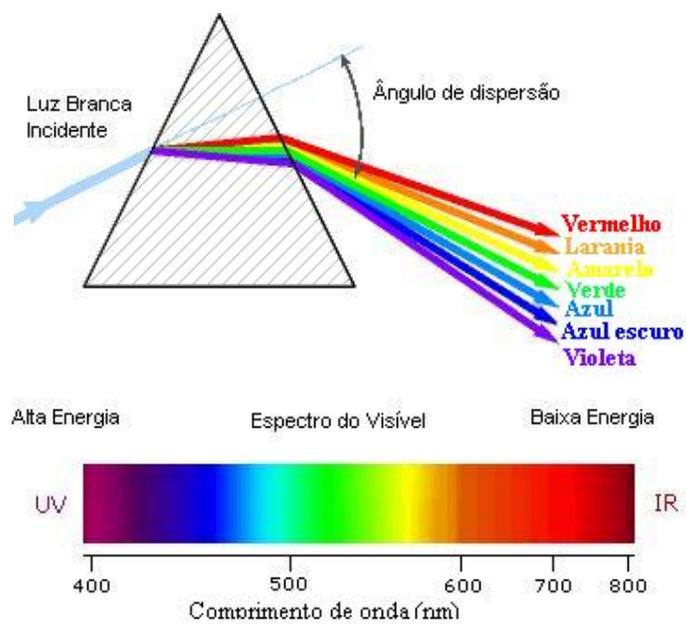
Dentro de espectro eletromagnético (Figura 33) a região da radiação UV pode ser dividida em UV de vácuo (40-190nm), UV distante (190-220nm), UVC (220-290nm), UVB (290-320nm) e UVA (320-400nm). A região do visível compreende a faixa entre de 400nm (violeta) a 800nm (vermelho).

A fim de evitar a degradação da vitamina C pela ação da luz, neste estudo, foi utilizada somente vidraria âmbar e sala escura com luz negra durante o preparo de amostra.

A luz branca contém uma mistura de todos os comprimentos de onda, na região do visível o comprimento de onda correspondente ao violeta é o mais energético e o vermelho o menos energético (Figura 34). A luz amarela (visível - baixa energia) de baixa intensidade ( pouca penetrabilidade) também pode ser utilizada para trabalhos com substâncias fotosensíveis (ALI & PHILLIPPO, 1996). A luz negra, por sua vez, é capaz de filtrar a radiação UV de alta energia, ou seja, emite basicamente radiação UVA.



**Figura 33:** Escalas e radiações do espectro eletromagnético.

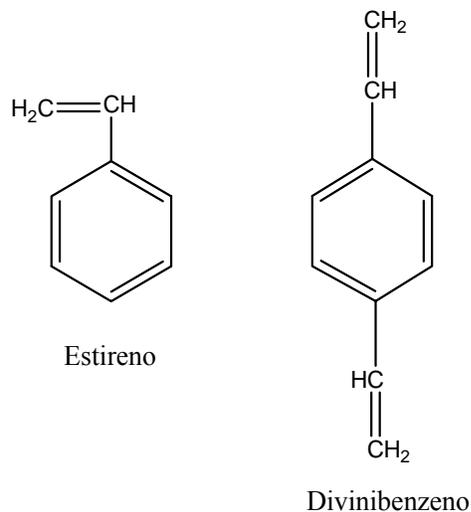


**Figura 34:** Decomposição da luz branca nos comprimentos de onda da região do visível.

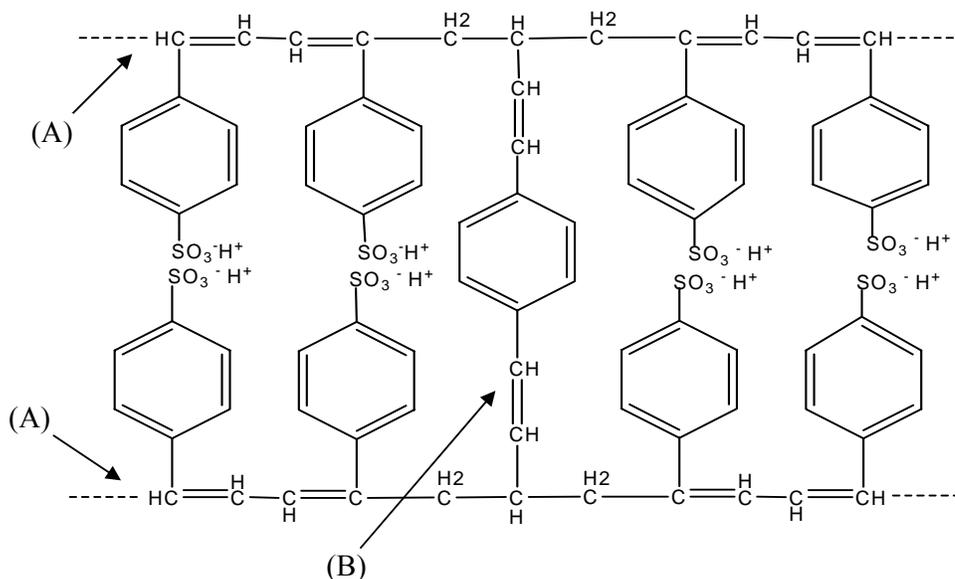
### 4.3 Coluna Cromatográfica

A coluna modelo BIO RAD HPX 87H escolhida pode ser substituída por qualquer similar no mercado, ou seja, uma coluna que possua as mesmas dimensões (7,8mm de diâmetro interno e 300mm de comprimento) e o mesmo contra íon ( $H^+$ ).

A fase estacionária é constituída por uma resina de estireno divinilbenzeno em forma de gel e relativamente rígida devido as ligações cruzadas existentes (Figura 35 e 36). Esta coluna possui 8% de ligações cruzadas, quanto menor o número destas, mais aberta será a estrutura da resina e, portanto, mais permeável para substâncias de maior peso molecular.



**Figura 35:** Estrutura química dos componentes que constituem a fase estacionária.

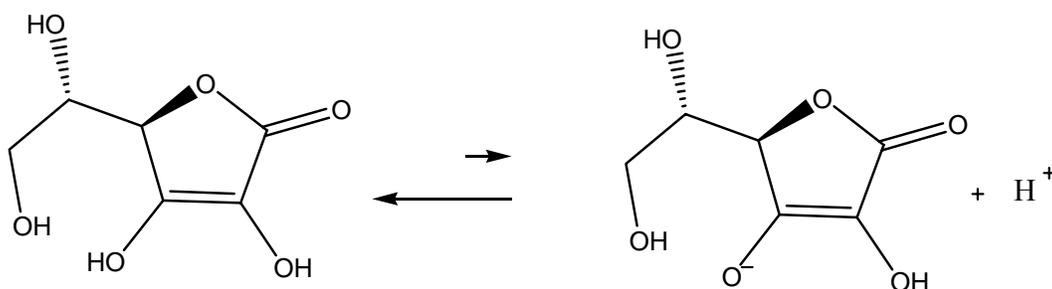


**Figura 36:** Trecho da estrutura química da resina de Estireno-divinilbenzeno sulfonado (fase estacionária). (A) Cadeias de poliestireno sulfonado com grupos separadores para entrada das ligações cruzadas com divinilbenzeno; (B) Ligação cruzada: Divinilbenzeno entre as cadeias de poliestireno.

O mecanismo de separação utilizado é basicamente exclusão iônica e partição por fase reversa. Nesta coluna a força ácida do eluente ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2M) 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) e a adição de modificadores orgânicos como acetonitrila que reduzem as interações hidrofóbicas e mantêm a solubilidade do analito orgânico (MASSON, 2000). Desta forma um analito que não possui carga interage bastante com a fase estacionária apolar. Diminuindo-se a polaridade da fase móvel pela adição de uma substância orgânica estes compostos eluem mais rapidamente da coluna.

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 estacionária, não permitem que o ácido ascórbico esteja na forma ionizada (JUPILLE *et al.*, 1981). Desta forma e, segundo o princípio de Le Chatelier, o equilíbrio da dissociação do ácido ascórbico é deslocado no sentido da forma ácida (protonada) devido ao aumento da concentração de íons  $\text{H}^{+}$  no meio (Figura 37).



**Figura 37:** Dissociação do ácido ascórbico: equilíbrio deslocado para a esquerda (forma protonada) em função do aumento da concentração de íons  $\text{H}^{+}$  do meio pela fase móvel e pela fase estacionária.

Esta coluna custa em torno de R\$ 4.500,00 e necessita de cuidados especiais como limpeza prévia do sistema cromatográfico para que não haja contaminação por solventes orgânicos como sais, bases, aminas, metanol e outros solventes orgânicos. A pressão máxima de trabalho é de 1500psi (libra por polegada quadrada). Um aumento de pressão pode significar simplesmente entupimento nos filtros de entrada e/ou saída (principalmente entrada) da coluna. Neste caso o procedimento de limpeza deve ser deixar a coluna na geladeira durante umas 2 horas, abrir as conexões de entrada e trocá-las rapidamente por novas conexões antes que o leito expanda novamente. Deve-se

tomar bastante cuidado para que não haja vazamentos na conexão recolocada. Se após este procedimento a pressão de trabalho ainda estiver acima do limite, provavelmente houve colapso da estrutura de gel que constitui a fase estacionária e a coluna precisa ser descartada.

A estocagem da coluna enquanto não estiver sendo usada deve ser feita com própria fase móvel (as extremidades devem estar fechadas) e em geladeira. Esta coluna nunca pode ser congelada, pois os cristais de gelo formados em seu interior destroem a estrutura da resina.

#### **4.4 Equipamento utilizado e condições de análise**

O cromatógrafo líquido utilizado foi um modelo não modular Waters Alliance 2695 cuja maior vantagem é possuir um volume morto extremamente pequeno (800 $\mu$ L) permitindo diminuir o alargamento de banda que normalmente ocorre após a injeção da amostra no sistema cromatográfico. Este modelo de cromatógrafo também possui uma bomba com pistões trabalhando em série que é capaz de não produzir pulsos e com isso diminuir bastante a produção de ruído no sinal do detetor.

Utilizando-se detecção por arranjo de diodos foi possível observar que o comprimento de onda de absorção máxima, nas condições de análise deste estudo, foi em média 243nm. Muitos métodos existentes na literatura referem-se à 254nm como o comprimento de onda utilizado, isto acontecia por que os antigos detectores (equipados com lâmpadas de mercúrio) somente eram capazes de medir absorvância de radiação UV neste comprimento de onda (além de alguns outros mediante a utilização de filtros específicos). Nos dias atuais, porém, o uso comum de detectores de arranjo de fotodiodos (PDA) facilitou a determinação do comprimento de onda de absorção máxima para o analito, nas condições de eluição. O detetor PDA oferece informação espectral e permite a comparação de espectros, e aliado ao tempo de retenção, é uma ferramenta importante na tentativa de identificar um composto (FURUSAWA, 2000).

O injetor ou amostrador automático facilita a utilização do sistema cromatográfico e agiliza as análises, uma vez que as injeções podem ser feitas sem interrupções, mesmo durante a noite. O gasto e contaminação da amostra também são menores uma vez que todo o processo de lavagem da agulha e da tubulação (“loop”) é feito pelo próprio equipamento utilizando uma solução de lavagem e a menor quantidade de amostra possível.

No caso da vitamina C, outra vantagem do uso do injetor automático é a capacidade de resfriamento da câmara que permite que as amostras e padrões de calibração estejam sobre uma temperatura de 5°C, aguardando o momento da injeção. Esta temperatura foi escolhida por ser próxima ao limite inferior do injetor automático que é de 4°C e visa diminuir a cinética de degradação da vitamina C após sua extração da matriz do alimento ou mesmo a degradação da solução padrão na solução extrativa (fase móvel).

#### 4.5 Cálculo da concentração de vitamina C

Os teores de vitamina C automaticamente pelo software Empower®, após introdução neste de informações como tempo de retenção do composto da vitamina C, concentração do padrão de calibração, massa da amostra e fator de diluição.

Os cálculos manuais por calibração pontual são fornecidos através do método de padronização externa, onde calcula-se o Fator de Resposta (FR) a partir de um padrão de ácido ascórbico com concentração conhecida. O fator de resposta é simplesmente uma forma de ajustar a proporcionalidade da resposta do detetor à concentração de vitamina C. Os cálculos do Fator de resposta e do teor de vitamina C em mg/100g de amostra serão dados pelas Fórmulas 1 e 2, respectivamente.

$$FR = \frac{\text{Concentração do padrão de vitamina C (mg)}}{\text{Área do pico de vitamina C do padrão de calibração}}$$

**Fórmula 1:** Cálculo do Fator de resposta a partir do padrão de calibração

$$mg / 100g = \frac{\text{Área do pico de vitamina C na amostra} \times FR \times 100}{\text{Massa da amostra (g)}}$$

**Fórmula 2:** Cálculo pontual do teor da vitamina C

Se o padrão foi diluído para 10mL a amostra também o deve ser a não ser que seja feito um ajuste de fator de diluição nos cálculos acima (Tabela 2). Por exemplo, se a amostra foi diluída para 25mL e o padrão para 10mL. A concentração da amostra está

2,5 vezes maior que o padrão, portanto o resultado final deve ser dividido por um fator 2,5 ou multiplicado por 0,4. Se o padrão for diluído para 25mL e a amostra para 10mL, a concentração do padrão estará 2,5 vezes maior que a da amostra e o resultado final deve ser multiplicado pelo fator 2,5.

Os valores de Fator de Resposta devem ser monitorados a fim de avaliar a performance do sistema, mas estes são totalmente dependentes do equipamento que está em uso, portanto não faz sentido comparar fatores de resposta gerados por equipamentos diferentes, pois cada um possui sua própria variabilidade de sinal e precisão.

Para cálculos usando uma curva de calibração a área a ser produzida pelo pico de vitamina C nas amostras deve estar contida entre os valores de área dos pontos que constituem a curva padrão. Portanto as diferentes concentrações do padrão de vitamina C que originarão os pontos da curva devem ser definidas com o intuito de estar relativamente próximas à concentração de vitamina C nas amostras. Além disso, estas concentrações devem estar dentro da faixa de linearidade do método e também acima do limite mínimo de detecção e abaixo do limite máximo de detecção. Estes valores ainda não foram definidos, pois não fazem parte do escopo deste estudo que foi somente desenvolver o método para análise de vitamina C. Os testes realizados dentro deste estudo ainda não constituem, portanto, validação para o método, mas sim uma simples verificação de sua resposta.

Os valores de área versus concentração dos pontos da curva de calibração devem ser plotados em curva (usando-se uma planilha Excel<sup>®</sup>, por exemplo), onde os coeficientes angular e linear serão calculados. O cálculo do teor de vitamina C em mg/100g de amostra será dado pela Fórmula 3.

$$mg / 100g = \frac{(\text{Área do pico de vitamina C na amostra} - b) \times 100}{a \times \text{Massa da amostra (g)}}$$

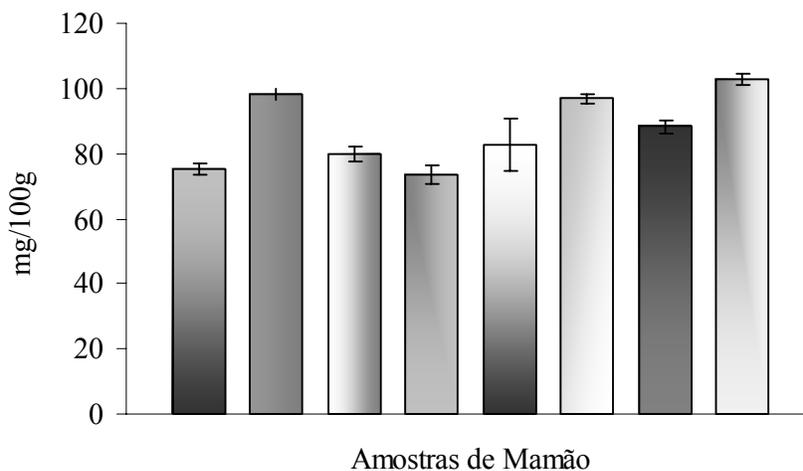
onde: b = Coeficiente Linear (intercepção)  
a = Coeficiente angular (inclinação)

**Fórmula 3:** Cálculo do teor de vitamina C a partir de uma curva de calibração.

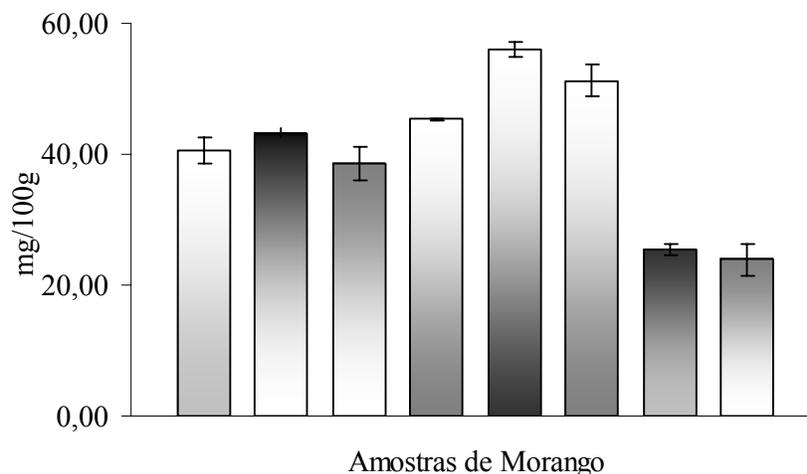
#### 4.6 Avaliação dos teores encontrados em algumas matrizes

As matrizes mais estudadas até agora foram morango e mamão, embora este método já tenha sido utilizado para calcular os teores de vitamina C em tomate, água de coco e sucos de manga, abacaxi, laranja, maçã, caju, maracujá e goiaba.

Os Gráficos 1 e 2 demonstraram a variação dos teores de vitamina C em 8 seqüências de análises de amostras de mamão e morango selecionadas. Cada uma destas seqüências foram compostas por um número que variou entre 4 e 24 frutos (grupos de frutos no caso do morango), analisados individualmente. Os valores médios do teor de vitamina C que os 8 grupos forneceram para mamão e morango foram, respectivamente,  $94,75 \pm 1,92$  e  $40,53 \pm 1,30$ mg de vitamina C/100g de amostra.



**Gráfico 1:** Variação de teores de vitamina C em amostras de mamão.



**Gráfico: 2:** Variação de teores de vitamina C em amostras de morango.

Os teores encontrados para mamão e morango estão de acordo com os descritos pela literatura, sendo  $80,5 \pm 9,5$  para mamão não maduro;  $92,5 \pm 5,0$  para mamão meio maduro;  $148 \pm 13$  para mamão maduro (HERNÁNDEZ *et al.*, 2005) e para morango variando na faixa de 85-40mg/100g dependendo da variedade (CORDENUNSI *et al.*, 2002). Deve-se levar em consideração que no escopo deste estudo não houve controle sobre estes fatores importantes para os teores de vitamina C em vegetais como estágios de maturação, condições de plantio diversas e variedade das frutas estudadas (STURM *et al.*, 2003 e PEREZ *et al.*, 1997)

Os níveis de vitamina C encontrados para as demais matrizes estudadas encontram-se listados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Teor de vitamina C em matrizes vegetais diversas.

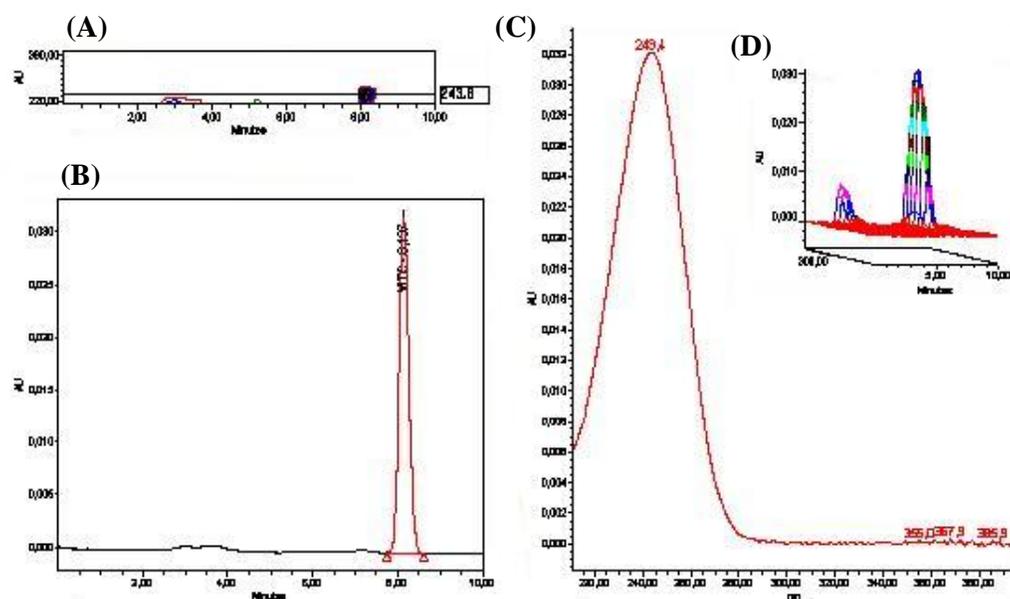
<b>Matriz da amostra</b>	<b>Teor de vitamina C encontrado (mg/100g)</b>
Água de coco	0,88
Tomate	21,03
Suco de Abacaxi	51,18
Suco de Manga	16,58
Suco de Maçã	8,79
Suco de Maracujá	15,60
Suco de Caju	40,21
Suco de Laranja	56,91
Suco de Goiaba	16,30

Batata	39,82
Mandioca	85,33

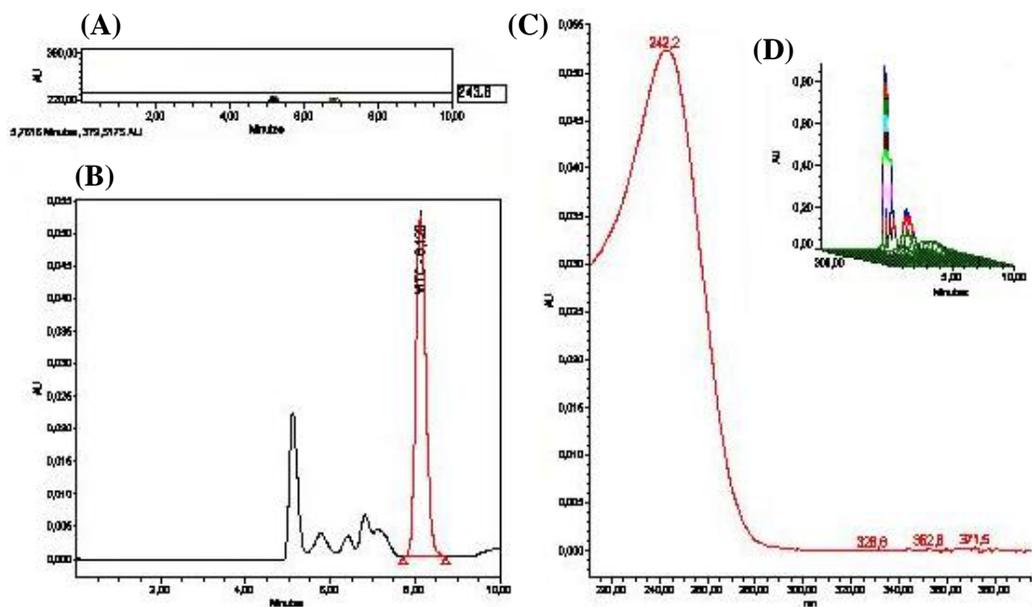
#### 4.7 Avaliação de cromatogramas e espectros

Os cromatogramas e espectros do detetor PDA encontrados em ambas as matrizes mais estudadas é mostrado nas Figuras 38 e 39, a Figura 40 corresponde a uma injeção de padrão de calibração.

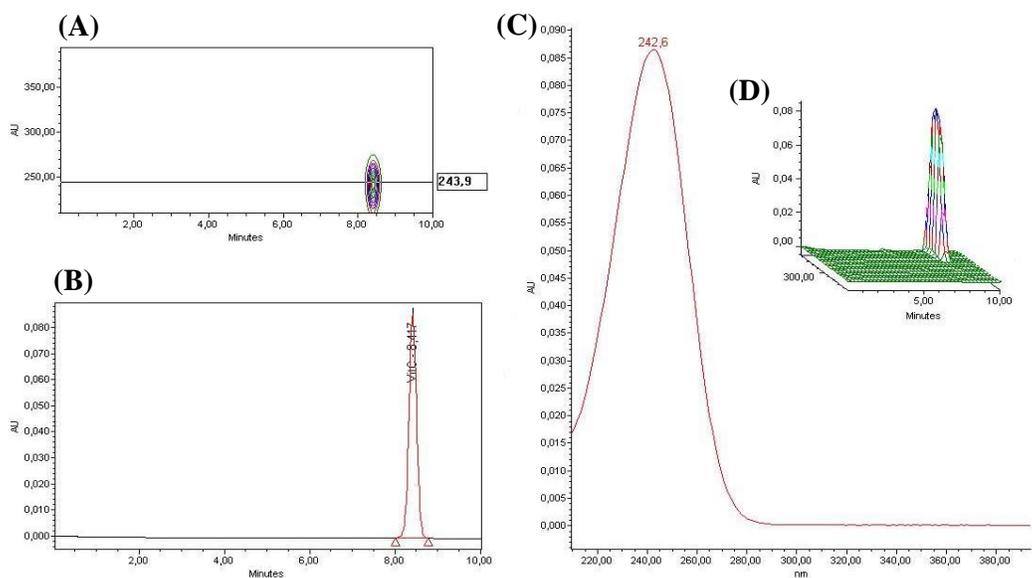
O perfil cromatográfico demonstrou ser bastante satisfatório, apresentando picos de boa magnitude e pureza, com ausência de interferentes. Para uma vazão de fase móvel de 0,8mL/min o tempo de retenção da vitamina C foi de aproximadamente 8,1minutos.



**Figura 38:** Cromatograma de amostra de mamão extraído do conjunto de dados do espectro à 243nm (A); espectro de contorno (vista superior) (B); comprimento de onda de absorção máxima (C) e espectro 3D em miniatura (D).

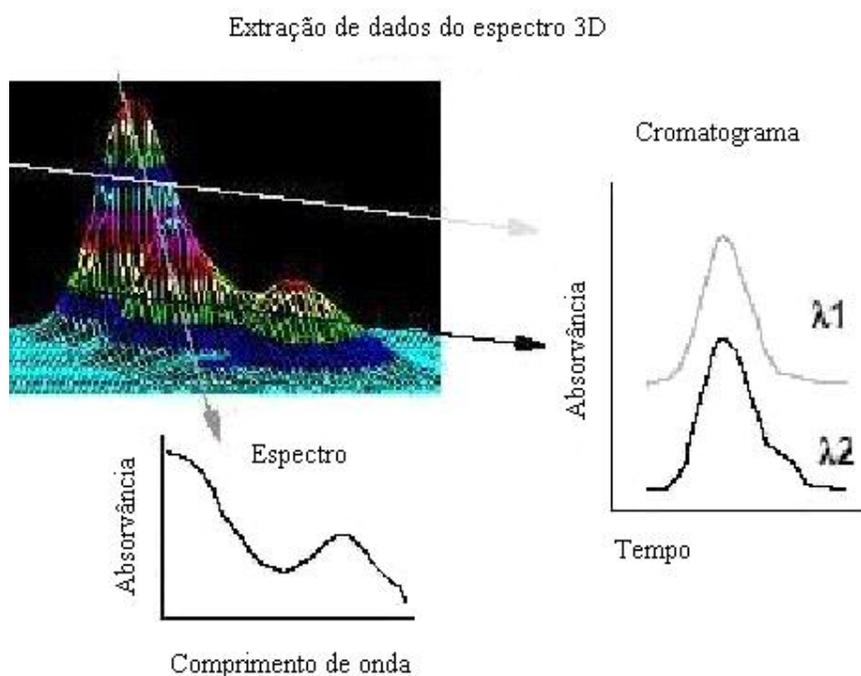


**Figura 39:** Cromatograma de amostra de morango extraído do espectro à 243nm (A); espectro de contorno (vista superior) (B); comprimento de onda de absorção máxima (C) e espectro 3D em miniatura (D).



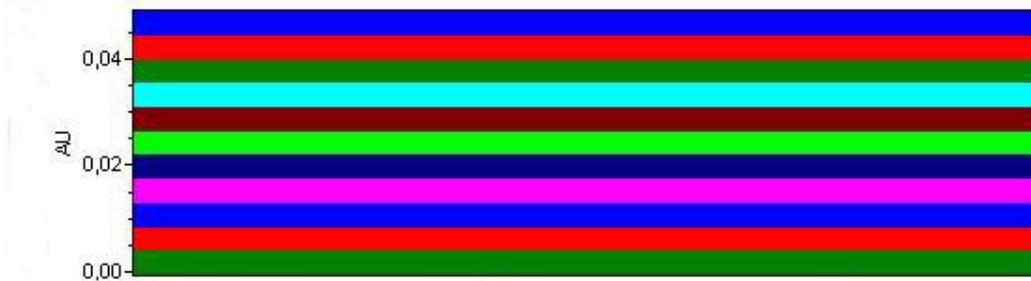
**Figura 40:** Cromatograma de um padrão de calibração de ácido ascórbico extraído do espectro à 243nm (A); espectro de contorno (vista superior) (B); comprimento de onda de absorção máxima (C) e espectro 3D em miniatura (D).

Em um detector tipo PDA as informações são armazenadas em blocos de três dimensões (3D): tempo x intensidade da absorvância x comprimento de onda (Figura 41). Os dados de intensidade de absorção (AU) são coletados quase que instantaneamente para uma faixa pré-estabelecida de comprimento de onda e tempo de corrida cromatográfica. O intervalo de coleta de dados é de 1,2nm. Estas informações podem ser extraídas do conjunto de dados (espectro em 3D) de forma a produzir o cromatograma (tempo x absorvância), onde o comprimento de onda é fixo ou um espectro (comprimento de onda x absorvância) onde a grandeza tempo é fixada em um ponto (normalmente o tempo de retenção de um componente de interesse).



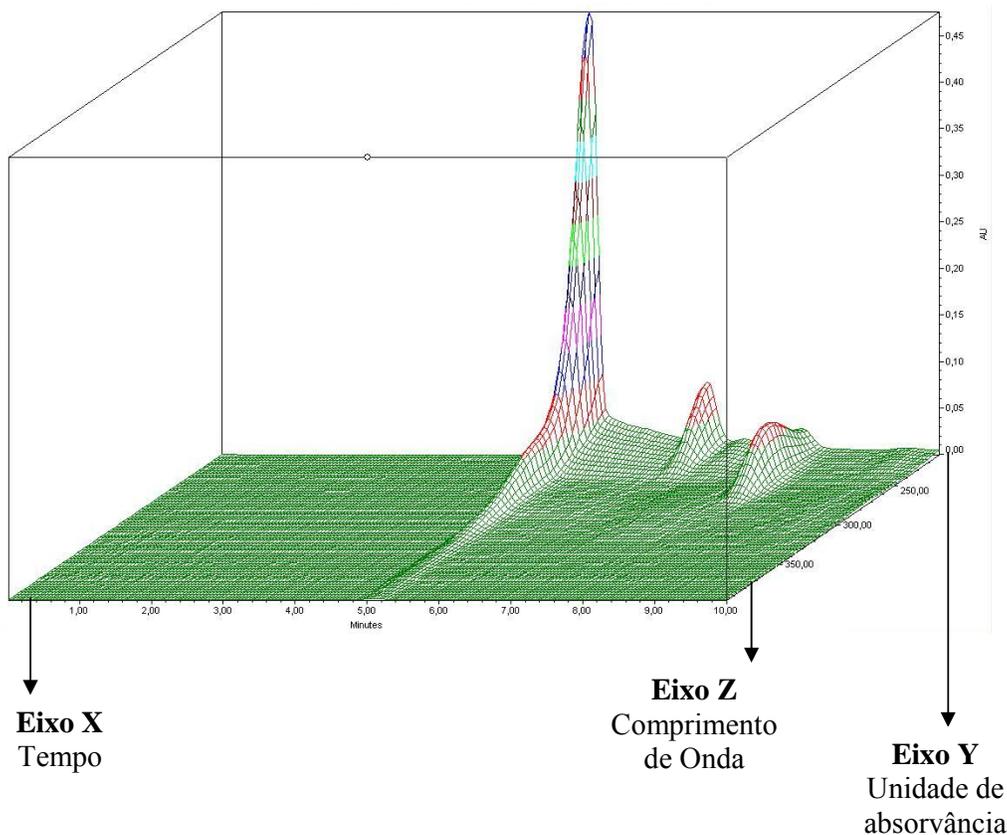
**Figura 41:** Informações em três dimensões do detector PDA.

As cores observadas nos espectros da Figura 42 correspondem às escalas de intensidade em AU (unidade de absorvância).



**Figura 42:** Escala de cores de um espectro de acordo com a intensidade de absorção (AU).

Para a análise de vitamina C em morango (Figura 43) o espectro em 3 dimensões demonstrou que na região de 245nm o pico correspondente ao ácido ascórbico possuiu maior absorção em comparação com substâncias desconhecidas presentes, apesar destes estarem em regiões bastante distintas e não constituírem interferência próxima à região do pico da vitamina C.



**Figura 43:** Espectro 3D de uma amostra de morango, segundo o método proposto neste estudo.

## **4.8 Teste iniciais**

Conforme dito anteriormente, objetivo dos testes comentados a seguir não foi validar o método e sim verificar, inicialmente, sua capacidade de resposta a fim de, se necessário, determinar mudanças nas condições de extração ou cromatográficas e otimizar sua resposta. Buscou-se, no entanto, não perder o foco principal que foi tentar manter a rapidez e simplicidade do método.

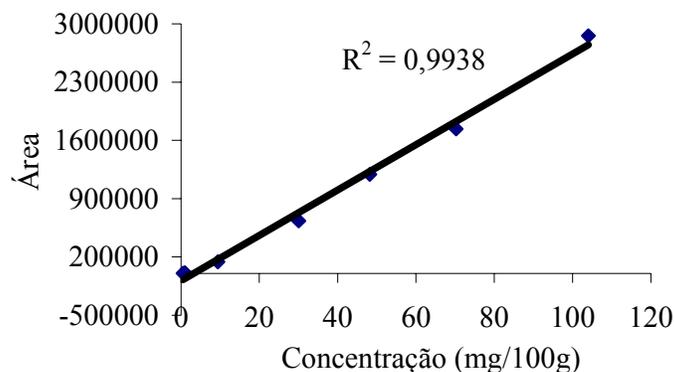
### **4.8.1 Curva de linearidade**

Linearidade é a relação entre a resposta obtida em função da concentração do analito e deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado (LANÇAS, 2004).

A construção da curva de linearidade objetivou a verificação da resposta do método com base nos níveis de concentração encontrados nas amostras estudadas até o momento. Como para as amostras de mamão obteve-se níveis próximos de 100 mg/100g, optou-se por utilizar este nível de concentração como limite superior, sendo 0,5mg/100g o mínimo testado até o início desta verificação. Cabe lembrar que cada ponto representa o resultado médio de cinco preparos de soluções padrão diferentes.

A correlação obtida foi de 0,9938 (Gráfico 3) e pode ser considerada bastante satisfatória sendo possível admitir a resposta do detetor linear para esta faixa de trabalho. Um valor de correlação ( $R^2$ ) maior que 0,90 é o usualmente requerido, sendo o método considerado livre de tendências se o intervalo de confiança obtido pela regressão linear passar pela origem (INMETRO, 2003).

Neste teste, porém, não foram considerados os possíveis efeitos de matriz sobre o sinal percebido pelo detetor que corresponderiam a mudanças no coeficiente de angular da reta (inclinação). Esta será, então, a primeira etapa no estudo de validação do método. Assim que este intervalo for estabelecido, novos critérios de calibração diária deverão ser planejados para o método, uma vez que curvas de calibração somente são preparadas diariamente se o método apresentar um faixa de trabalho não linear (INMETRO, 2003).



**Gráfico 3:** Verificação da linearidade do método para análise de ácido ascórbico por cromatografia líquida de troca iônica, a qual apresentou um desvio padrão de 0,9943 ( $R^2$ ).

#### 4.8.2 Teste de degradação

Um método que se propõe quantificar vitamina C não pode ser tratado como um método onde existem analitos estáveis e a variabilidade pode ser quase exclusivamente reportada à problemas de preparo da amostra e/ou equipamentos.

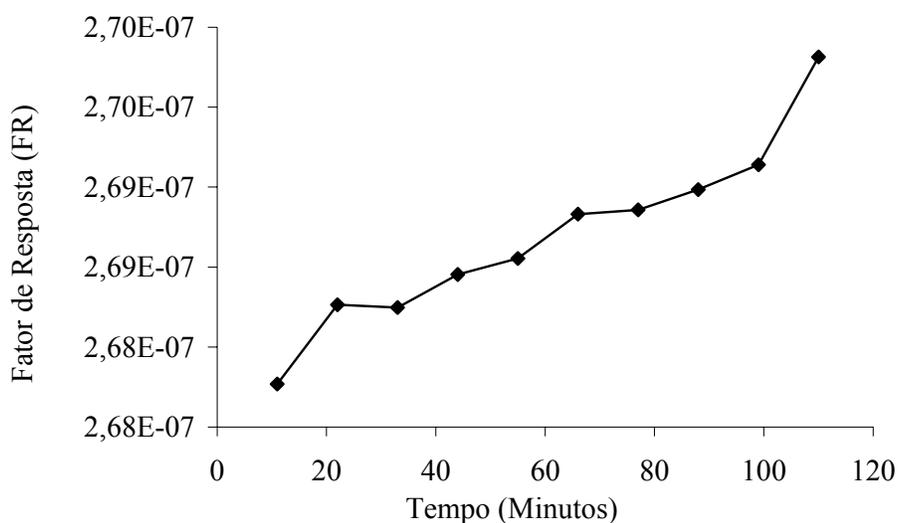
Este teste visou verificar a degradação da vitamina C na solução extrativa enquanto está dentro da câmara resfriada do injetor automático. Inicialmente, testou-se um período de tempo de aproximadamente 2 horas após o preparo das soluções padrão. Novamente, o efeito de matriz (efeito da presença de enzimas e interferentes sobre o ácido ascórbico) ainda não foi considerado, pois partiu-se do princípio que se não for possível estabilizar a vitamina C em uma solução padrão dentro de um período de tempo estabelecido, o método necessitará de ajustes. Os testes com matriz são bastante complexos e provavelmente serão considerados durante a validação do método.

Os cálculos foram feitos com base em fator de resposta (FR) e não concentração de vitamina C uma vez que esta última muda em função da massa de padrão utilizada. Além disso, o fator de resposta é uma forma de ajustar a resposta do detetor, pois se a concentração da solução teoricamente não muda, o sinal em forma de unidade de área também não deveria mudar. Desta forma, se o fator de resposta aumentar, a área estará diminuindo, ou seja a concentração de vitamina C percebida pelo detetor é menor.

Cada uma das três soluções padrão foram injetadas após o preparo e logo a seguir foram injetadas dez vezes no cromatógrafo. Desta forma, a última injeção

correspondeu a uma espera dentro do injetor automático de 110 minutos (10 minutos da corrida cromatográfica e um minuto do processo de injeção, multiplicado pelo número de injeções ocorridas). Cabe ressaltar que, nesta fase de desenvolvimento do método, nunca uma amostra foi deixada no injetor automático por mais de uma hora. Em determinados casos como as amostras de morango que sofreram processamento mínimo e sanificação, cada injeção foi feita imediatamente após o preparo.

Segundo os resultados demonstrados pelo Gráfico 4 a variação média encontrada para o FR nas três soluções de padrão de vitamina C, após 110 minutos em que estiveram no injetor automático foi de  $2,678 \times 10^{-7}$  a  $2,698 \times 10^{-7}$ . Esta variação é extremamente pequena e desprezível a nível de influência nos cálculos dos teores de vitamina C. Conclui-se, portanto, que no intervalo de tempo medido não houve degradação significativa da vitamina C nas soluções padrão.



**Gráfico 4:** Estudo da degradação de padrões de ácido ascórbico em função do tempo de preparo.

#### 4.8.3 Teste de estabilização do ácido ascórbico em função da solução extrativa utilizada

Parte 1 - 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 hidroxí e

também íons metálicos. Quando o ácido ascórbico é dissolvido em água, o pH da solução diminui rapidamente devido a dissociação do hidrogênio do grupo enediol no carbono 3 (LEE *et al.*, 2004). A estabilização do ácido ascórbico em função de baixos valores de pH se dá justamente pela estabilização deste grupo hidroxila e conseqüentemente do anel da lactona, prevenindo a hidrólise irreversível ao ácido 2,3 dicetogulônico (DAVEY *et al.*, 2003).

Em formulações e quando adicionada a alimentos existem tentativas de se estabilizar a vitamina C como por esterificação da hidroxila com ácidos orgânicos de cadeia longa ou, ainda, ácidos inorgânicos (AUSTRIA *et al.*, 1997). 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 ascórbico (RIZZOLO *et al.*, 2002).

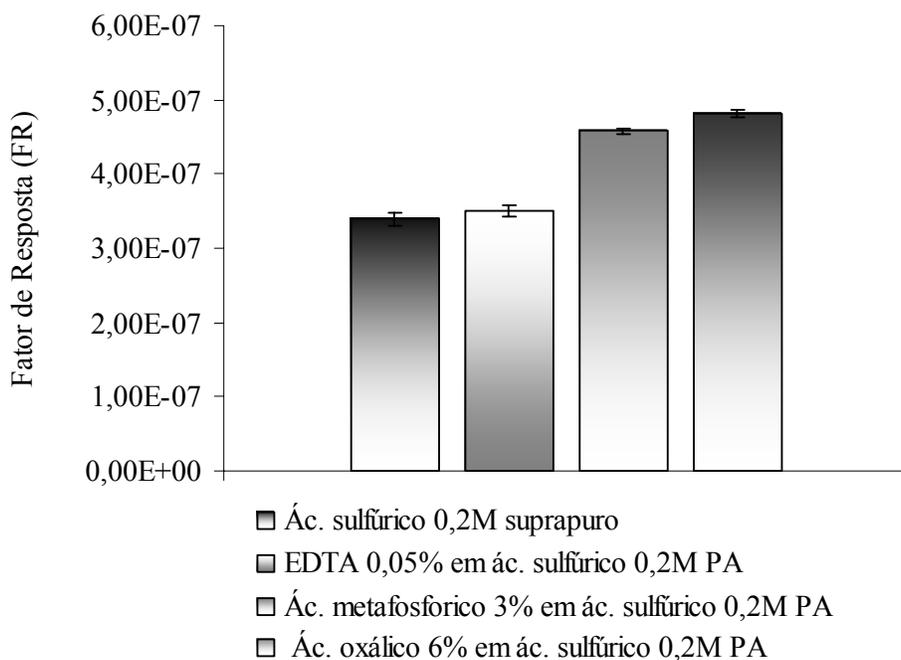
Entre as soluções mais utilizadas na tentativa de extrair o ácido ascórbico e também estabilizá-lo pode-se citar o ácido oxálico ou ácido metafosfórico (3-6%). Estes ácidos são capazes de prevenir a oxidação do ácido ascórbico pela ação de íons cobre (II) ou ferro (III). Ao ácido metafosfórico também é reportada a habilidade de precipitar proteínas e com isso inativar enzimas como a ácido ascórbico oxidase (MACRAE, 1988). Soluções de EDTA, um agente quelante que retira íons metálicos do meio também são citadas como fator de estabilização do ácido ascórbico.

Uma solução de EDTA 0,05% foi reportada como fator de aumento da estabilidade do ácido ascórbico em solução de ácido sulfúrico 0,4M. A citação deste artigo em particular (ARSHOOR, *et al* 1984), clama que a utilização de uma solução de EDTA aumentou a área do pico do padrão de ácido ascórbico 3 vezes, sendo este essencial para aumentar a sensibilidade e reprodutibilidade do método em questão.

Este método também utilizou uma coluna HPX 87H BIORAD e ácido sulfúrico 0,02M como fase móvel (dez vezes menos concentrada que a utilizada neste estudo). Baseando-se nesta observação, principalmente devido às semelhanças entre as metodologias, resolveu-se testar as afirmações quanto ao uso de EDTA e também do ácido oxálico e metafosfórico na extração e estabilização e até mesmo aumento da sensibilidade de detecção do ácido ascórbico. Estas hipóteses foram testadas em soluções padrão de vitamina C, admitindo-se que efeitos de matriz não seriam verificados neste primeiro momento. Todas as soluções foram feitas em ácido sulfúrico 0,2M em função da necessidade da coluna cromatográfica utilizar esta fase móvel.

O teste teve por objetivo comparar a extração de padrões de ácido ascórbico com ácido sulfúrico 0,2M suprapuro (fase móvel) utilizada neste estudo com soluções de ácido oxálico 6% em ácido sulfúrico 0,2M grau Pró Análise (PA), ácido metafosfórico 3% em ácido sulfúrico 0,2M PA e Solução de EDTA 0,05% também em ácido sulfúrico 0,2M PA. Dez extrações de cada solução foram feitas e os resultados reportados em termos de fator de resposta. Pois quanto menor for o fator de resposta, maior área e conseqüentemente menor terá sido a degradação do padrão de ácido ascórbico.

Os resultados (Gráfico 5) 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 um pouco menos eficiente que a de ácido sulfúrico 0,2M suprapuro (pH 1,4). Desta forma, considera-se que a solução de ácido sulfúrico suprapuro 0,2M 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 extrativa, diferente da fase móvel.



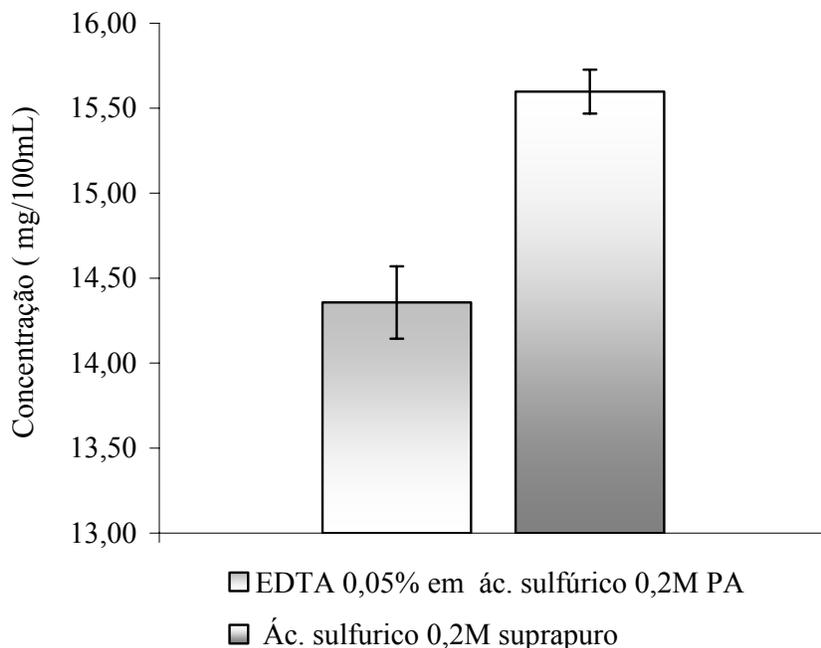
**Gráfico 5:** Estudo da eficiência de extração de ácido ascórbico (AA) pela utilização de diversas soluções extrativas, os resultados estão expressos pelo fator de resposta, o qual é inversamente proporcional à quantidade de AA extraída. Barras verticais representam o erro padrão da média.

Parte 2 - Este teste objetivou testar a eficiência das soluções extrativas que forneceram os melhores resultados de estabilização com a solução padrão (EDTA 0,05% em ácido sulfúrico PA 0,2M e ácido sulfúrico suprapuro 0,2M) na extração de uma amostra e com isso verificar a influência do efeito de matriz.

O valor médio de mg de vitamina C por 100mL de suco, encontrado nas 10 repetições com a solução de EDTA e somente com ácido sulfúrico 0,2M foram, respectivamente,  $14,36 \pm 0,21$  e  $15,60 \pm 0,13$  (Gráfico 6). O teor informado no rótulo do produto foi de 15mg/100mL.

A diferença de aproximadamente 1,2 mg de vitamina C entre as extrações não permite concluir que a solução de ácido sulfúrico suprapuro extrai e/ou estabiliza melhor a vitamina C no meio, principalmente por que a precisão (variabilidade) do método ainda não foi estudada. 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 coloração (TRAN & FARID, 2004).

Uma próxima etapa a ser testada neste método pode ser a extração de uma matriz sólida e sem adição de ácido ascórbico. Neste procedimento pode-se avaliar a eficiência da extração com fase móvel utilizada normalmente neste estudo contra solução com ácido metafosfórico e sua habilidade de inativar enzimas. O custo/benefício da introdução de mais um novo preparo de solução deve ser avaliado em função de um aumento real de recuperação da vitamina C na matriz vegetal.



**Gráfico 6:** Extração de vitamina C em suco de maracujá utilizando soluções extrativas diferentes.

#### 4.8.4 Testes de recuperação

##### 4.8.4.1 Verificação da recuperação a partir de suplemento vitamínico

O objetivo deste teste foi verificar a recuperação percentual do método a partir de amostras de Cewin<sup>®</sup>. A dosagem informada no rótulo (200mg/mL) foi utilizada como parâmetro de controle, ou seja, correspondeu à 100% de recuperação. A recuperação média obtida (Tabela 7) para as dez repetições da amostra de suplemento vitamínico foi de  $99,45\% \pm 0,63$ .

**Tabela 7:** Recuperação da extração de vitamina C numa amostra de Cewin<sup>®</sup>.

Preparo	Teor encontrado (mg/mL)	Recuperação
1	201,91	100,96
2	203,39	101,70
3	197,95	98,98
4	196,99	98,50

5	193,44	96,72
6	195,43	97,72
7	197,73	98,89
8	206,73	103,37
9	197,91	98,96
10	197,45	98,73
<b>Média:</b>		<b>99,45</b>
<b>*Erro:</b>		<b>0,63</b>

\*Erro padrão da média

#### 4.8.4.2 Verificação de recuperação a partir de matriz de fruta (mamão – *Carica papaya* L. var. Sunrise solo)

O percentual de vitamina C extraído desta matriz foi menor do que recuperado no suplemento vitamínico, pois neste a disponibilidade do ácido ascórbico é muito maior. A retirada da vitamina C do material vegetal (células e matriz de celulose) exige que a matriz esteja bastante homogeneizada, inclusive a nível de tamanho de partículas. Uma recuperação de 81,22% (Tabela 8), no entanto, é considerada adequada, pois dependendo da complexibilidade da análise níveis de recuperação variando de 70 a 120% são considerados aceitáveis (RIBANI *et al.*, 2004).

**Tabela 8:** Recuperação da extração de vitamina C em amostras de mamão.

Teor de vitamina C encontrado nas amostras com adição de padrão (mg/100g)	Recuperação (%)
57,09	80,32
55,41	80,27
55,71	80,73
58,20	83,44
59,44	81,35
<b>Média:</b>	
<b>81,22</b>	
<b>*Erro:</b>	
<b>0,59</b>	

\*Erro padrão da média

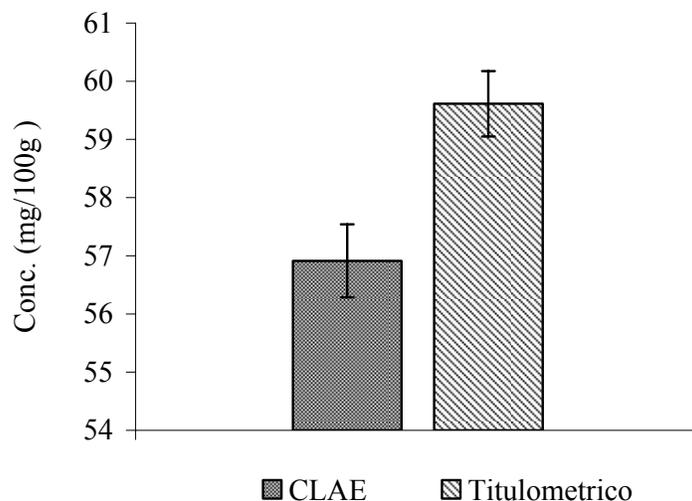
A vitamina C é um analito bastante sensível, mas os níveis de recuperação na amostra de suplemento vitamínico permitem concluir que o processo de extração e análise da vitamina C não está contribuindo para a sua degradação. Esta conclusão,

porém, não pode ser extrapolada para a eficiência da extração em matriz vegetal e para a degradação do ácido ascórbico na presença dos efeitos de matriz como presença de íons metálicos, enzimas e substâncias oxidantes.

#### **4.8.5 Teste de comparação com método titulométrico**

O método titulométrico para determinação de vitamina C utiliza o corante 2,6-diclorofenol-indofenol e baseia-se na redução deste pelo ácido ascórbico, este método apresenta problemas em relação a interferentes que possam, como o ácido ascórbico, reduzir este reagente. Os resultados médios obtidos para as 12 repetições de dosagem de vitamina C em suco de laranja comercial, demonstraram que o método objetivo deste estudo (CLAE) apresentou teores de  $56,91 \pm 0,62$  e o método titulométrico  $59,61 \pm 0,56$  (Gráfico 7). A diferença entre os métodos foi de aproximadamente 4,5%. O que não constitui diferença significativa uma vez que a precisão de ambos os métodos ainda não é conhecida.

Uma justificativa para os teores maiores fornecidos pelo método titulométrico seria a presença, na amostra suco de laranja comercial, de antioxidantes fenólicos como flavonóides que podem também reagir com o corante (GÜÇLÜ *et al.*, 2004) e a presença de SO<sub>2</sub> (utilizado como conservante em sucos) que também é um agente redutor como a vitamina C (VINCI *et al.*, 1995).



**Gráfico 7:** Comparação entre os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de troca iônica e por titulometria para análise de ácido ascórbico em matriz de laranja. Barras verticais representam o erro padrão da média.

#### 4.8.6 Ensaio de proficiência

O NIST (*National Institute of Standards and Technology*) é uma agência federal sem poder regulatório pertencente ao governo dos Estados Unidos cuja principal missão é desenvolver e promover medidas e materiais padrões. O NIST já reconhecia a necessidade de materiais de referência em matriz de alimento antes de 1987, ano em que lançou o material de referência 1563 para colesterol e vitaminas lipossolúveis em óleo de coco (SHARPLESS *et al.*, 2000).

Materiais de referência bem caracterizados são muito necessários em laboratórios de análise de alimentos, pois facilitam e aumentam a acurácia da informação nutricional e de segurança alimentar. Estes materiais ainda são escassos hoje em dia e o acesso a eles é bastante custoso em função de toda a confiabilidade reportada.

A definição ISO para um teste de proficiência é “determinação da performance de um ensaio mediante comparações interlaboratoriais”. Um teste de proficiência difere dos estudos colaborativos (usados para validar um método padrão) ou estudos de certificação (usados para estabelecer o valor real de concentração de um analito em um material de referência). Um ensaio de proficiência é uma comparação do resultado de

cada laboratório com a melhor estimativa do valor real do analito em questão, onde cada participante utiliza seu próprio método de análise (FAPAS, 2002).

Ser aprovado em testes de proficiência é essencial na tentativa de assegurar a qualidade dos resultados de um método. O FAPAS<sup>®</sup> (*Food Analysis Performance Assessment Scheme*) é um sistema de planejamento de ensaios interlaboratoriais administrado por um grupo denominado Grupo de Teste de Proficiência localizado em um laboratório central na cidade de York, Reino Unido.

O desempenho dos resultados dos laboratórios participantes foi estabelecido pelo índice-z que mede quanto os resultados estão afastados do valor designado (verdadeiro), comparando o erro estimado de um resultado com um valor alvo para o desvio padrão. O valor alvo de desvio padrão pode ser considerado como sendo um valor de desvio padrão que, através de cálculos específicos (equação de horwitz), é designado como o valor de desvio padrão objetivo para uma medida de qualidade (FAPAS, 2002).

O Z- score ou índice-z foi calculado a partir da fórmula:

$$z = \frac{X - Xd}{\sigma}$$

Onde: X = O resultado do laboratório participante

Xd= Valor certificado pelo FAPAS

$\sigma$  = Valor alvo de desvio padrão

O critério estabelecido para classificar o resultado de um participante encontra-se discriminado na Tabela XX:

**Tabela 9:** Critérios de classificação do FAPAS.

<b> Z </b>	<b>Resultado</b>
< 2	Satisfatório
2 < e < 3	Questionável
> 3	Insatisfatório

A amostra teste foi suco de limão (lemon cordial) homogeneizado por 18 horas em agitação magnética, sob nitrogênio, em ausência de luz e à 4°C. Aliquotas de 30mL colocadas em frascos âmbar foram enviadas para os participantes do teste. O valor

certificado de vitamina C para esta amostra foi de 101mg/100mL sendo que dos 50 participantes, 44 (88%) obtiveram valores de z-escore satisfatórios ( $\leq 2$ ).

O resultado obtido presente método (designado como participante 016) foi de 97,49mg/100mL correspondendo a um z-escore de -0,6 (Figura 44).

A recuperação de 96% obtida foi bastante satisfatória, podendo o resultado deste ensaio de proficiência ser considerado como a primeira etapa no processo de validação do método rápido de análise de vitamina C por exclusão iônica fruto do projeto de mestrado apresentado nesta dissertação.

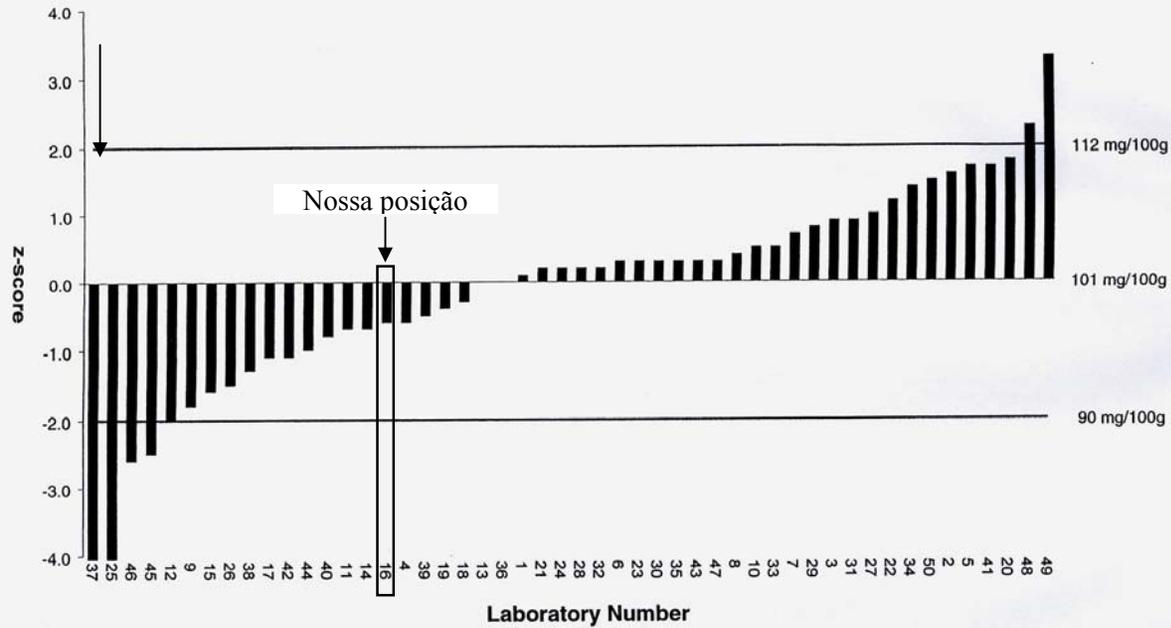


Figure 1: z-Scores for Vitamin C (101 mg/100g) in Lemon Cordial Test Material

**Figura 44:** Gráfico de z-escore, resultado do ensaio interlaboratorial FAPAS® de vitamina C realizado em fevereiro de 2004. A altura da barra indica o valor de z-escore atingido pelo laboratório participante e a posição horizontal indica o distanciamento deste do valor certificado de 101 mg/100g.

## 5. CONCLUSÕES

O método desenvolvido apresentou um perfil cromatográfico límpido em todas as matrizes vegetais estudadas até o momento. Dentre os testes realizados, o teste de degradação em função do tempo permitiu estabelecer um marco inicial como o período de aguarda da amostra no injetor automático, sendo de até duas horas depois do preparo. Testes com tempos maiores devem ser feitos até que seja estabelecido um valor não aceitável de variação de fator de resposta.

Embora a verificação de extração em matriz sólida ainda seja recomendada, os testes com padrão e suco de fruta demonstraram que a utilização da fase móvel como solução de extração foi a melhor escolha para a estabilização da vitamina C.

A comparação com o método titulométrico forneceu resultados ligeiramente menores, porém esse método conhecidamente tende a apresentar resultados maiores devido a presença de interferentes redutores.

A validação do método com a variação sistemática de parâmetros como robustez, precisão, linearidade com efeito de matriz, seletividade, limite de detecção e limite de quantificação ainda deve ser feita, mas os níveis encontrados nas matrizes estudadas até agora demonstraram que o método respondeu linearmente.

Os níveis de recuperação encontrados, tanto em análise de suplemento vitamínico como em matrizes de frutas encontraram-se dentro da faixa de aceitação. O resultado do ensaio de proficiência produziu igualmente excelentes resultados de recuperação.

O método desenvolvido a partir deste estudo atingiu, portanto, o objetivo de promover uma boa separação cromatográfica para a vitamina C em um tempo reduzido de corrida e um preparo de amostra igualmente rápido e simples.

A vitamina C é um analito extremamente instável, mas o presente método provou extrair e manter boa recuperação desta, sendo deste modo considerado adequado para o seu propósito original e pronto para seguir em estudos de validação que estabelecerão parâmetros quantitativos quanto à sua performance.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. <b>Portaria nº 41 de 14 de janeiro de 1998</b> , anexo A. Regulamento técnico para rotulagem nutricional de alimentos embalados. República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 de janeiro de 1998. Disponível em: < <a href="http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=82&amp;word=">http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=82&amp;word=</a> > Acesso em: 06 ago. 2005.
AOAC International (Association of Official Analytical Chemists International). Official Method 967.21. Ascorbic acid in vitamin preparations and juices. 2,6 dicloroindofenol method. 2000.
AOAC International (Association of Official Analytical Chemists International). Official Method 967.22. Vitamin C (Total) in vitamin preparations microfluorometric method. 2000.
FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme). Protocol – organization and data analysis. 6. ed., York, 2002, 42p.
<b>MILLIPORE CORP. MilliQ Gradient ??? ASTM - Standard especificacion for reagents water. ASTM document. D 1193-91(1991).</b>
AUSTIN, S.; HITCHCOCK, C. The Linus Pauling – Mayo Clinic controversy involving vitamin C and cancer tests. <b>Nutrition Health Review</b> , 1995. Disponível em: < <a href="http://www.parentsurf.com/p/articles/mi_m0876/is_n71/ai_16535117">http://www.parentsurf.com/p/articles/mi_m0876/is_n71/ai_16535117</a> >. Acesso em 06 ago. 2005.
COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. <b>Introdução a métodos cromatográficos</b> . 2. ed. Campinas: Editora Unicamp, 1987. 279p.
HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. <b>Food Chemistry</b> , In Press, 2005.
<b>??? INMETRO. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008, março 2003, 35 p.</b>
JUPILLE, T.; GRAY, M.; BLACK, B.; GOULD, M. Ion moderated partition HPLC. <b>International Laboratory</b> , v. 11, n. 6, p. 84-89, 1981.
KLENNER, F. R. Observations on the dose and administration of ascorbic acid when employed beyond the range of a vitamin in human pathology. <b>Journal of Applied Nutrition</b> , v. 23, n. 3-4, p. 61-88, 1971.
MACRAE, R.; SCHWEIGERT, B. <b>HPLC in food analysis</b> . Hardbound, Academic Press, 1988. 340p.

NAIDU, K. A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. <b>Nutrition Journal</b> , v. 2, p.2-7, 2003.
MERCK & CO., INC. <b>The Index Merck</b> . 9. ed. Rahway: Merck & Co. inc., 1976
TRUSWELL, A. S. Ascorbic acid (letter). <b>New England Journal of Medicine</b> , v. 315, p.709, 1986.
ALI, M. S.; PHILLIPPO, E. T. Simultaneous determination of ascorbic, dehydroascorbic, isoascorbic and dehydroisoascorbic acids in meat-based food products by liquid chromatography with post column fluorescence detection: a method extension. <b>Journal of AOAC International</b> , v. 79, n. 3, p. 803-807, 1996.
ALMAGRO, I.; SAN ANDRES, M. P.; VERA, S. Determination of water-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by reversed-phase liquid chromatography with a mobile phase containing sodium dodecylsulphate and n-propanol. <b>Chromatographia</b> , v. 55, p. 185-188, 2002.
ANTONELLI, M. L.; D'ASCENZO, G.; LAGANÀ, A.; PUSCEDDU, P. Food analyses: a new calorimetric method for ascorbic acid (vitamin C) determination. <b>Talanta</b> , v. 58, p. 961-967, 2002.
AQUINO, F. R. N.; NUNES, D. S. S. <b>Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins</b> . Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 179p.
ARAÚJO, J. M. A. <b>Química de alimentos: teoria e prática</b> . 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 1999. 416p.
ARGIROV, O. K.; LIN, B.; OLESEN, P.; ORTWERTH, B. J. Isolation and characterization of a new advanced glycation endproduct of dehydroascorbic acid and lysine. <b>Biochimia et Biophysica Acta</b> . v. 1620, p. 235-244, 2003.
ARONSON, J. K. Forbidden fruit. <b>Nature Medicine</b> , v. 7, n. 1, p. 29-30, 2001.
ASHOOR, SH.; WOODROW C. M.; WELTY J. Liquid chromatographic determination of ascorbic acid in foods. <b>J. AOAC</b> , v.67, p. 78-80, 1984.
ASSIS, S. A.; LIMA, D. C.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. <b>Food Chemistry</b> , v. 74, p. 133-137, 2001.
AUSTRIA, R.; SEMENZATO, A.; BETTERO, A. Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. <b>Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis</b> , v. 15, p. 795-801, 1997.
BASU, T. K.; SCHORAH, C. J. <b>Vitamin c in health and disease</b> . Londres: AVI Pub. Co.,1982. 152p.
BEHRENS, W. A.; MADÈRE, R. Ascorbic acid, isoascorbic acid, dehydroascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in selected food products. <b>J. of Food Composition and</b>

<b>Analysis</b> , v. 7, p. 158-170, 1994.
BIANCHI, J; ROSE, R. C. The chromatographic separation and radiochemical quantification of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and diketoglucônic acid. <b>J. of Micronutrient Analysis</b> , v. 1, p. 3-11, 1985.
CARPENTER, K. J. <b>The history of scurvy and vitamin C</b> . 8. ed. New York: Cambridge University Press, 1966. 288p.
CARR, A. C.; FREI, B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. <b>Am. J. Clin. Nutr.</b> , v. 69, n. 6, p. 1086-1107, 1999.
CECCHI, H. M. <b>Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos</b> . 2. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2003. 207p.
CHANG, M.; CHANG, C. Simultaneous HPLC determination of hydrophilic whitening agents in cosmetic products. <b>Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis</b> , v. 33, p. 617-626, 2003.
CHEFTEL, J. C.; CHEFTEL, H.; BESANÇON, P. <b>Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos</b> . Tradução de Francisco López Capont. Zaragoza: Editorial Acribia, 1977. 404p.
CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. <b>Análise instrumental</b> . Rio de Janeiro: Interciência, 2000. 606p.
CIOLA, R. <b>Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho</b> . São Paulo: Edgard Blucher, 2003. 192p.
CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. <b>Journal of Agric. and Food Chem.</b> , v. 50, n. 9, p. 2581-2586, 2002.
DABROWSKI, K.; HINTERLEITNER, S. Applications of a simultaneous assay of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and ascorbic sulphate in biological materials. <b>Analist</b> , v. 114, p. 83-87, 1989.
DAVEY, M. W.; DEKEMPENEER, E.; KEULEMANS, J. Rocket-powered high-performance liquid chromatographic analysis of plant ascorbate and glutathione. <b>Analytical Biochemistry</b> , v. 316, p. 74-81, 2003.
DAVEY, M. W.; MONTAGU, M.; V.; INZE, D.; SANMARTIN, M.; KANELIS, A.; SMIRNOFF, N.; BENZIE, I. J. J.; STRAIN, J. J.; FAVELL, D.; FLETCHER, J. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. <b>J. Sci. Food Agric.</b> , v. 80, n. 7, p. 825-860, 2000.
DRISKO, J. A.; CHAPMAN, J.; HUNTER V. J. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. <b>Gynecologic Oncology</b> , v. 88, p. 434-439, 2003.

<p>ESTEVE, M. J.; FARRÉ, R.; FRÍGOLA, A.; LÓPEZ J. C.; ROMERA, J. M.; RAMIREZ, M.; GIL, A. comparison of voltammetric and high performance liquid chromatographic methods for ascorbic acid determination in infant formulas. <b>Food Chemistry</b>, v. 52, p. 99-102, 1995.</p>
<p>FURUSAWA, N. Rapid high-performance liquid chromatographic identification and quantification of total vitamin C in fruit drinks. <b>Food Control</b>, v. 12, p. 27-29, 2000.</p>
<p>GARDNER, P. T.; WHITE, T. A. C.; McPHAIL, D. B.; DUTHIE, G. G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolic acids to the antioxidant potential of fruit juices. <b>Food Chemistry</b>, v. 68, p. 471-474, 2000.</p>
<p>GEIGERT, J.; HIRANO, D. S.; NEIDLEMAN, S. L. High performance liquid chromatographic method for the determination of L-ascorbic acid and D-isoascorbic acid. <b>J. of Chromatography</b>, v. 206, p. 396-399, 1981.</p>
<p>GHANI, A. G. A.; FARID, M. M.; CHEN, X. D. Theoretical and experimental investigation of thermal destruction of vitamin C in food pouches. <b>Computers and electronics in agriculture</b>, v. 34, p. 129-143, 2002.</p>
<p>GÖKMEN, V.; KAHRAMAN, N.; DEMIR N.; ACAR, J. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. <b>J. Of Chromatography A</b>, v. 881, p. 309-316, 2000.</p>
<p>GÜÇLÜ, K.; SÖZGEN, K. TÜTEM, E.; ÖZYÜREK, M.; APAK, R. Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper (II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals. <b>Talanta</b>, In Press, 2004.</p>
<p>HEMILÄ, H. Vitamin C and the common cold, <b>British J. Nutrition</b>, v. 67, n. 1, p. 1-16, 1992.</p>
<p>HEMILÄ, H. Vitamin C supplementation and common cold symptoms: factors affecting the magnitude of the benefit. <b>Medical Hypotheses</b>, v. 52, n. 2, p. 171-178, 1999.</p>
<p>HEMILÄ, H. Vitamin C supplementation and common cold symptoms: problems with inaccurate reviews. <b>Nutrition</b>, v. 12, n. 11/12, p. 804-809, 1996.</p>
<p>HIDIROGLOU, N.; MADÈRE, R.; BEHRENS, W. Electrochemical determination of ascorbic acid and isoascorbic acid in ground meat and in processed foods by high pressure liquid chromatography. <b>J. of Food Composition and Analysis</b>, v. 11, p. 89-96, 1998.</p>
<p>HYVER, K. J.; SANDRA, P. <b>High resolution gas chromatography</b>. 3. ed., Avondale: Hewlett-Packard Co., 1989. 320p.</p>
<p>IVANOVIC, D.; POPOVIC, A.; RADULOVIC, D.; MEDENICA, M. Reversed-phase ion pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals. <b>Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis</b>, v. 18, p. 999-1004, 1999.</p>

JEFFERY G. H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C. <b>Vogel: Análise química quantitativa</b> . Tradução de Horacio Macedo. 5. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., 1992. 712p.
JUNG, C.; WELLS, W. W. Spontaneous conversion of L-dehydroascorbic acid to L-ascorbic acid and L-erythroascorbic acid. <b>Archives of biochemistry and biophysics</b> , v. 355, n. 1, p. 9-14, 1998.
KABASAKALIS, V.; SIOPIDOU, D.; MOSHATOU, E. Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. <b>Food Chemistry</b> , v. 70, p. 325-328, 2000.
LAM, F.; HOLCOMB, I. J.; FUSARI, S. A. Liquid chromatographic assay of ascorbic acid, niacinamide, pyridoxine, thiamine and riboflavin in multivitamin-mineral preparations. <b>J. AOAC</b> , v. 67, n. 3, 1007-1011, 1984.
LANÇAS, F. M. <b>Cromatografia em fase gasosa</b> . São Carlos: Acta, 1993. 254p.
LANÇAS, F. M. <b>Validação de métodos cromatográficos de análise</b> . São Carlos: Rima, 2004. 62p.
LAVOIE, J. C.; CHESSEX, P.; ROULEAU, T.; MIGNEAULT, D.; COMTE, B. Light-induced byproducts of vitamin C in multivitamin solutions. <b>Clinical Chemistry</b> , v. 50, n.1, p. 135-140, 2004.
LEE, J. S.; KIM, J. W.; HAN, S. H.; CHANG, I. S.; KANG, H. H.; LEE, O. S.; OH, S. G.; SUH, K. D. The stabilization of L-ascorbic acid in aqueous solution and water-in-oil-in-water double emulsion by controlling the pH and electrolyte concentration. <b>J. Cosmet. Sci.</b> , v. 55, p. 1-12, 2004.
LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. <b>Postharvest Biology and Technology</b> , v. 20, p. 207-220, 2000.
LEONG, L. P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. <b>Food Chemistry</b> , v. 76, p. 69-75, 2002.
LESTER P.; FUCHS, J. <b>Vitamin C in health and disease</b> . New York: M. Dekker, 1997. 538p.
LINDSAY, S. <b>High performance liquid chromatography</b> . 2. ed. Londres: Thames Polytechnic, 1992. 336p.
LOEWUS, F. A. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. <b>Phytochemistry</b> , v. 52, p. 193-210, 1999.
LOOKHART, G. L.; HALL S. B.; FINNEY, K. F. Determination of ascorbic acid in wheat flours, bread dough conditioners and commercial vitamin C tablets by High Performance Liquid Chromatography. <b>Cereal Chem.</b> , v. 59, n. 1, p. 69-71, 1982.

LU, X.; SEIB, P. A. Assay of dehydroascorbic acid in bread and dough added as a crystalline dimer. <b>Cereal Chem.</b> , v. 75, n. 2, p. 200-206, 1998.
McCAL, M. R.; FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in Humans? <b>Free Radical &amp; Medicine</b> , v. 26, n. 7/8, p. 1034-1053, 1998.
MOSCA, L.; RUBENFIRE, M.; MANDEL, C.; TARSHIS, T.; TSAI, A.; PEARSON, T. Antioxidant nutrient supplementation reduces the susceptibility of low density lipoprotein to oxidation in patients with coronary artery disease. <b>J. American College of Cardiology</b> , v. 30, n. 2, p. 392-399, 1997.
MOSER, U.; BENDICH, A. Vitamin C. In: MACHLIN, L. J. <b>Handbook of vitamins</b> . 2. ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1991. p. 195-232.
NAKUMURA, J.; CSIKSZENTMIHALYI, M. Catalytic creativity, the case of Linus Pauling. <b>American Psychologist</b> , v. 56, n. 4, p. 337-341, 2001.
NORMAN, W. M. Vitamin C in the prevention of colds. <b>The Medical Journal of Australia</b> , v.2, n.26, p. 777-778, 1947.
NYE, M. J. Physical and biological modes of thought in the chemistry of Linus Pauling. <b>Stud. Hist. Phil. Mod. Phys.</b> , v. 31, n. 4, p. 475-491, 2000.
NYE, M. J. Science and political controversy. <b>Endeavour</b> , v. 23, n. 4, p. 148-154, 1999.
NYSSONEM, K.; PIKKARAINEN, S.; PARVIAINEN, M. T.; HEINONEN, K. Quantitative estimation of dehydroascorbic acid and ascorbic acid by high performance liquid chromatography – application to human milk, plasma and leukocytes. <b>J. of Liquid Chromatography</b> , v. 11, n. 8, p. 1717-1728, 1988.
PACHLA, L. A.; REYNOLDS, D. L. Review of ascorbic acid methodology. <b>J. AOAC</b> , v. 68, n. 1, p. 2-12, 1985.
PAPPA-LOUISI, A.; PASCALIDOU, S. Optimal conditions for the simultaneous ion paring HPLC determination of L-ascorbic, dehydroascorbic, D-ascorbic and uric acids with on-line ultraviolet absorbance and electrochemical detection. <b>Analytical Biochemistry</b> , v. 263, p. 176-182, 1998.
PAULING, L. Speech at natural foods exposition. <b>Natural Food Merchandiser</b> , June, p. 65, 1982.
PENTEADO, M. D. V. C. <b>Vitaminas – Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos</b> . São Paulo: Ed. Metha, 2003. 611p.
PÉREZ, A. G.; OLIÁS, R.; ESPRADA, J.; OLIÁS, J. M.; SANZ, C. Rapid determination of sugar, nonvolatile acids and ascorbic acid in strawberry and other fruits. <b>J. Agric. Food Chem.</b> , v. 45, p. 3545-3549, 1997.
PIGA, A.; DEL CARO, A.; PINNA, I.; AGABBIO, M. Changes in ascorbic acid,

polyphenol content and antioxidant activity in minimally processed cactus pear fruits. <b>Lebensm.-Wiss. u.- Technol</b> , v. 36, p. 257-262, 2003.
PISCHETSRIEDER, M. Reaction of L-ascorbic acid with L-arginine derivatives. <b>J. Agric. Food. Chem.</b> , v. 44, p. 2081-2085, 1996.
RAPISARDA, P.; INTELISANO, S. Sample preparation for vitamin C analysis of pigmented orange juices. Italian J. of <b>Food Science</b> , v. 8, n.3, p. 251-256, 1996.
RATH, M.; PAULING, L. Immunological evidence for the accumulation of lipoprotein in arterioesclerotic lesion of the hypoascorbemic guinea pig. <b>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</b> , v. 87, n. 16, p. 6204-6207, 1990.
REIF, W. Linus Pauling: an inspirational and humane genius. <b>The Lancet</b> , v. 355, p. 415-416, 2000.
RIZZOLO, A.; POLESELLO, A. HPLC assay of ascorbic acid in fresh and processed fruit and vegetables. <b>Food Chemistry</b> , v. 14, p. 189-199, 1984.
RIZZOLO, A.; BRAMBILLA, A.; VALSECCHI, S.; ECCHER-ZERBINI, P. Evaluation of sampling and extraction procedures for the analysis of ascorbic acid from pear tissue. <b>Food Chemistry</b> , v. 77, p. 257-262, 2002.
ROIG, M. G.; RIVERA, Z. S.; KENNEDY, J. G. L. Ascorbic acid: an overview, <b>Int. J. Food Sci. Nutr.</b> v. 44, p. 59-72, 1993.
ROPKE, C.D.; MEIRELLES, R.R.; SILVA, V.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S. B.M. Pothomorphe umbellata Extract Prevents [alpha]-Tocopherol Depletion After UV-irradiation <b>Photochemistry and Photobiology</b> , v.031, p. 8655-8658, 2003.
SHARPLESS, K. E.; MARGOLIS, S.; THOMAS J. B. Determination of vitamins in food-matrix standard reference materials. <b>Journal of Chromatography A</b> , v. 881, p. 171-181, 2000.
SILVA, F. O. Total ascorbic acid determination in fresh squeezed orange juice by gas chromatography. <b>Food Control</b> , v. 16, p. 55-58, 2005.
SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. <b>Principles of instrumental analysis</b> . 5. ed. Fort Worth: Saunders College Publishing, 1997. 849p.
SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. <b>Introduction to modern liquid chromatography</b> . 2. ed. New York: Wiley-Interscience Publication, 1979. 896 p.
SOARES, B. G.; SOUZA, N. A.; PIRES, D. X. <b>Química orgânica: teoria e técnicas de preparação, purificação e identificação de compostos orgânicos</b> . Editora Guanabara, 1988. 322p.
SOLOMONS, T. W. G. <b>Organic chemistry</b> . 6. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996. 1218p.

SPEEK, A. J.; SCHRIJVER, J.; SCHREURS, W. H. P. Fluorometric determination of total vitamin C and total isovitamin C in foodstuffs and beverages by high- performance liquid chromatography with precolumn derivatization. <b>J. Agric. Food Chem.</b> , v. 32, p. 352-355, 1984.
STONE, I. Fifty years of research on ascorbate and the genetics of scurvy <b>Orthomolecular Psychiatry</b> , v. 13, n. 4, p. 280, 1984.
STONE, I. Fifty years of research on ascorbate and the genetics of scurvy. <b>Orthomolecular Psychiatry</b> , v. 13, n. 4, p. 280-286, 1984.
STURM, K.; KORON, D.; STAMPAR, F. The composition of fruit of different strawberry varieties depending on maturity stage. <b>Food Chemistry</b> , v. 83, p. 417-422, 2003.
TERABE, S.; MARKUSZEWSKI, M. J.; INOUE, N.; OTSUDA, K.; NISHIOKA, T. <b>Pure and Applied Chemistry</b> , v. 73, n. 10. p. 1563-1572, 2001.
THOMPSON, C. O.; TRENERRY, V. C. A rapid method for determination of total L-ascorbic acid in fruits and vegetables by micellar electrokinetic capillary chromatography. <b>Food Chemistry</b> , v. 53, p. 43-50, 1995.
TRAN, M. T. T.; FARID, M. Ultraviolet treatment of orange juices. <b>Innovative Food Science &amp; Emerging Technologies</b> , v. 5, p. 495-502, 2004.
VECCHI, M.; KAISER, K. The gas chromatographic determination of ascorbic acid in the form of its trimethyl ether derivative. <b>J. of Chromatography A</b> , v. 26, p. 22-29, 1967.
VENDRAMINI, A. N.; TRUGO, L. C. Chemical composition of acerola fruit ( <i>Malpighia punicifolia</i> L.) at three stages of maturity. <b>Food Chemistry</b> , v. 71, p. 195-198, 2000.
VERDINI, R. A.; LAGIER, C. M. Voltametric iodometric titration of ascorbic acid with dead-stop end-point detection in fresh vegetables and fruit samples. <b>J. Agric. Food Chem.</b> , v. 48, p. 2812-2817, 2000.
VINCI, G.; BOTRÈ, F.; MELE, G. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. <b>Food Chemistry</b> , v. 53, p. 211-214, 1995.
WEISS, S. M. The emerging acceptance and importance of alternative medical therapies. <b>Cancer Control Journal</b> , v. 5, n. 3, p. 50-52, 1998.
WILLS, R. B. H.; PUSHPARANY, W.; GREENFIELD, H. Liquid chromatography, microfluorometry and dye-titration determination of vitamin C in fresh fruit and vegetables. <b>J. AOAC</b> , v. 66, n. 6, p. 1377-1379, 1983.
WIMALASIRI, P.; WILLS, R. B. H. Simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fruit and vegetables by high performance liquid chromatography. <b>Journal of Chromatography</b> , v. 256, p. 368-371, 1983.

<p>YAHIA, E. M.; CONTRERAS-PADILHA, M.; GONZALEZ-AGUILAR, G. Ascorbic acid content in relation to ascorbic acid oxidase activity and polyamine content in tomato and Bell Pepper fruits during development, maturation and senescence. <b>Lebensm.-Wiss. u.- Technol</b>, v. 34, p. 452-457, 2001.</p>
<p>YARDIM-AKAYDIN, S.; ÖZKAN, Y.; ÖZKAN, E; TORUN, M.; SIMSEK, B. The role of plasma thiol compounds and antioxidant vitamins in patients with cardiovascular diseases. <b>Clinica Chimica</b>, v. 338, p. 99-105, 2003.</p>
<p>JUPILLE, T.; GRAY, M.; BLACK, B.; GOULD, M. Ion moderated partition HPLC. <b>International laboratory</b>, september, p. 84-89, 1981.</p>
<p>SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. <b>Quim. Nova</b>, v. 27, n. 2, p. 270-276, 2004.</p>

## APENDICE I

Cromatogramas de diversas matrices