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 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA UTILIZANDO COLUNA DE TROCA IÔNICA

JEANE SANTOS DA ROSA

2005

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

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 CROMATOGRAFIA 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

Djalva da Nóbrega Santana
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Departamento de Tecnologia de Alimentos

Dedicatória

A Deus que me sustentou
A meus pais que me incentivaram
A Rodrigo que me ajudou

- Se te cansas correndo contra homens que vão a pé, o que farás quando tiveres que competir com cavalos?

Jeremias 5.12a

- Nenhum vento sopra a favor de quem não sabe para onde ir.

Sêneca

- Ora, se uma coisa é difícil...
  Isto não é motivo para não querê-la.
  Quão triste os caminhos,
  Não fora a presença distante das estrelas.

Utopias, Mario Quintana

- Esquecendo-me das coisas que para trás ficam e avançando para as que estão diante de mim, prossigo em direção ao alvo.

Filipenses 3.13

Agradecimentos

À Deus que me deu forças para enfrentar mais este desafio.
À Dona Antonia, minha mãe, pelo amor, encorajamento e orações constantes.
À meu Pai, seu Jayme, por sempre me apoiar nas minhas escolhas.
À Rodrigo Campos por estar sempre presente, mesmo estando tão distante.
À meu irmão por todas as vezes que pude contar com sua ajuda.
À Sandra pelo amor de irmã.
À Manuela e Henriqueta por todo o suporte e amizade.
Ao Dr. Amauri Rosenthal e a Dra Regina Isabel Nogueira pela compreensão.
Ao Dr Ronoel Luiz de O. Godoy pela orientação.
Ao Dr João Oiano por sempre tentar repartir comigo seu conhecimento.
À Dra Izabela Miranda de Castro pelo incentivo e ajuda, desde que cheguei à Embrapa.
À Dra Leila Martins Quinteiro pelo apoio.
À Dra Djalva da Nóbrega Santana pela participação na banca e
Às Dra Soraia Borges e Dra Arlene Gaspar de Sant´Anna pelos esforços a favor deste curso.
À Nicolli, André, Niliana, Patrícia, Karla e Francis por terem ajudado tanto.
À Ana Maria, diretora do colégio estadual Cora Coralina, pela compreensão e amizade.
Aos meus alunos por me darem ânimo para a terceira jornada mesmo após a primeira e segunda terem ocorrido em um mesmo dia.
Aos meus amigos de curso, todos maravilhosos companheiros de luta e churrascos.
À Flávia, Dra Sônia Cury e Dra Virgínia da Matta pelas análises titulométricas
À UFRRJ por proporcionar esta oportunidade de crescimento.
À UFRJ e os professores Radler e Luis Nelson pela disciplina de Métodos Cromatográficos.
À Embrapa Agroindústria de Alimentos por ter investido no laboratório de Cromatografia Líquida.
À Waters corporation pelos equipamentos maravilhosos.
Ao 2695-2 por ter sido um cromatógrafo bem comportado e não ter parado de trabalhar neste período todo.
À cafeína e à teobromina que mantiveram-me acordada.
E por fim, à vitamina C que não só inspirou este trabalho, mas também reduziu a maior parte das substâncias oxidantes que meu metabolismo gerou neste stress de ter dois empregos e ainda fazer mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 10
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 Vitamina C 3
2.1.1 Estrutura 3
2.1.2 Propriedades Físico-Químicas 4
2.1.3 Ácido deidroascórbico (DIA) 5
2.1.4 Ácido eritórbico 6
2.1.5 A vitamina C na história 6
2.1.6 Atividade vitamínica 8
2.1.7 A controvérsia Linus Pauling 9
2.1.8 Síntese do ácido ascórbico 11
2.1.9 Propriedades bioquímicas e fisiológicas da vitamina C 11
2.1.10 Propriedades anti-oxidantes 11
2.1.11 Vitamina C nos alimentos 12
2.2 Métodos analíticos mais comuns para a determinação de ácido ascórbico 13
2.3 Cromatografia 14
2.3.1 Cromatografia gasosa 15
2.3.2 Eletroforese capilar 16
2.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 18
2.4 Métodos de quantificação mais usados em cromatografia 30
2.4.1 Métodos cromatográficos para análise de vitamina C 30
2.5 Dosagem de vitamina C total 33
3. MATERIAL E MÉTODOS 35
3.1 Método e amostras 35
3.2 Relação de materiais 35
3.3 Preparo da amostra e da solução padrão 36
3.4 Testes iniciais 39
3.4.1 Linearidade 39
3.4.2 Teste de degradação 40
3.4.3 Teste de estabilização do ácido ascórbico em função da solução extratora utilizada 41
3.4.3.1 EDTA como agente estabilizante 41
3.4.3.2 Ácido oxálico como agente estabilizante 41
3.4.3.3 Ácido metafosfórico como agente estabilizante 41
3.4.3.5 Quantificação de amostra de suco de maracujá 42
3.4.4 Testes de recuperação 42
3.4.4.1 A partir de amostras de Cewin® (lote 060304) – Parte I 42

3.4.4.2 A partir de matriz de fruta – Parte II 42
3.4.5 Teste de comparação com método titulométrico 42
3.4.6 Ensaio de proficiência 42

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 44

4.1 Comparação com o método que utiliza coluna de troca iônica e o que utiliza coluna de fase reversa 44

4.2 Considerações relativas ao preparo da amostra e à análise de vitamina C por coluna troca iônica. 48
4.2.1 Efeito da homogeneização 48
4.2.2 Extração 49
4.2.3 Necessidade de água ultrapura 49
4.2.4 Fase móvel 51
4.2.5 Microfiltração da fase móvel 51
4.2.6 Microfiltração das amostras 52
4.2.7 Cuidados no preparo das amostras 52

4.3 Coluna Cromatográfica 54

4.4 Equipamento utilizado e condições de análise 56

4.5 Cálculo da concentração de vitamina C 57

4.6 Avaliação dos teores encontrados em algumas matrizes 58

4.7 Avaliação de cromatogramas e espectros 60

4.8 Teste iniciais 64
4.8.1 Curva de linearidade 64
4.8.2 Teste de degradação 65
4.8.3 Teste de estabilização do ácido ascórbico em função da solução extratora utilizada 67
4.8.4 Testes de recuperação 70
4.8.4.1 Verificação da recuperação a partir de suplemento vitamínico 70
4.8.4.2 Verificação de recuperação a partir de matriz de fruta (mamão – *Carica papaya* L. var. Sunrise solo) 70
4.8.5 Teste de comparação com método titulométrico 71
4.8.6 Ensaio de proficiência 72

5. CONCLUSÕES 75

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 76

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 à falta da enzima gulonolactona oxidase. Desta forma a fim de manter os níveis mínimos de ingestão diária recomendados para esta vitamina, deve-se consumir alimentos que contenham ácido ascórbico ou suplementos farmacêuticos. Apesar de estar presente abundantemente em frutas e vegetais, a vitamina C é sensível ao ar, luz e calor, sendo 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 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-diclorofenol-indofenol pela vitamina C, este método, porém, 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 à 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 0,05M como fase móvel. O preparo da amostra consistiu somente em homogeneização, pesagem, extração com fase móvel em ultrassom, diluição, filtração, microfiltração e injeção no sistema cromatográfico. A detecção foi feita por detetor de arranjo de diodos e o cromatograma extraído do espectro à 243nm. Os cromatogramas obtidos apresentaram um perfil sem interferentes com o pico da vitamina C, resolvido em nível de linha base. As matrizes vegetais mais estudadas até agora foram mamão e morango e os teores médios obtidos foram respectivamente 94,75 ± 1,92 e 40,53 ± 1,30mg de vitamina C/100g de amostra.

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

ABSTRACT

ROSA, Jeane Santos da. **Development of a rapid method for vitamin C analysis by high perfomance liquid chromatography using an 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 sinthesize vitamin C due the lack of the enzyme *L*-gulonolactona oxidase. In order to maintain minimal levels recommended of daily ingestion, food with ascorbic acid content or supplementation tabs must be consumed. Despite, it's 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 processing. Due this degradation process, measurement of vitamin C levels has become an analytical challenge. Stabilization of recently extracted ascorbic acid from food matrix to produce high recovery levels and reproductibility is very difficult. There are many analytical methods developed to quantify ascorbic acid content in food. The titrimetric method is based in 2,6 diclorofenol-indofenol reduction by vitamin C. This method, however, suffer interference by the presence of another reductor agent as ascorbic acid. Spectrophotometric methods are laborious because of the extraction process of substances that may provide absorvance at the used wavelength. Liquid chromatography methods are the most used nowadays due it's interfering separation ability and fast sample preparations. The main goal of this study was to develop a simple and rapid method for vitamin C analysis in vegetables, using an ion exchange column H^+ form and 0.2M sulfuric acid as mobile phase. Sample preparation consists basically by homogenization, weight, ultrasonic extraction, with mobile phase, dilution, filtration, microfiltration and injection into chromatographic system. Detection was done at 243nm in a photodiode array detetor. Chromatograms showed a clean profile for vitamin C with peak resolved at baseline level. The vegetable matrix more tested until now were papaya and strawberries and the levels obtained were, 94.75 ±1.92 and 40.53±1.30 mg of vitamin C per 100g of sample, respectively.

Keywords: Vitamin C; dehidroascorbic acid; high performance liquid choromatography.

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 amina, na verdade, são várias substâncias de diferentes funções químicas.

As vitaminas são grupos heterogêneos de substâncias constituintes 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 a 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 singleto e outros radicais livres, 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, as quais muitos cientistas afirmam ser somente suficiente para evitar que os sintomas do escorbuto apareçam. Estes cientistas sugerem então a ingestão 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 que 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 deidroascórbico e depois facilmente hidrolisado a ácido 2,3-dicetogulônico, o qual 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 (oriundas do rompimento das células), os tornam ainda mais susceptíveis 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 que 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, espectrofotometria, fluorimetria, voltâmetria e cromatografia, sendo os mais utilizados o método titulométrico e os cromatográficos. As técnicas de titulometria e espectrofotometria oferecem problemas com interferentes redutores ou coloridos e necessitam de laboriosos preparos para a retirada destes. Nos métodos fluorimétricos deve-se fazer uma reação de derivatização uma vez que o ácido ascórbico não fluoresce naturalmente. Nos métodos por voltametria 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 de absorção do ácido ascórbico dos demais componentes da amostra, que também produzem sinal no detetor 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 ótimo controle de pH obtido através do preparo de soluções 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, assim como para os filtros da coluna.

Nos métodos que utilizam colunas de troca iônica, a vitamina C é separada por mecanismo de fase reversa que ocorre na superfície da resina, sendo 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 e calor. Para tanto, o preparo da amostra consistiu somente de homogeneização, pesagem, extração rápida em ultrassom, diluição, filtração, microfiltração e injeção no sistema cromatográfico. A detecção foi feita por detetor de arranjo de fotodiodos 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 γ –lactona quase planar com dois centros quirais nas posições 4 e 5 (MOSER & BENDICH, 1991), determinando dois pares de estereoisomêros: os ácidos *L e D* ascórbico (Figura 1 A e B**,** respectivamente) e os ácidos *D* e *L isoascórbico*s (Figura 1 C e D**,** respectivamente). São epímeros (par de diasterômeros 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 esterioquímica *L* para a vitamina C foi confirmada pela síntese do ácido ascórbico a partir da *L*-Xilose. É importante notar que este tipo de designação (*L* ou *D*) para esterioisômeros praticamente só é adotado atualmente em bioquímica. Este sistema foi sugerido por M. A. Rosanoff, 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 esteroisômero *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, designa os centros quirais como *R* e *S* é norma da IUPAC para nomenclatura de esteroisômeros. A designação *D* (destrógero), *L* (levógero), tal como *R* (rectus), *S* (sinister), 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 e não absolutas.

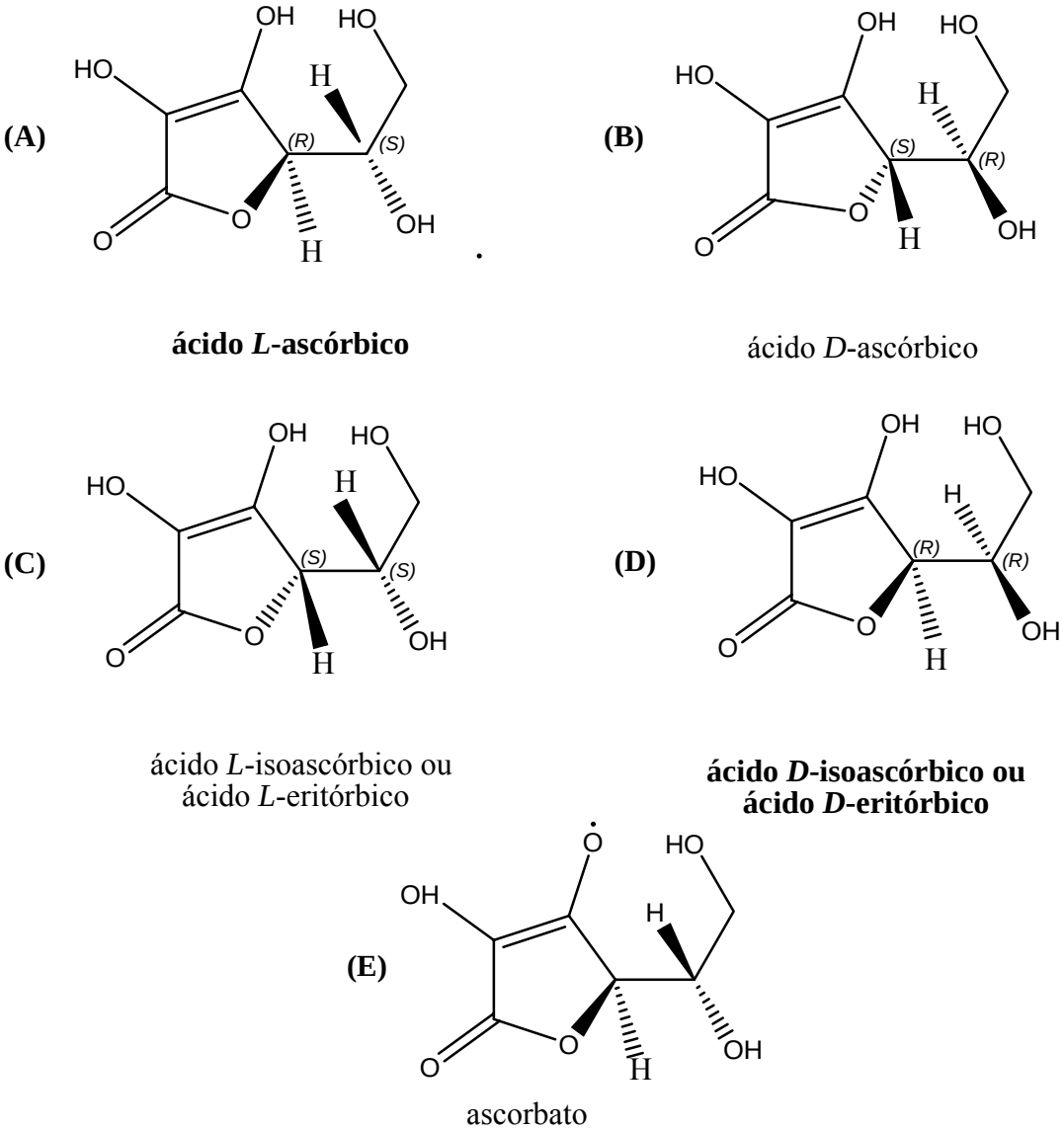


Figura 1: Isômeros do ácido ascórbico e radical livre ascorbato.

O radical livre ascorbil, também chamado de ácido monodeidroascórbico ou semideidroascórbico (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**$^{\cdot}$ dissocia-se, forma o radical (**A**$^{-\cdot}$) e com a perda de outro elétron ocorre a formação do ácido deidroascórbico (PENTEADO, 2003).

2.1.2 Propriedades Físico-Químicas

O ácido ascórbico possui massa molecular de 176 g/mol e puro apresenta-se sob em solução aquosa ou em produtos naturais, a vitamina C é facilmente oxidada em contato com o ar e luz. Sua solubilidade é de 1g em 3mL de água, em 30mL de álcool etílico 95%, em 50mL de álcool etílico absoluto, em 100mL de glicerina ou em 20mL

de propileno glicol. 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) que 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 à hidroxila no Carbono 3, por exemplo, é o mais ácido (pK_1=4,17).

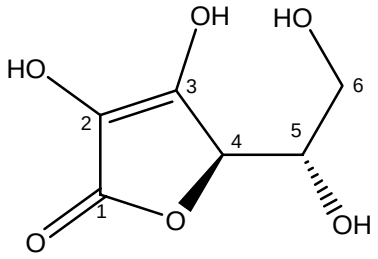


Figura 2: Ordem de numeração dos átomos de carbono no ácido ascórbico.

A oxidação reversível devido a perda de um átomo de hidrogênio (perda de 1 elétron) leva ao radical semideidroascórbico e depois para o ácido *L*-deidroascórbico é a propriedade química mais importante e a base da atividade fisiológica da vitamina C (MOSER & BENDICH, 1991).

2.1.3 Ácido deidroascórbico (DIA)

O ácido deidroascórbico é a forma oxidada do ácido ascórbico (Figura 3) e possui atividade vitamínica idêntica a este, pois no organismo é facilmente reduzido e novamente retido como ácido ascórbico nos tecidos intracelulares (NAIDU, 2003).

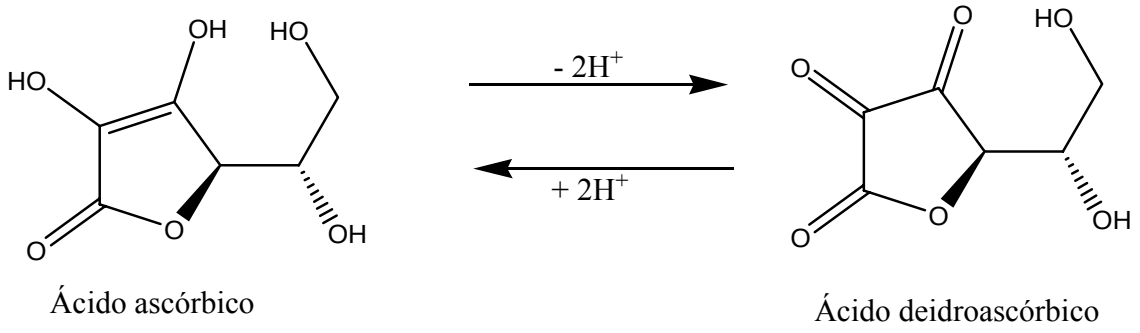


Figura 3: Reação de oxidação do ácido ascórbico a ácido deidroascórbico.

O ácido deidroascórbico pode ser reduzido a ácido ascórbico *in vivo* por enzimas ou glutationa, e *in vitro* por agentes redutores como a homocisteína, ditiotreitol (DTT) e bromina. 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 possui atividade antiescorbútica e a hidrólise é irreversível *in vivo*. Há também evidências da conversão espontânea *in vitro* do DIA ao 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 a 265nm (JUNG *et al.*, 1997).

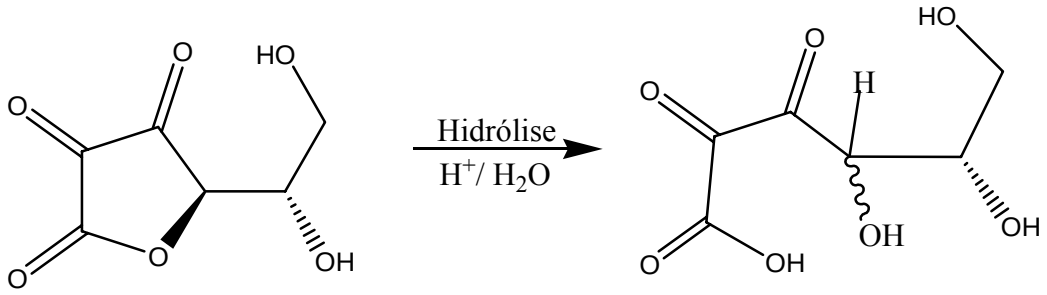


Figura 4: Degradação do ácido deidroascórbico.

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-a*scórbico 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 inversão da esterioquímica 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 redutor e um nutriente. Por razões econômicas, o ácido *D*-eritórbico era freqüentemente utilizado como antioxidante em alimentos (BEHRENS *et al.,* 1994), substituindo a vitamina C. Hoje, porém com o domínio do mercado pela China que detém a produção de 65% de ácido ascórbico mundial e oferece este produto a preços baixos, a tendência natural será a diminuição do uso do ácido eritórbico em função dos baixo custo do ácido ascórbico (BUSINES COMMUNICATION COMPANY, 2002).

2.1.5 A vitamina C na história

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

Tabela 1: A vitamina C na história

400 AC	• Os sintomas do escorbuto foram descritos por Hipócrates.
1747	• James Lind receita laranjas e limões como cura para o escorbuto em marinheiros.

1907	• Axel Holst e Teodor Frolich induziram escorbuto em porquinhos da índia.
1912	• Funk postulou o conceito de uma vitamina antiescorbútica.
1917	• Chick e Hume fizeram bioensaios para determinar as propriedades anti-escorbúticas de alimentos.
1921	• Zilva e colaboradores isolaram a atividade antiescorbútica em limões *in natura*. 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 antioxidantes e de extinção de oxigênio singleto 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 (NCI/EUA) reconheceu a relação inversa entre a ingestão de vitamina C e várias formas de câncer e emitir indicação para aumento desta vitamina na dieta.

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

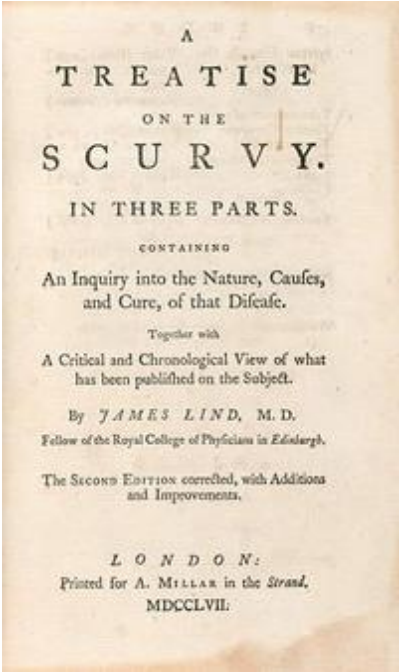
2.1.6 Atividade vitamínica

A atividade vitamínica do ácido ascórbico é medida em termos da 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 de 46 mg (ARONSON, 2001). No Brasil, a Ingestão Diária Recomendada (IDR) é de 60mg (ANVISA, 1998).

Figura 5: Sintoma do escorbuto: fragilidade capilar



A

TREATISE

ON THE

SCURVY.

IN THREE PARTS.

CONTAINING

An Inquiry into the Nature, Causes, and Cure, of that Disease.

Together with

A Critical and Chronological View of what has been published on the Subject.

By JAMES LIND, M. D.

Fellow of the Royal College of Physicians in Edinburgh.

The SECOND EDITION corrected, with Additions and Improvements.

LONDON:

Printed for A. MILLAR in the Strand.

MDCCLVII.

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). Também defendeu e, juntamente com seus colegas, estabeleceu a existência de estruturas helicoidais em proteínas (REIF, 2000), pois possuía habilidade intuitiva para entender a interpretar complexas estruturas moleculares. Recebeu 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 na era nuclear. Participou de muitos tribunais e debates públicos, e por isso foi premiado com o Nobel da paz em 1963 (NYE, 1999).

Em 1960, Linus Pauling usou pela primeira vez o termo ortomolecular, lançando as bases para este ramo da medicina. A medicina ortomolecular consiste no 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 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 ingerir 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, chegando 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 o episódio de um resfriado (HEMILÄ,1992). No que diz respeito à 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 sobrevida 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 está havendo 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 conseqüência 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 tetraidrofólico (PENTEADO, 2003).

Devido à sua grande atividade anti-oxidante é associado à profilaxia de doenças como arterioesclerose 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 deidroascórbico 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.,* 19998). Os maiores danos oxidativos causados pelos radicais livres passíveis de ocorrer *in vivo* são com lipídios, 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 singleto, radicais superóxido e hidroxi, 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 uma das mais importantes vitaminas 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 à presença de ar, luz e às 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 (NYYSSÖNEM *et al.,* 1988). Níveis de ácido ascórbico e concentração de leucócitos, respectivamente, abaixo de 0,05Mg/dL e 2mg/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 produzem alterações de cor em sucos de fruta e ressecamento de alimentos em geral (PISCHETSRIEDER, 1996).

Devido às suas propriedades redutoras, o ácido ascórbico 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 deidroascórbico existem como um par redox. Este equilíbrio AA $\rightleftharpoons$ 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 microrganismos, mas também destroem nutrientes importantes como as vitaminas. A destruição das vitaminas é uma reação de primeira ordem, similar à de destruição dos microrganismos (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, descascamento, 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, baixos níveis de concentração encontrados em matrizes não fortificadas, várias formas químicas e a sensibilidade da maioria destas ao aquecimento, luz, pH alcalino, 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, em 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 (inclusive 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 pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) e baseia-se na redução do corante 2,6-diclorofenol-indofenol pelo ácido ascórbico. Este método apresenta como uma das vantagens o baixo custo, mas é extremamente sujeito à presença de interferentes que são

também redutores como a cisteína, taninos, fenóis, tiossulfatos, dentre outros (PENTEADO, 2003). A análise de matrizes coloridas necessita de uma etapa de limpeza da amostra ("clean up") visando retirar corantes como antocianinas, que interferem na vizualização 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 deidroascórbico, 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 no comprimento de onda de leitura. Em geral, estes métodos 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-dinitrofenilidrazina (DNFH), diazotos e *o*-fenileno-diamina (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 deidroascórbico (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 do 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 compósito grafite-epóxi ou fibra de carbono (VERDINI & LAGIER, 2000). Estes métodos requerem poucos passos para o 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, além da vida útil destes últimos que é restrita.

2.3 Cromatografia

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 Tsweet, no entanto, é atribuída a honra de ter sido o primeiro a interpretar o processo cromatográfico como é aceito hoje (LANÇAS,1993).

Hoje em dia as técnicas cromatográficas mais utilizadas são a cromatografia gasosa, a eletroforese capilar e a cromatografia líquida de alta eficiência. Esta técnica pode ser definida, de forma geral, como um método físico de separação na qual os componentes de uma amostra 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 de dois ou mais componentes de uma amostra, resulta da diferença de suas constantes de equilíbrio de distribuição entre estas duas fases (AQUINO NETO & NUNES, 2003).

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 à 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 estacionaria pode ser um líquido ou um sólido. Esta técnica é um dos procedimentos mais utilizados nos laboratóros modernos, pois devido à sua excelente sensibilidade é capaz de separar e detectar centenas de compostos voláteis 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. A coluna localiza-se em um compartimento denominado forno cromatográfico, onde a temperatura de aquecimento é controlada por micro processadores. Após interagir diferencialmente com a fase estacionária da coluna, os componentes da amostra eluem desta e chegam até um detetor que reconhece a presença do componente e emite um sinal elétrico geralmente proporcional à concentração desta espécie química (Figura 7) (CECCHI, 2003).

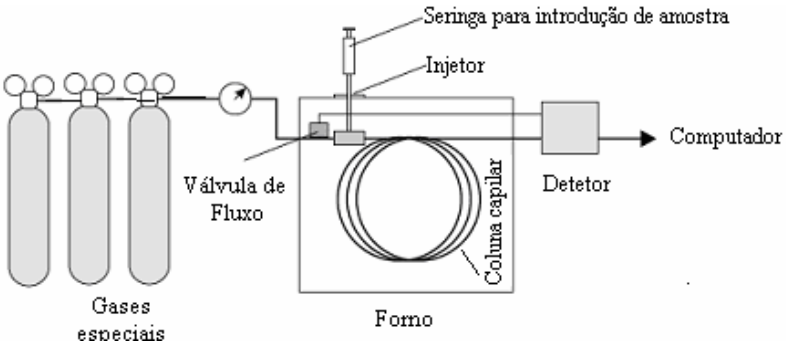


Figura 7: Esquema ilustrativo de um cromatógrafo à gás.

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 é 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 detetores 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 e precisas.

O grande desafio da CGAR atualmente é o aperfeiçoamento das técnicas de injeção de forma que o espalhamento da banda cromatográfica após este processo 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 massa 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).

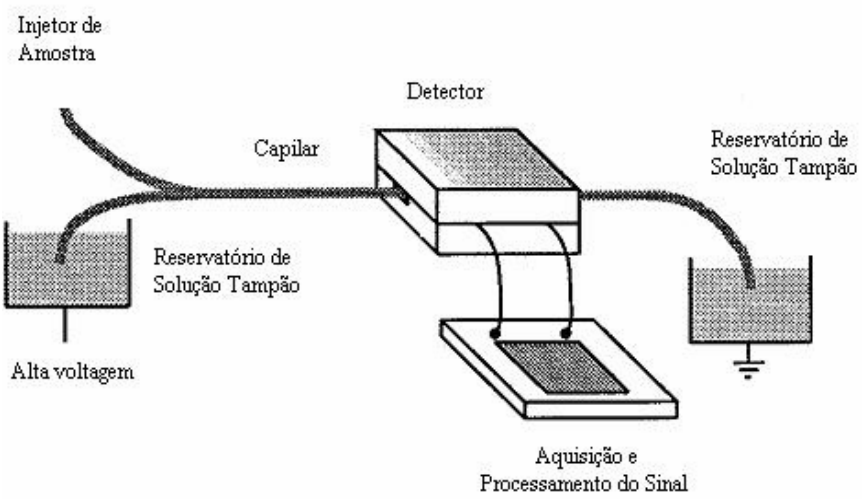


Figura 8: Esquema ilustrativo da instrumentação requerida na técnica de eletroforese capilar (EC).

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 (µL) requeridos para a amostra em gel (SOGA & HEIGER, 2000). A eletroforese capilar utiliza tubos capilares de sílica fundida onde as espécies separadas são eluídas no fim do capilar e detetores 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 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 da cromatografia líquida de alta eficiência (SKOOG *et al.*, 1998).

Apesar das suas vantagens apresentadas, aspectos relativos à instrumentação, como dificuldade na introdução da amostra e na detecção, devido aos pequenos volumes envolvidos; bem como a falta de reprodutibilidade em tempo de migração e na quantificação, devido à 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 resolvidas completamente ou parcialmente sobrepostas (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 ambas (OGURI, 2000).

A técnica de cromatografia capilar eletrocinética micelar (CCEM) envolve a introdução de um sulfactante, como dodecilsulfato de sódio, ao um sistema de

eletroforese capilar de zona (EC). As micelas formam-se em soluções aquosas quando a concentração de uma espécie iônica que possui uma longa cadeia hidrocarbônica é aumentada em um nível chamado "concentração crítica de micela". Neste ponto os íons começam a forma agregados esféricos. Essas micelas constituem uma segunda fase estável capaz de absorver compostos não polares no interior da cadeia hidrocarbônica, permitindo dessa forma a separação de solutos não carregados (TERABE *et al.*, 2001).

A sensibilidade das técnicas por eletroforese capilar é altíssima e capaz 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 que possuem grande acurácia e precisão(figura 9). A figura 10 descreve a composição de um sistema básico de CLAE.

Figura 9: Modelo comercial de um cromatógrafo líquido.

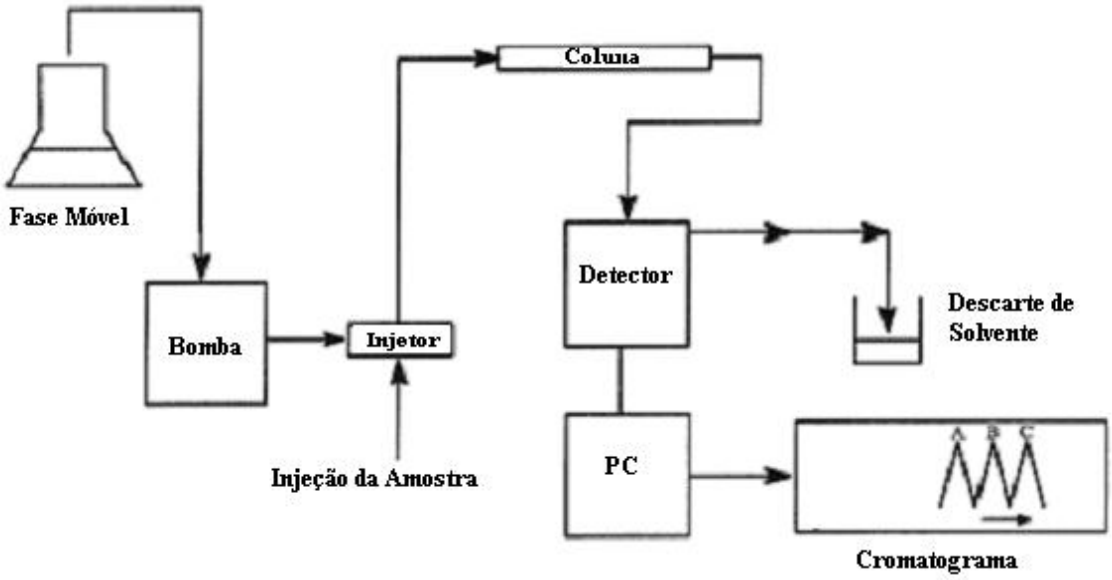


Figura 10: Esquema básico de um equipamento de CLAE.

Reservatório de solvente

Um sistema moderno de CLAE utiliza um ou mais reservatórios de solvente. Esses reservatórios são freqüentemente 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 (aproximadamente 3 μm), 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 com composição constante é denominada eluição isocrática, mas freqüentemente a eficiência de uma separação é muito melhorada ou até resolvida por eluição com gradiente de composição da fase móvel. Neste caso, dois ou três sistemas de solvente que diferem em polaridade são empregados. Depois que inicia-se a eluição, a taxa de composição da mistura de solventes varia de 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 solvente, incluem a capacidade de suportar pressões de até 5.000psi (libra por polegada quadrada), fluxos de 0,1 a 10mL/min, taxas de fluxo livres de pulsação e reprodutiva, resistência à corrosão e ao 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 altas pressões com grande precisão e os volumes podem variar de 0,5 a 100µL (em um 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 10µm (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 3-5µm. 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 foram 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, pois nas colunas convencionais, o material particulado apresenta poros com 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 2µm 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_8 ou C_{18} e estão disponíveis comercialmente desde 2000, com o nome de Chromolith Columns®.

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, com os dois organossilanos, está representada na Figura 11.

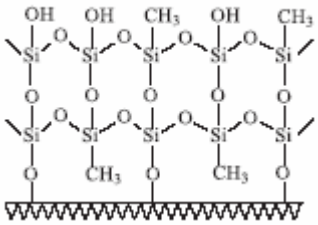


Figura 11: Estrutura da partícula de sílica híbrida de acordo com o processo sol-gel desenvolvido pela Waters Corporation.

São consideradas como normal (Figura 12) as fases estacionárias que possuem grupos funcionais ligados à sílica que apresentam polaridade. Dentre estas, pode-se citar a própria sílica, Diol (2 OH), amino (NH_2), Ciano (CN) e Fenil (∅).

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

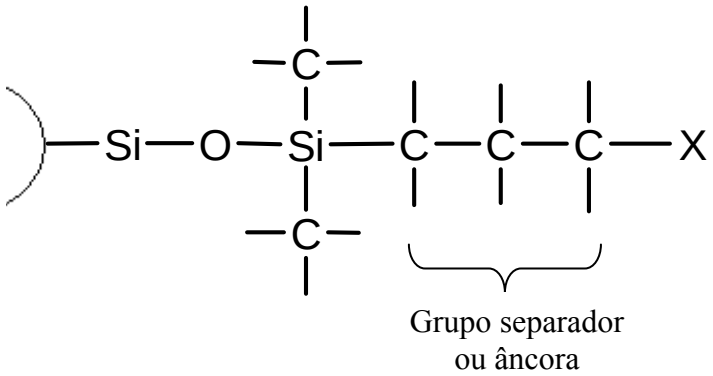


Figura 12: Estrutura básica de uma fase ligada à sílica. X = ∅, OH, CN e NH_2,

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 alta massa 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 massa 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 baixa massa 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 a um hidrocarboneto (C_{30}, C_{18}, C_8). 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 ¾ de todas as aplicações em CLAE é realizada em colunas de fase reversa (LINDSAY, 1992).

A 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 basicamente 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. Normalmente a cromatografia de adsorção não admite solventes aquosos (COLLINS & BRAGA. 1990).

Os analítos podem se distribuir entre as fases móvel e estacionária segundo combinações de polaridade pré-estabelecidas. Na fase normal, a fase estacionária é polar e a fase líquida é menos polar. Na fase reversa, a fase estacionária é apolar e a líquida é mais polar. No mecanismo de troca iônica, a fase estacionária 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, sendo que neste último, há grande afinidade entre o anticorpo da fase estacionária e um analíto 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:

$$k' = \frac{tr - to}{to}$$

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.

$$K = \frac{C1e}{C1m}$$

Onde : C1e = concentração do componente 1 na fase estacionária
C1m = 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 estacionária. 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 4σ 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.

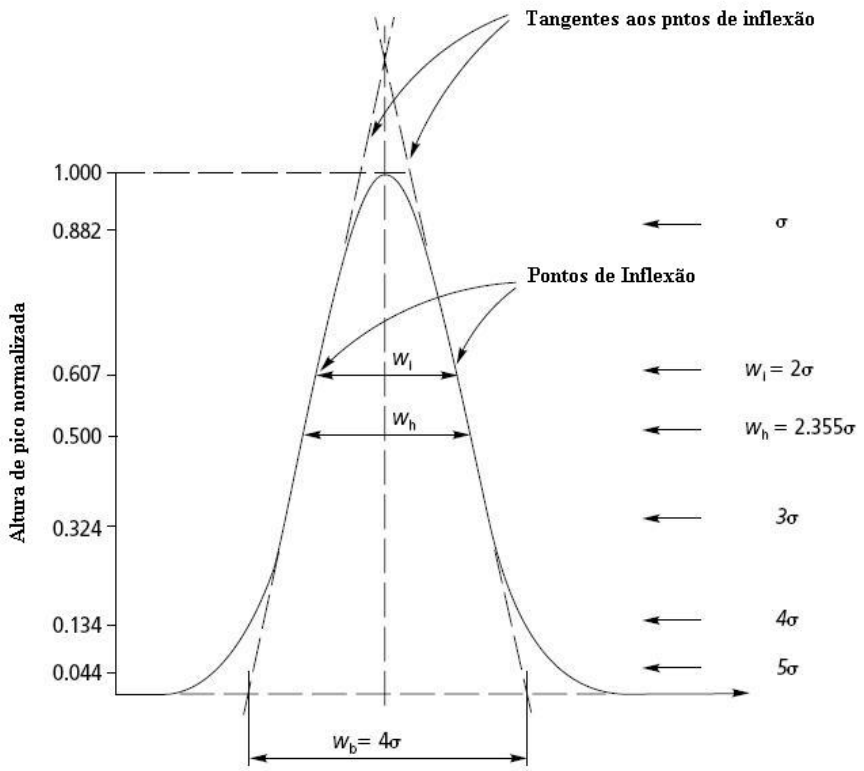


Figura 13: Exemplos de larguras de um pico Gaussiano à diversas alturas.

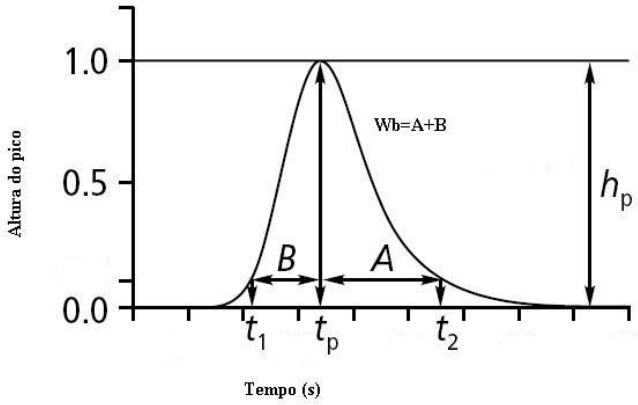


Figura 14: Exemplos da medida de largura da base em um pico com cauda.

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.

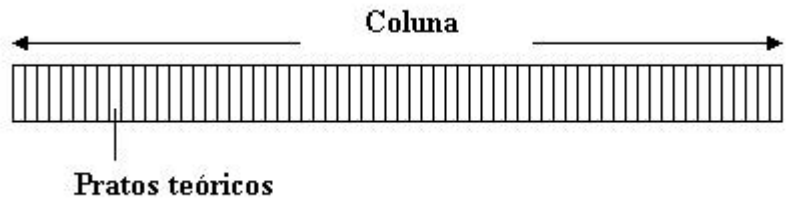


Figura 15: Representação esquemática de pratos teóricos numa coluna

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

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

O desvio padrão (σ) de um pico gaussiano pode ser estimado pela sua largura através 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 acenafteno. 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 tempo que passaria na fase móvel (to) não é levado em consideração.

$$t'r = tr - to$$

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

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 detetor 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 (μ). A curva de van Deemter descreve a relação HEPT x μ para uma coluna cromatográfica. O ponto de inflexão da curva corresponde ao menor valor de HEPT e conseqüentemente ao maior valor de eficiência. Os termos da equação têm sua influência nas regiões demarcadas na curva (Figura 16).

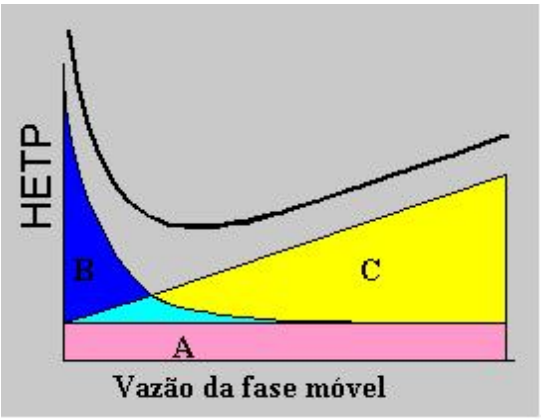


Figura 16: Curva de velocidade linear x HEPT (Van Deemter)

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

Onde: A = difusão por turbilhonamento
B = difusão longitudinal
C = resistência à transferência de massa
μ = 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.

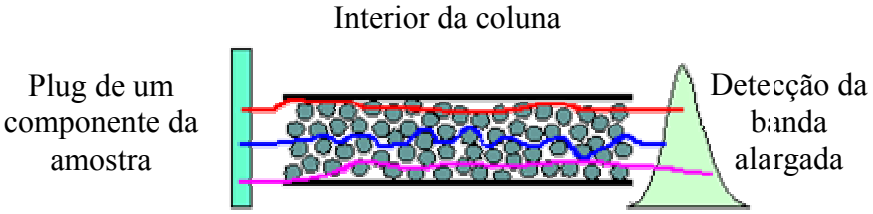


Figura 17: Migração diferencial das moléculas de um soluto ao longo da coluna cromatográfica.

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 estes dois compostos

$$\alpha = \frac{t'r2}{t'r1}$$

Onde: t′r 2 > t'r 1

α = seletividade

Um valor de seletividade (α) maior que 1, 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).

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

Rs = 1,0 separação de 98% ou sobreposição de 2%

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

Rs > 1,0 é suficiente para quantificar as bandas

Rs ≤ 0,7 não apresenta separação suficiente para dois picos serem quantificados (interpenetração muito grande das bases).

A habilidade do sistema cromatográfico em separar um par de substâncias que possuem interações semelhantes não depende somente de tempos de retenção absolutos, 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 (α) e retenção (k):

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

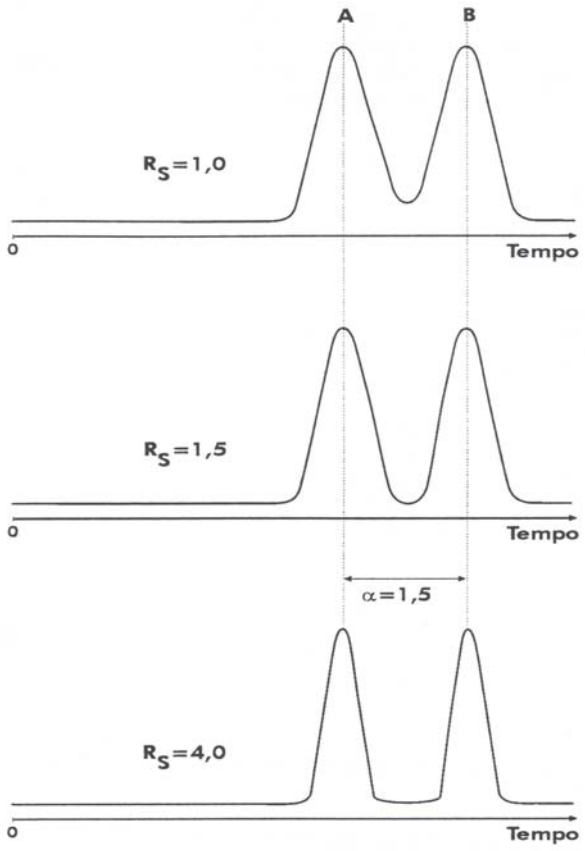


Figura 18: Graus de resolução entre dois picos adjacentes.

Detetores

Um detetor 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 de forma contínua e reversiva. (SKOOG et al., 1997).

A função do detetor 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 detetores podem ser classificados em integrais e diferenciais. Os detetores diferenciais medem a diferença instantânea na composição efluente da coluna, enquanto que os integrais medem a quantidade acumulada do componente da amostra que chega ao detetor.

Os detetores podem ser sensíveis à concentração ou à massa de um dado analíto. Os detetores sensíveis à massa apresentam resposta proporcional à quantidade do componente que chega ao detetor 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 detetores podem ser universais, seletivos ou específicos. Os detetores 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 detetor, as principais são:

- Sensibilidade Elevada - A sensibilidade de um detetor (S) é igual a saída de sinal por unidade de concentração ou unidade de massa de uma substância, na fase móvel que entra no detetor.
- Baixo Nível de Ruído - O ruído de um detetor (N) é medido pela amplitude, geralmente expressa em milivolts ou âmperes, do ruído da linha de base o qual inclui todas as variações aleatórias do sinal do detetor. O detetor 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 detetor é o valor do sinal elétrico gerado a partir de uma certa quantidade de amostra que chega até ele.
- Ampla Faixa de Linearidade - Lançando-se em gráfico o logaritmo de concentrações conhecidas de uma amostra contra o logaritmo da resposta que o detetor gera para aquelas concentrações, obtém-se uma curva de calibração para o referido detetor, nas condições de trabalho.
- 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 detetor igual a duas vezes o nível do ruído.

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

A função de um detetor em CLAE é monitorar a fase móvel que emerge da coluna. O detetor 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 detetor capaz de medir esse tipo de propriedade é chamado de detetor 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 detetor é chamado de detetor por propriedade de soluto (CIOLA, 1998).

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

Os detetores de absorvância de radiação ultra-violeta são os detetores 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-Visivel, provinda de uma lâmpada de deutério (UV), ou tungstênio (Visível). A radiação não absorvida é medida em um dispositivo denominado fotodiodo. Diodos são dispositivos capazes de transformar informação de domínio não elétrico em domínio elétrico, um diodo de silicone 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 detetor 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 praticamente simultaneamente. Devido à essa aquisição paralela, processar e estocar um espectro pode ser feito em

aproximadamente 0,5 segundos, 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 hidrocarbonetos polinucleares. Muitos compostos não fluorescentes podem ser convertidos para derivados fluorescentes por tratamento com reagentes apropriados (derivatização) (SKOOG *et al.*, 1998).

Os detetores de fluorescência para CLAE são similares em desenho aos fluorímetros. A fluorescência é observada por um detetor fotoelétrico localizado a 90° do feixe de excitação. Os detetores 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 detetores de fluorescência é a sua alta sensibilidade, que é tipicamente maior do que uma ordem de magnitude na maioria dos procedimentos por absorvância. Outros detetores utilizados em CLAE são índice de refração (universal), eletroquímico, amperométrico, evaporativo por 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 um substância padrão que possua estruturas semelhante ao composto de interesse e que não esteja presente na amostra. Este padrão é chamado de padrão interno por que é adicionado à amostra desde o início do procedimento analítico e desta forma erros de preparo podem ser minimizados.

O método de padronização externa ainda é o mais utilizado em CLAE, provavelmente devido à 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 a 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 sililação como um éter de trimetilsilano (SILVA, 2005) (Figura 19). Agentes sililantes 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).

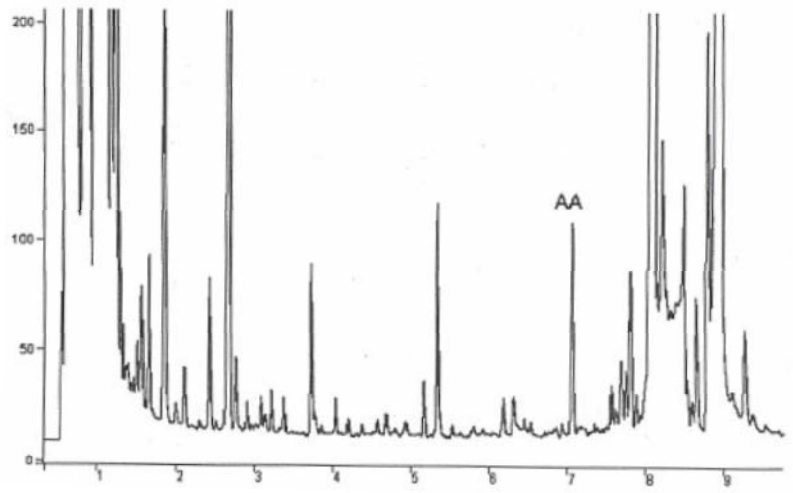


Figura 19: Cromatograma de uma determinação de ácido ascórbico (AA) em suco de laranja, através de cromatografia gasosa de alta resolução (SILVA, 2005).

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 possuirem menor robustez que os métodos por CLAE (DAVEY *et al.,* 2003).

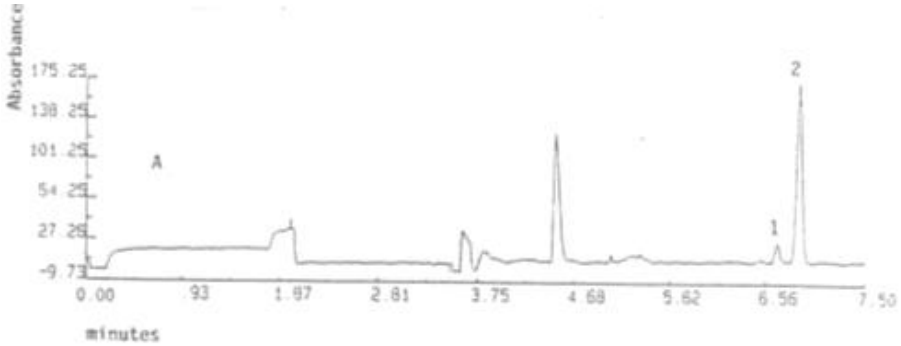


Figura 20: Eletroferograma da separação de um extrato de uva por cromatografia eletrocinética capilar micelar (THOMPSON & TRENERRY, 1994). Pico 1 é refente ao ácido ascórbico e pico 2 referente ao ácido *D*-isoascórbico.

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).

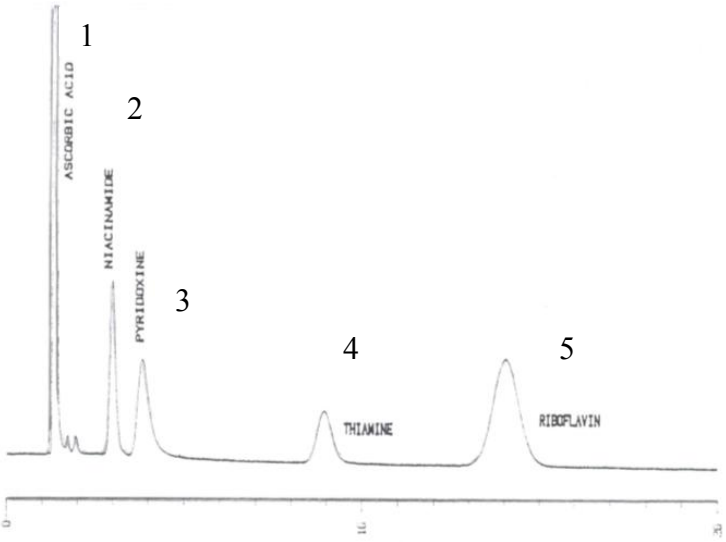


Figura 21: Cromatograma de uma determinação de vitamina C e outras vitaminas hidrossolúveis em uma mistura multivitamínica (IVANOVIC *et al.,* 1999). 1-ácido ascórbico, 2-niancina, 3-piridoxina, 4-tiamina e 5-riboflavina.

A cromatografia Líquida de Alta Eficiência é a técnica cromatográfica mais utilizada na determinação de vitamina C devido à 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*;* PAPPA-LOUISI & PASCALIDOU, 1998 e CHANG & CHANG, 2003), visando inibir a ionização do ácido ascórbico e também proporciona a sua estabilização durante o processo cromatográfico.

Há também métodos que utilizam fase amino (NH_2) que consiste em um processo de troca iônica fraca (RIZZOLO & POLESELLO, 1984 e WIMALASIRI & WILLS, 1983). A utilização destas colunas tem sido menor 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%(v/v) 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 da fase móvel na 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 utilizadas 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 não ionizada. Ocorre também mecanismo de exclusão iônica, onde substâncias ionizadas no pH da fase móvel sofrem repulsão devido à carga fixa da resina. Desta forma, partículas com maior carga eluirão primeiro (JUPILLE *et al.,* 1981). Estas colunas, em geral, oferecem boa resolução cromatográfica porém vida útil menor.

2.5 Dosagem de vitamina C total

O ácido deidroascórbico representa menos de 10% da vitamina C total dos vegetais, tendendo a aumentar com o período de estocagem, por isso existem muitos trabalhos cujo escopo é dosar os teores de ácido ascórbico e também deidroascórbico (WILLS *et al.,* 1984). A separação conjunta de ambas as formas é complicada pela sensibilidade de detecção para o ácido deidroascórbico 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 deidroascórbico em solução também requer ótimo controle de pH, pois a hidrólise deste em ácido 2,3 dicetogulônico é muito dependente do pH (WOLUCKA *et al.,* 2001).

Uma alternativa bastante empregada é a redução do DIA a ácido ascórbico mediante reação com substâncias como ditiotreitol (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 análises 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 deidroascórbico é fornecido por diferença entre estes dois teores.

Como em alimentos naturais o ácido deidroascórbico está presente em níveis baixos, a escolha de um método de dosagem de vitamina C total deve considerar o custo/benefício dos resultados obtidos. 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.

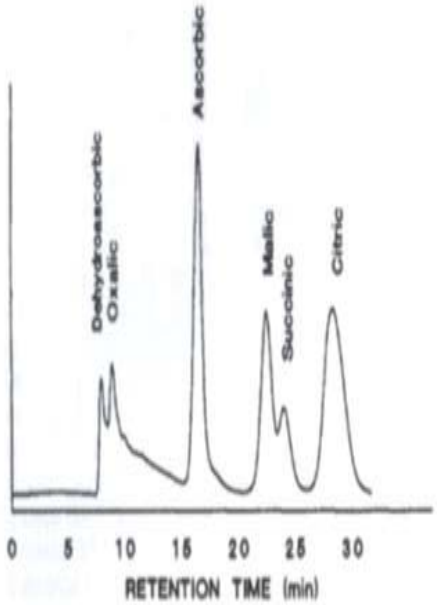


Figure 1. Retention times of standard acid solutions as detected by coupling Spheri-5 RP-18 and Polypore H columns with 2% KH_2PO_4 (pH 2.3) as mobile phase at a flow rate of 0.4 mL/min.

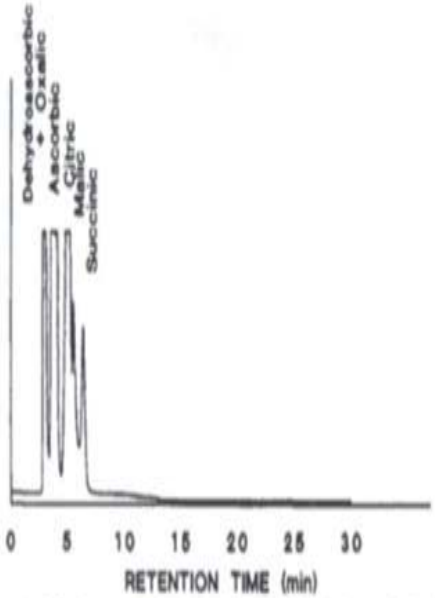


Figure 2. Elution profile of standard acid solutions by Spheri-5 RP-18 with 2% KH_2PO_4 (pH 2.3) as mobile phase at a flow rate of 0.4 mL/min.

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 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 partição em fase reversa. As principais matrizes para as quais o método foi testado foram morango, mamão, manga, mandioca, batata, tomate, água de coco e sucos de goiaba, maçã, caju, abacaxi, maracujá, laranja e manga em embalagem tipo tetrapack®

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) – OE67 Schleicher & Scchuell®;
- Unidades filtrantes descartáveis tipo Teflon hidrofílico 0,22µm - Millex® GV
- Seringa de vidro capacidade 10 ou 5mL
- Frascos de vidro para injetor automático com capacidade de aproximadamente 1,5mL e tampa de rosca - Waters® 186001131c.
- Ácido Sulfúrico concentrado suprapuro – 1.00714.0250 Merck®
- Padrão de ácido *L*–ascórbico (99% pureza) - A1370 Spectrum Chemical Mfg. Corp®
- Coluna de troca iônica forma ácida - AMINEX HPX 87H (300 x 7,8mm) 125.0140. BIO RAD ®
- Água Ultrapura (Milli-Q)

Equipamentos

- Balança Analítica (0,1mg) – 2104 Bel Engineering®
- Politron - Omni® Homogenizer 17105
- Blender - Waring® commercial
- Ultrassom - Branson® 2210
- pHmetro – Tecnopon mPA 210
- 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® Ellix- 5
- Sistema de Ultrapurificação de água (tipo I) - Millipore® Milli-Q Gradiente – A10

3.3 Preparo da amostra e da solução padrão

A água ultrapura utilizada em todo o procedimento foi obtida a partir de um sistema de purificação de água (Figura 23) constituído por um equipamento Elix®, um reservatório de 60 L e um equipamento para utrapurificação de água, Milli-Q® 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.

Todo o processo de extração da vitamina C das amostras, e preparo das soluções contendo as 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 durante o preparo das amostras.

O cromatógrafo líquido utilizado foi um Waters Alliance 2695 com detetor de arranjo de fotodiodos (PDA) Waters 2996 (Figura 25) e coluna Aminex HPX 87H 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 0,05M (pH 1,3) sob vazão de 0,7mL/min e 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 ceterminação do teor de vitamina C.

Figura 26: Coluna analítica BioRad Aminex HPX-87H.

A fase móvel (ácido sulfúrico 0,05M), também utilizada para extrair a vitamina C da matriz do alimento, foi preparada transferindo-se 5,6mL de ácido sulfúrico suprapuro Merck para um balão volumétrico de 2L , avolumando-se com água ultrapura (Milli-Q). Após o preparo, a fase móvel foi filtrada em membrana de acetato de celulose (tipo HA) de 0,22µm. A estocagem da fase móvel foi feita em geladeira e microfiltrada novamente a cada dois dias de uso.

O preparo das soluções das amostras consistiu da sua homogeneização em blender ou Politron, seguida de 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 diluições foram expressas em 25mL por esta corresponder à vidraria volumétrica em maior disponibilidade no laboratório.

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

Volume total* (mL)	Massa do padrão (mg)	Volume de alíquota do padrão (mL)	Massa da amostra sólida (g)	Volume da amostra líquida (mL)
25	25	0,5	2,5	2,5
10	10	0,2	1,0	1,0
5	5	0,1	0,5	0,5

* Volume total das soluções preparadas em balão volumétrico

As soluções das amostras foram filtradas em papel de filtro e micro filtradas em unidade descartável de Teflon® hidrofílico para frascos de vidro âmbar com tampa de rosca e septo de teflon.

O sistema cromatográfico, equipado com injetor automático, teve sua câmara de injeção resfriada à 5°C.

Para calibração do cromatógrafo, foi feita uma solução padrão de ácido ascórbico na concentração de 1mg/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 armazenamento dos dados cromatográficos foram feitos através do software Empower® (Waters Corp.).

A descrição do procedimento de preparo das amostras encontra-se resumida na figura 27.

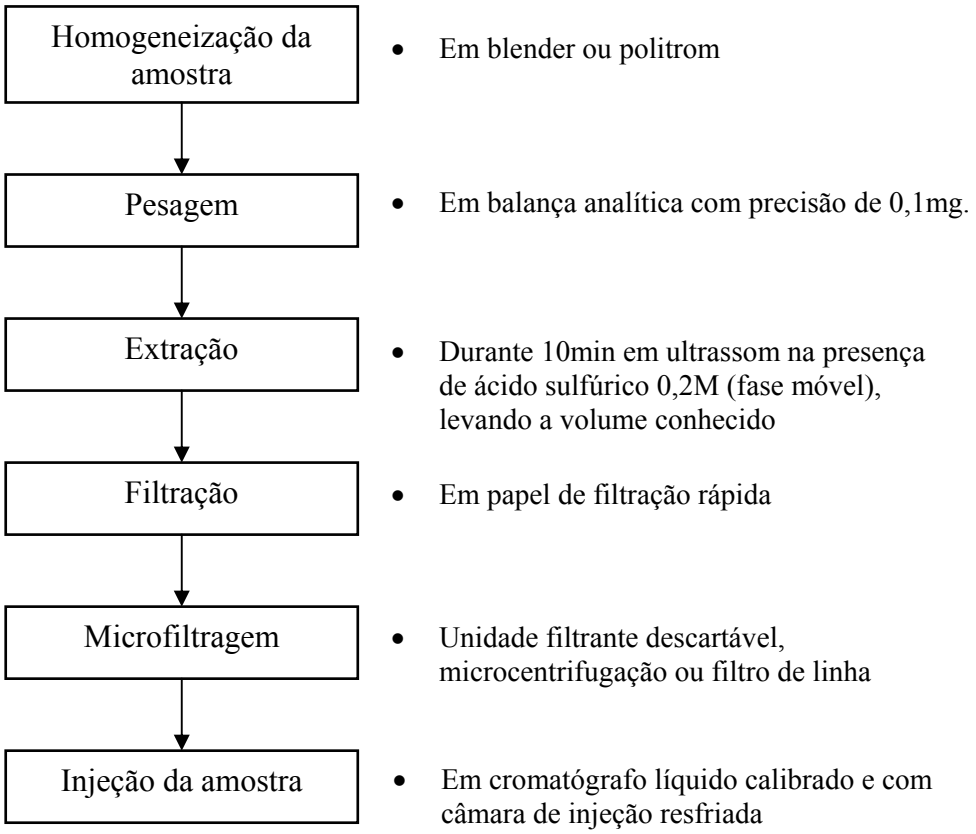


Figura 27: Fluxograma do método analítico.

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 de calibração 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 Tabela 3.

Tabela 3: Construção dos pontos da curva de calibração.

Solução	Concentração da solução (mg/mL)	Alíquotas	Concentração do ponto (mg/25mL)	Concentração do ponto (mg/100g)	Ponto da Curva
1	0,274	10 mL para bv de 25 mL	2,740	104,01	7
2	0,264	7 mL para bv de 25mL	1,850	70,25	6
3	0,254	5 mL para bv de 25mL	1,270	48,22	5
4	0,264	3 mL para bv de 25mL	0,792	30,07	4
5	0,248	1 mL para bv de 25 mL	0,248	9,42	3
6	0,262	0,1 mL para bv de 25 mL	0,026	0,99	2
7	0,267	0,05 mL para bv de 25 mL	0,013	0,49	1

*bv – Balão volumétrico

A concentração dos pontos em mg/100g foram obtidas de acordo com a faixa de concentração das amostras estudadas e calculados por aproximação através da correspondência da concentração em mg/25mL da solução padrão com os valores médios de área obtidos pelo sistema cromatográfico.

Tomou-se valores médios de concentração obtida para algumas amostras em mg/100g e a média de seus valores de área e comparou-se com os valores de área do padrão, então para o pico da vitamina C:

Unidades de área na amostra: 788534----------31,673 mg/100g
Unidades de área no padrão: 370572 ---------- X
X= 14,88mg/100g

Concentração do padrão: 0,392 mg/25 mL ----------14,88mg/100g
Concentração do ponto 7: 2,74mg/25mL---------- Y
Y= 104,01 mg/100g

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 à presença de valores discordantes.

3.4.2 Teste de degradação

A degradação do ácido ascórbico ao longo de uma seqüência de amostragem foi verificada através de 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 no teste de degradação.

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

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

Este teste foi dividido em duas partes, a primeira utilizou quatro tipos de soluções extratoras diferentes e soluções padrões de ácido ascórbico. A segunda parte selecionou as duas melhores soluções extratoras obtidas na primeira parte para extrair uma amostra de suco.

3.4.3.1 EDTA como agente estabilizante

Foram preparadas dez soluções padrão de vitamina C com concentração final aproximada de 1mg/mL através da dissolução do padrão em uma solução de EDTA 0,05% (m/v) em ácido sulfúrico PA 0,05M. As soluções foram injetadas no sistema cromatográfico imediatamente após o preparo.

3.4.3.2 Ácido oxálico como agente estabilizante

Foram preparadas dez soluções padrão de vitamina C com concentração final aproximada de 1mg/mL através da dissolução do padrão em uma solução de ácido oxálico 6% (m/v) em ácido sulfúrico PA 0,05M. As soluções foram injetadas no sistema cromatográfico imediatamente após o preparo.

3.4.3.3 Ácido metafosfórico como agente estabilizante

Foram preparadas dez soluções padrão de vitamina C com concentração aproximada de 1mg/mL através da dissolução do padrão em uma solução de ácido metafosfórico 3% (m/v) em ácido sulfúrico PA 0,05M. As soluções foram injetadas no sistema cromatográfico imediatamente após o preparo.

3.4.3.4 Ácido Sulfúrico 0,05M (fase móvel)

Foram preparadas dez soluções padrão de vitamina C com concentração aproximada de 1mg/mL através da dissolução do padrão em uma solução de ácido sulfúrico suprapuro 0,05M. As soluções foram injetadas no sistema cromatográfico imediatamente após o preparo.

3.4.3.5 Quantificação de amostra de suco de maracujá

Foram realizadas 10 repetições de preparo de uma amostra de suco de maracujá comercial em embalagem tipo tetrapack adquirida em supermercado da cidade do Rio de Janeiro. A amostra foi, então extraída com solução de EDTA em ácido sulfúrico PA 0,05M e quantificadas quanto ao teor de vitamina C a partir de um padrão de calibração preparado da mesma forma. Outras 10 replicatas da mesma amostra foram extraídas somente com ácido sulfúrico suprapuro 0,05M e também quantificadas quanto ao teor de vitamina C a partir de um padrão de calibração preparado da mesma forma. O teor de vitamina C informado no rótulo do suco de maracujá foi de 30mg de vitamina C para 200mL de suco ou seja 15mg/100mL.

3.4.4 Testes de recuperação

Os testes de recuperação foram divididos em duas partes, a primeira com uma amostra de suplemento vitamínico e a segunda com uma amostra de mamão.

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 extratora. As replicatas foram injetadas em cromatógrafo líquido previamente calibrado com soluçãode padrão externo de ácido ascórbico e o teor de vitamina C por amostra foi determinado.

3.4.4.2 A partir de matriz de fruta – Parte II

A fim de estabelecer os teores possíveis de recuperaração 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 foram determinados a partir do presente método. Da mesma polpa de mamão foram feitas outras 6 extrações sendo que estas foram fortificadas com 0,1mL de uma solução padrão de ácido ascórbico na concentração de 22,65mg/mL. Os teores de vitamina C para estas amostras, 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 aqueles obtidos pelo método titulométrico com 2,6-dicloroindofenol (AOAC Official Method 967.21, 2000). 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 de ácido ascórbico/100g de amostra, onde 50

laboratórios participaram. O objetivo foi quantificar o teor de ácido ascórbico em uma amostra de suco de limão artificial (Cordial Lemon Juice). A amostra teste foi homogeneizado por 18 horas em agitação magnética, sob nitrogênio, em ausência de luz e à 4°C. Alíquotas de 30mL foram colocadas em frascos âmbar e enviadas para os participantes do teste. Cada participante descreveu em um formulário apropriado todas as informações sobre o método utilizado por seu laboratório e as observações pertinentes ao preparo da amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

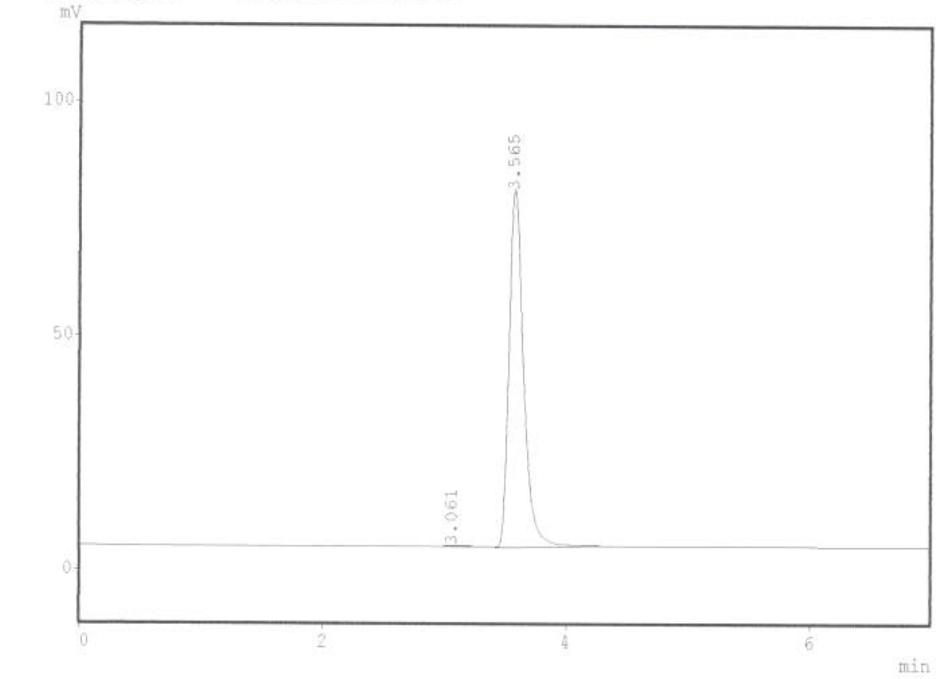
A separação de substâncias que se ionizam via cromatografia de fase reversa é bastante complexa, necessitando de controle rígido de pH para que não haja equilíbrio entre as formas iônica e molecular de uma mesma substância (pH de trabalho igual ao pKa do analito). O controle do pH também pode ser requerido para que ocorra supressão iônica já que partículas com carga possuem baixa interação com a fase estacionária apolar. No caso do ácido ascórbico (pka_1 4,2), a diminuição do pH para valores menores que 4,2 além de evitar que o equilíbrio entre as formas iônica e molecular aconteça, deslocar este equilíbrio no sentido da forma molecular da vitamina C devido ao aumento da concentração de íons hidrogênio em solução.

O método de análise de vitamina C descrito por POLESELLO & RIZZOLLO (1990), utilizado anteriormente pela Embrapa Agroindústria de Alimentos consistia em uma separação por fase reversa (C18) e tampão fosfato pH 2,5. A vazão de fase móvel era de 1,0 mL/min, volume de injeção 20µL e detecção por UV a 254nm. Uma comparação entre este método e o método por coluna de troca iônica é feita através das figuras 28, 29, 30 e 31 que demonstram os resultados de ambos os métodos na análise de uma amostra de manga. Os métodos produziram boa separação com suas respectivas soluções padrão (figuras 28 e 30). Pode-se notar a separação insuficiente da vitamina C das substâncias interferentes presentes na matriz da amostra para o método POLESELLO & RIZZOLLO (figura 29). A Figura 31 diz respeito ao primeiro teste com a coluna de troca iônica para a análise de vitamina C segundo o método desenvolvido neste estudo e revela um pico deste anallíto resolvido a nível de linha base e sem deformações decorrentes da coeluição de interferentes.

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. Nas matrizes vegetais anteriormente utilizadas (inclusive manga), o método por fase reversa demonstrou separação insuficiente e baixa resolução. O método por coluna de troca iônica, porém, demonstrou separação completa para o ácido ascórbico. A mudança de tipo de fase estacionária (sílica para polímero com trocador iônico) mostrou-se bastante eficiente, eliminando os interferentes e permitindo uma resolução cromatográfica a de linha base. A vazão de fase móvel utilizada neste primeiro teste foi de 1,0mL/min.

```
Sample          : vit c - manga
ID              : PADRAO
Sample Amount   : 1
Type            : Standard
Detector        : Other
Operator        : Lourdes
Method Name     : VITC3001.M01

*** Chromatogram ***  Filename:VITC3001.C01
```




```
*** Peak Report ***
PKNO   TIME       AREA        HEIGHT   MK  IDNO     CONC        NAME
   1   3.061        1246        172
   2   3.565      640603      76346        1                   vit c
```

Figura 28: Cromatograma obtido após injeção de solução padrão de ácido ascórbico segundo método POLESELLO & RIZZOLLO (1990) anteriormente utilizado pela Embrapa Agroindústria de Alimentos. O tempo de retençãodo pico da vitamina C foi 3,565 minutos.

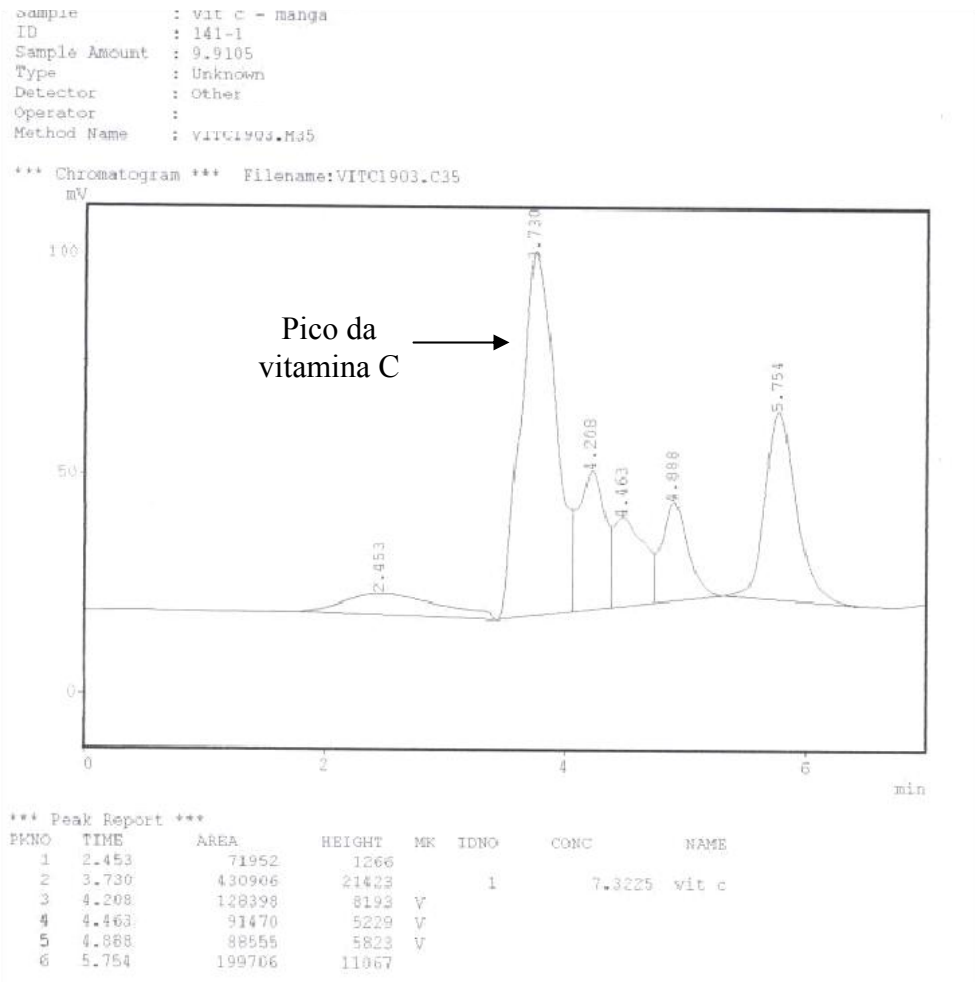
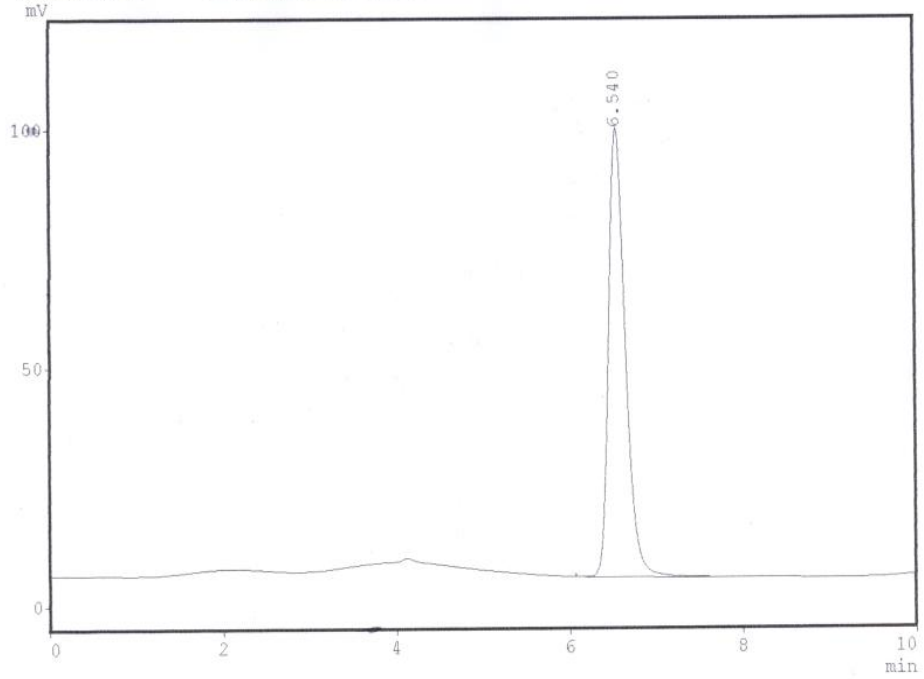


Figura 29: Cromatograma obtido após injeção Amostra de suco de manga d segundo método POLESELLO & RIZZOLLO (1990) anteriormente utilizado pela Embrapa Agroindústria de Alimentos. A separação cromatográfica foi insuficiente e o tempo de retenção do pico reportado como vitamina C foi de 3,730 minutos.

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

*** Chromatogram ***  Filename:VITC2703.C07
```




```
*** Peak Report ***
PKNO   TIME       AREA        HEIGHT   MK  IDNO     CONC        NAME
  1    6.540      1279401      94089         1        0.2428  vit c
```

Figura 30: Cromatograma obtido após injeção de solução padrão de ácido ascórbico segundo método desenvolvido através deste estudo com coluna de troca iônica. O tempo de retenção do pico de vitamina C foi de 6,540 minutos.

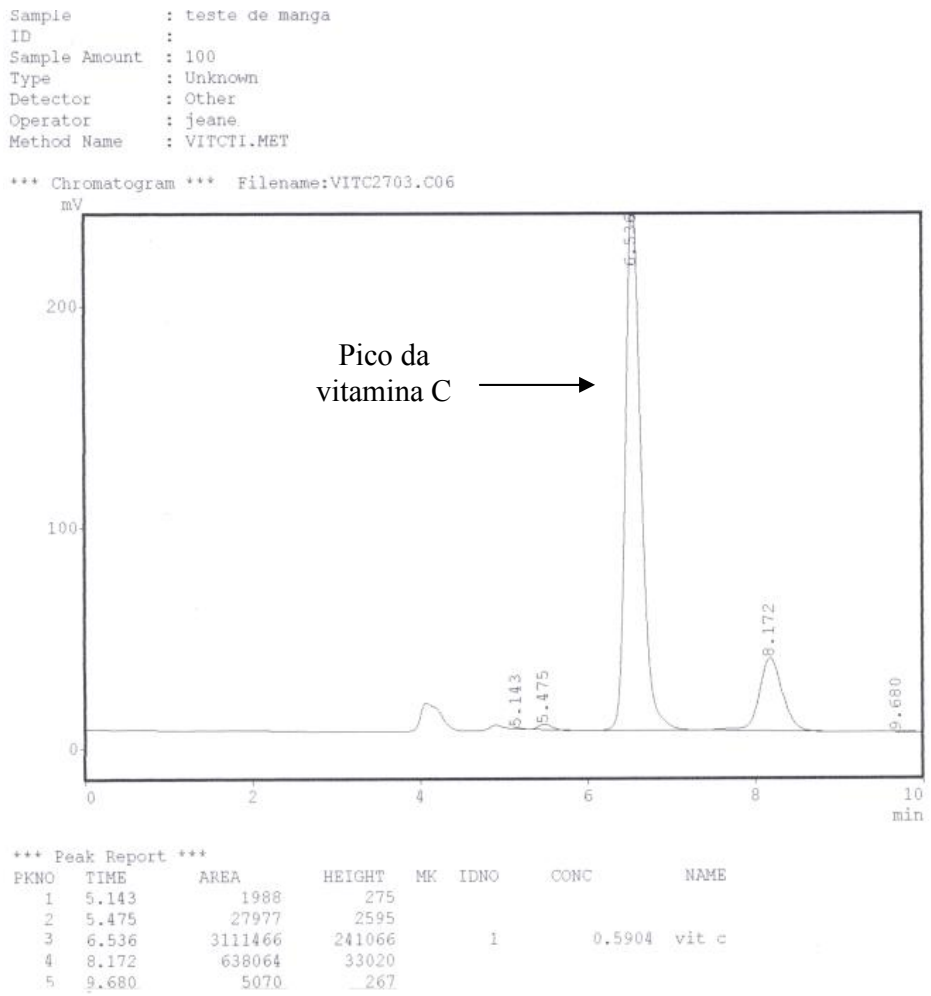


Figura 31: Cromatograma obtido após injeção de amostra de suco de manga analisada segundo método desenvolvido através deste estudo. A separação cromaográfica apresentou um pico bem definido e resolvido a nível de linha base, sendo o tempo de retenção deste igual 6,536 minutos.

4.2 Considerações relativas ao preparo da amostra e à análise de vitamina C por coluna troca iônica.

4.2.1 Efeito da homogeneização

A homogeneização das amostras é importante para garantir a maior superfície de contato possível da solução extratora (fase móvel) com a matriz. 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 extratora não interage com pontos da matriz da mesma forma em amostras com tamanhos irregulares.

O uso de processadores ou homogeinizadores tipo blender ou politron também visa provocar o rompimento das paredes celulares e ajudar a liberar o ácido ascórbico da 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 troca iônica diminui o envolvimento do operador, pois o manuseio e as perdas de amostra são mínimos. Os possíveis erros na execução das atividades são assim minimizados

A extração com a própria fase móvel (ácido sulfúrico 0,05M) 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 extratora utilizada). Optou-se somente por utilizar um ácido sulfúrico de alta pureza (suprapuro) para 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 (solvente com maior força de eluição) 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 freqüência 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.

4.2.3 Água ultrapura

A utilização de água ultrapura para o preparo da fase móvel e solução extratora 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 microrganismos e compostos orgânicos. 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 e ASTM-American Society for Testing and Materials (MILLIPORE CORPORATION, 2001), 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.[1]	N.E. [1]	N.E. [1]	5.0 a 8.0
Resistência específica, *megohm-cm `a 25°C*, min	18.0	1.0	4.0	0.2
Condutividade, *uS/cm à 25° C*, max	0.056	1.0	0.25	5.0
Silicatos (SiO_2) - *ug/L,* max	3	3	500	SL[2]
Sódio *ug/L,* max	1	5	10	50
Substâncias orgânicas (TOC), *ug/L, max*	50	50	200	SL[2]
Cloreto *ug/L,* max	1	5	10	50

[1]NE: Não especificado pois a água não possui constituintes suficientes para medida de pH
[2]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, microrganismos 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 microrganismos 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® para osmose reversa e eletrodeionização que fornece água tipo II. Um sistema de auto sanificação por radiação UV, garante a destruição de microrganismos 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 0,22µm.

É importante lembrar que a água ultrapura não pode ser estocada por mais de um dia, pois constitui um meio para a proliferação de microrganismos devido a retirada de compostos bactericidas como cloro, além de ser capaz de extrair íons ou plastificantes de frascos de borosilicato ou polietileno, respectivamente.

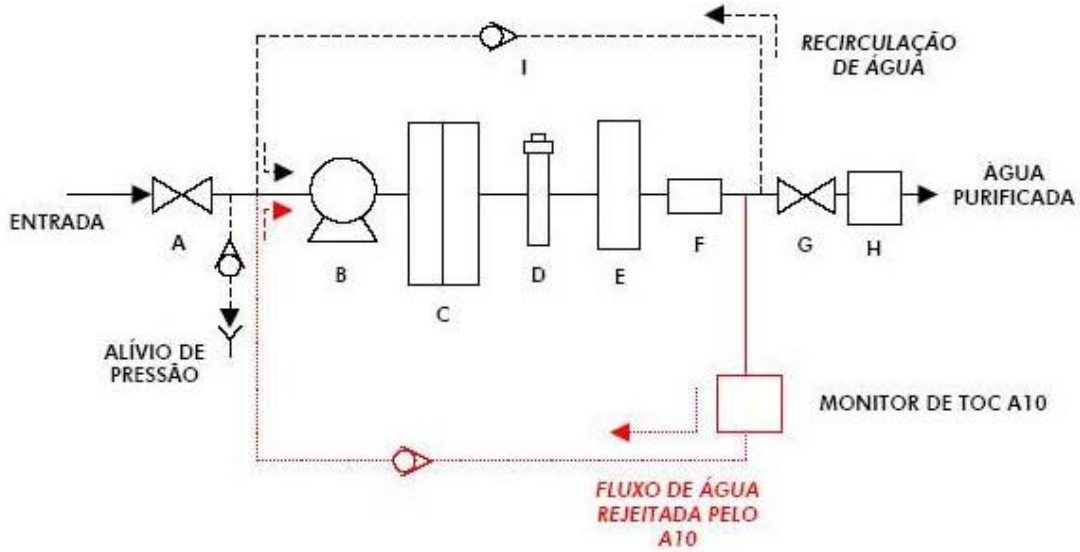


Figura 32: Diagrama de funcionamento do sistema de ultrapurificação de água do laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos – Milli-Q Gradiente. (A) Válvula solenóide de entrada; (B) bomba; (C) módulo de purificação (para retirada de compostos orgânicos); (D) lâmpada UV (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 0,22µm (retira microrganismos e micro partículas) e (I) Válvula de não retorno.

4.2.4 Fase móvel

A utilização do ácido sulfúrico 0,05M (pH 1,3), como fase móvel, faz parte do mecanismo de separação da coluna utilizada, cuja forma iônica H^+ é proveniente do ácido sulfônico ligado à resina. O ácido sulfúrico é utilizado pois é um ácido forte o bastante ($pKa_1<0$) para manter a maioria dos ácidos orgânicos na forma molecular. O ácido sulfônico da resina permanecerá ionizado no pH da fase móvel (pKa<1).

Assim que as análises terminam, a coluna deve ser retirada para ser estocada na própria fase móvel e em geladeira. Devido a seu pH baixo, esta fase móvel não pode permanecer parada no sistema cromatográfico. Deve-se então passar água ultrapura por aproximadamente 1 hora 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 microorganismos. 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® hidrofílico que tem como desvantagem o alto custo. As membranas de Teflon® hidrofóbico também podem ser usadas, mas antes de utilizá-las é preciso passar uma pequena quantidade de metanol ou THF (tetrahidrofurano) para retirar sua hidrofobicidade 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® que permeiam o gás dissolvido na fase móvel para o ambiente.

4.2.6 Microfiltração das amostras

A filtração das amostras após a extração da vitamina C 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 possível, tomando-se os devidos cuidados com a lavagem e secagem destes, 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 laváveis 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 alternativa viável para não microfiltrar a amostra com unidades filtrantes descartáveis. A pressão do sistema cromatográfico deve ser constantemente monitorada, pois seu aumento significa que o filtro precisa ser limpo ou trocado, neste caso ainda há risco de obstrução da tubulação do injetor automático.

4.2.7 Cuidados no preparo das amostras

Todas as amostras consistiram de vegetais frescos ou material processado com embalagem recém aberta, 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. 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 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).

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

A luz branca contém uma mistura de todos os comprimentos de onda, sendo que 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.

No 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 400nm (violeta) a 800nm (vermelho).

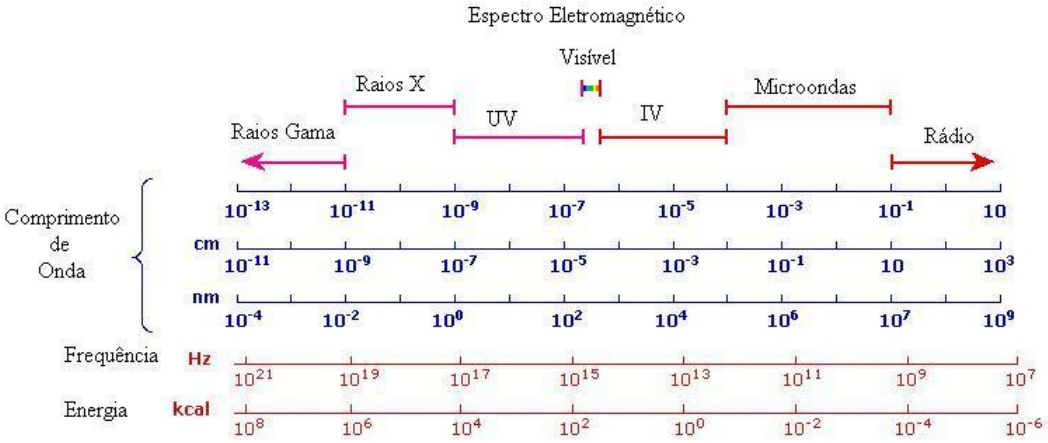


Figura 33: Faixas de emissão das radiações do espectro eletromagnético.

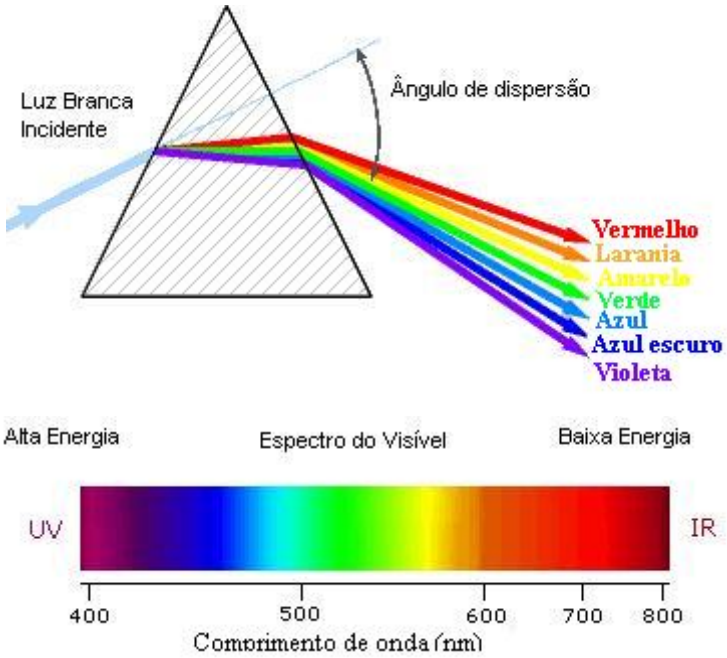


Figura 34: Decomposição da luz branca nos comprimentos de onda da região do visível.

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 às ligações cruzadas existentes (Figura 35 e 36). Esta coluna possui 8% de ligações cruzadas sendo que, quanto menor o número destas mais aberta será a estrutura da resina e portanto mais permeável para substâncias de maior massa molecular.

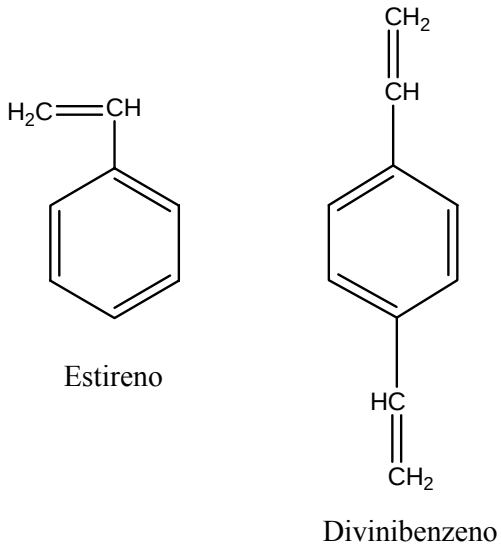


Figura 35: Estrutura química dos monômeros que constituem a fase estacionária da coluna utilizada.

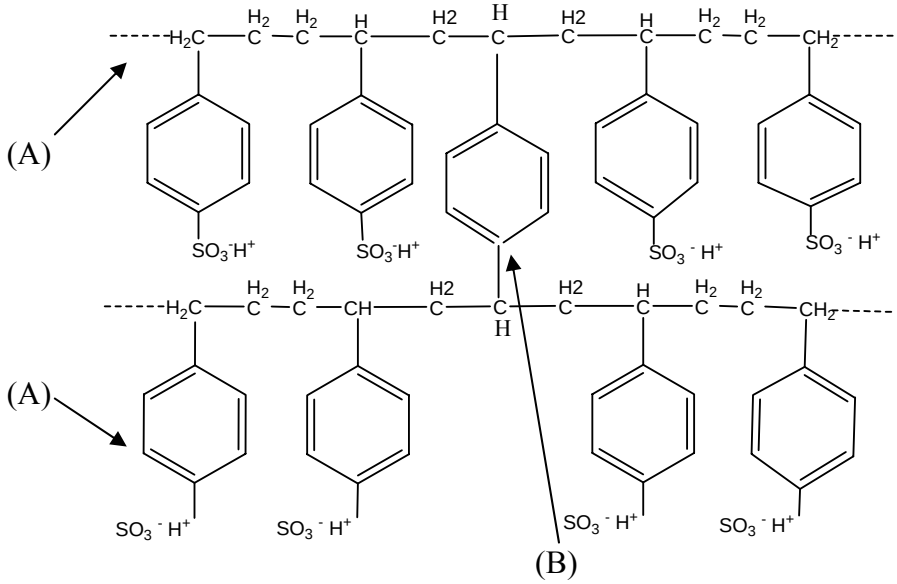


Figura 36: Estrutura química da resina de estireno-divinilbenzeno sulfonado (fase estacionária). (A) Cadeias de poliestireno sulfonado (B) Ligação cruzada: Divinilbenzeno entre as cadeias de poliestireno.

O mecanismo de separação consiste basicamente de exclusão iônica e partição por fase reversa. Nesta coluna a força ácida do eluente (H_2SO_4 0,05M) 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 analíto 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 SO^{-3} H^+ (trocadores de cátions) da coluna produzem um pH de quase zero dentro da fase estacionária, não permitindo, portanto 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 sentindo da forma ácida (molecular) devido ao aumento da concentração de íons H^+ no meio (Figura 37).

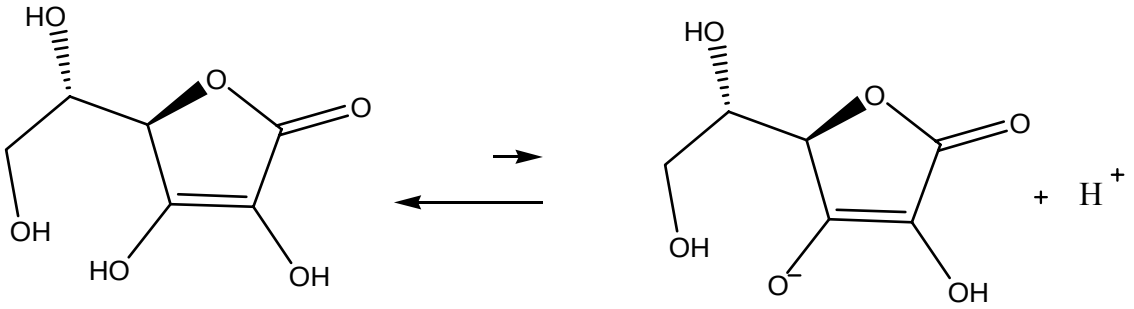


Figura 37: Dissociação do ácido ascórbico: equilíbrio deslocado para a esquerda (forma molecular) em função do aumento da concentração de íons H^+ do meio pela fase móvel e pela fase estacionária.

Esta coluna custa aproximadamente 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. Um aumento de pressão pode significar entupimento nos filtros de entrada e/ou saída (principalmente entrada) da coluna. Neste caso, no procedimento de limpeza deve-se deixar a coluna na geladeira durante 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 a própria fase móvel (as extremidades devem estar fechadas) e em geladeira. Esta coluna não 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 (800µL), 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 detetores (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 detetores de arranjo de fotodiodos (PDA) facilitou a determinação do comprimento de onda de absorção máxima para o analíto, 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 a 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 extratora (fase móvel).

4.5 Cálculo da concentração de vitamina C

Os teores de vitamina C são automaticamente calculados pelo software Empower®, após introdução neste de informações como tempo de retenção da vitamina C (através de solução de padrão externo), 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 são 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

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

Fórmula 2: Cálculo pontual do teor da vitamina C

Para amostras líquidas cujo resultado deve ser expresso em mg/100mL, basta substituir a massa da amostra pelo volume de amostra que foi utilizado.

Um cuidado que deve ser tomado é unificar os volumes de diluição, ou seja, se o padrão foi diluído para 10mL, a amostra também deve ser (ver Tabela 2) a não ser que seja feito um ajuste, adicionando-se um fator de diluição aos cálculos. Por exemplo, se a amostra foi diluída para 25mL e o padrão para 10mL, a diluição 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

diluição 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 e a estabilidade do padrão, 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 sensibilidade 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 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 a fim de realizar-se as modificações necessárias.

Os valores de concentração versus área dos pontos da curva de calibração foram plotados em curva (usando-se uma planilha Excel® ou o próprio software Empower®, diretamente), onde os coeficientes angular e linear são calculados. O cálculo do teor de vitamina C em mg/100g de amostra será dado pela Fórmula 3**.**

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

onde: b = Coeficiente Linear (interceção)
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 neste estudo foram morango e mamão, mas o método foi aplicado também para calcular os teores de vitamina C em tomate, batata, mandioca, água de coco e sucos de manga, abacaxi, laranja, maçã, caju, maracujá e goiaba.

O Gráfico 1 a seguir demonstra a variação dos teores de vitamina C em 8 sequências de análises de amostras de mamão selecionadas. Cada uma destas seqüências foram compostas por um número que variou entre 4 e 24 frutos analisados individualmente. Os valores médios do teor de vitamina C que os 8 grupos forneceram para mamão foram, 94,75 ± 1,92 vitamina C/100g de amostra.

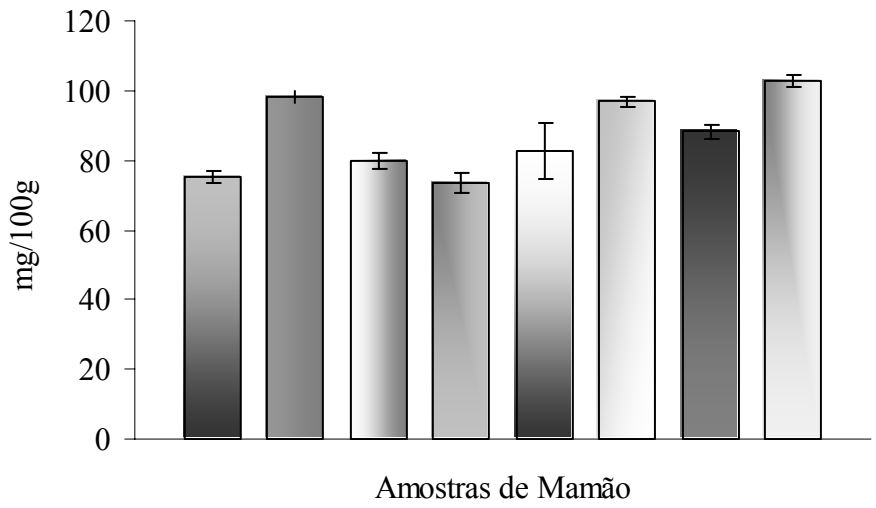


Gráfico 1: Variação de teores de vitamina C em amostras de mamão.

O Gráfico 2 a seguir demonstra a variação dos teores de vitamina C em 8 sequências de análises de amostras de morango selecionadas. Cada uma destas seqüências foram compostas por um número que variou entre 4 e 24 grupos de frutos analisados individualmente. Os valores médios do teor de vitamina C que os 8 grupos forneceram para morango foram 40,53 ± 1,30mg de vitamina C/100g de amostra.

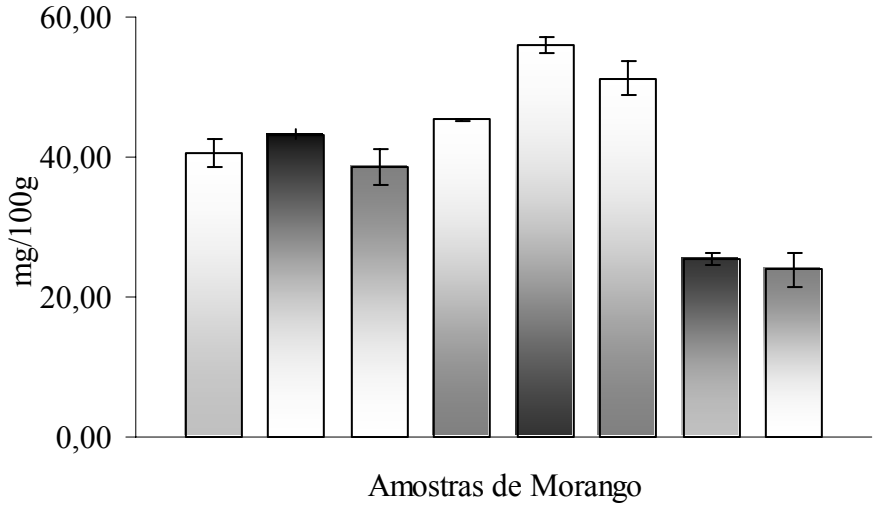


Gráfico: 2: Variação de teores de vitamina C em amostras de morango.

Os teores encontrados para mamão e morango estão de acordo com os descritos pela literatura, sendo 80,5 ± 9,5 para mamão não maduro; 92,5 ± 5,0 para mamão meio maduro; 148 ± 13 para mamão maduro (HERNÁNDEZ *et al.*, 2005) e para morango variando na faixa de 85 a 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 e variedade das frutas estudadas (STURM *et al.*, 2003 e PEREZ *et al.*, 1997).

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

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

Matriz da amostra	Teor de vitamina C encontrado (mg/100g)
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 são mostrados nas Figuras 38 e 39.

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 do pico correspondente à vitamina C foi de aproximadamente 8,4minutos.

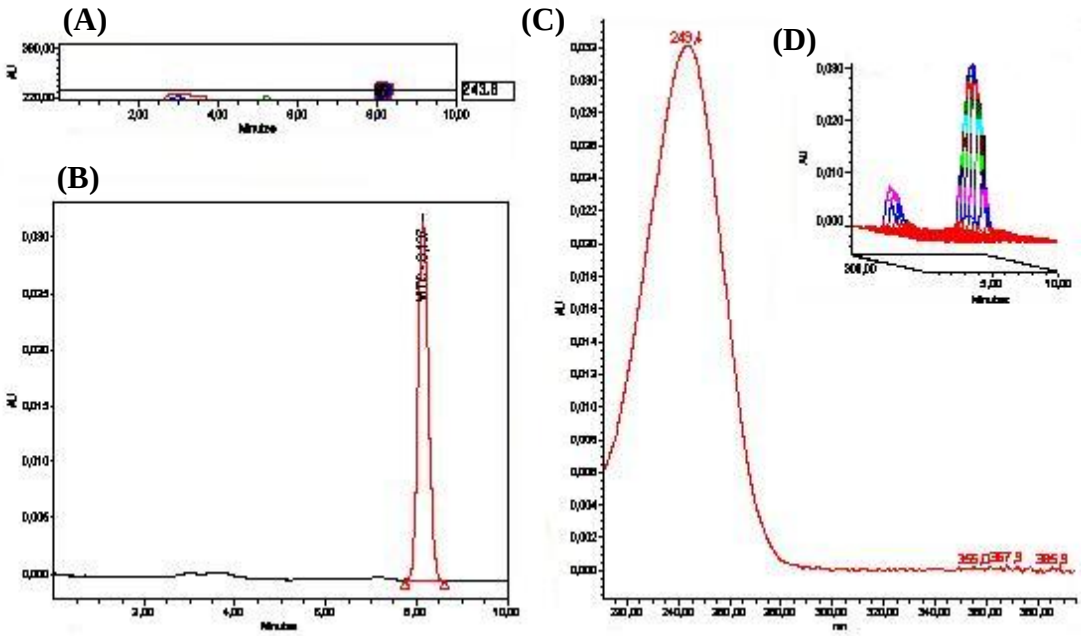


Figura 38: Cromatograma de amostra de mamão extraído do conjunto de dados do espectro à 243nm (B); espectro de contorno (vista superior) (A); comprimento de onda de absorção máxima (C) e espectro 3D em miniatura (D).

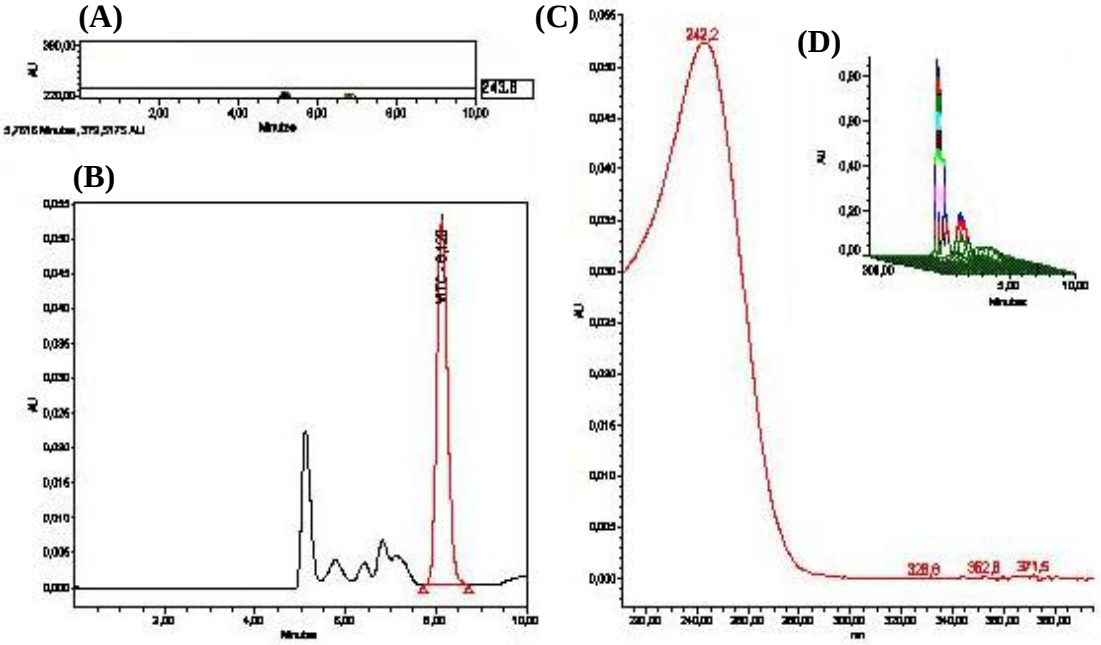


Figura 39: Cromatograma de amostra de morango extraído do espectro à 243nm (B); espectro de contorno (vista superior) (A); comprimento de onda de absorção máxima (C) e espectro 3D em miniatura (D).

A Figura 40 corresponde a uma injeção de padrão de calibração, onde o tempo de retenção do pico da vitamina C foi de aproximadamente 8,4 minutos.

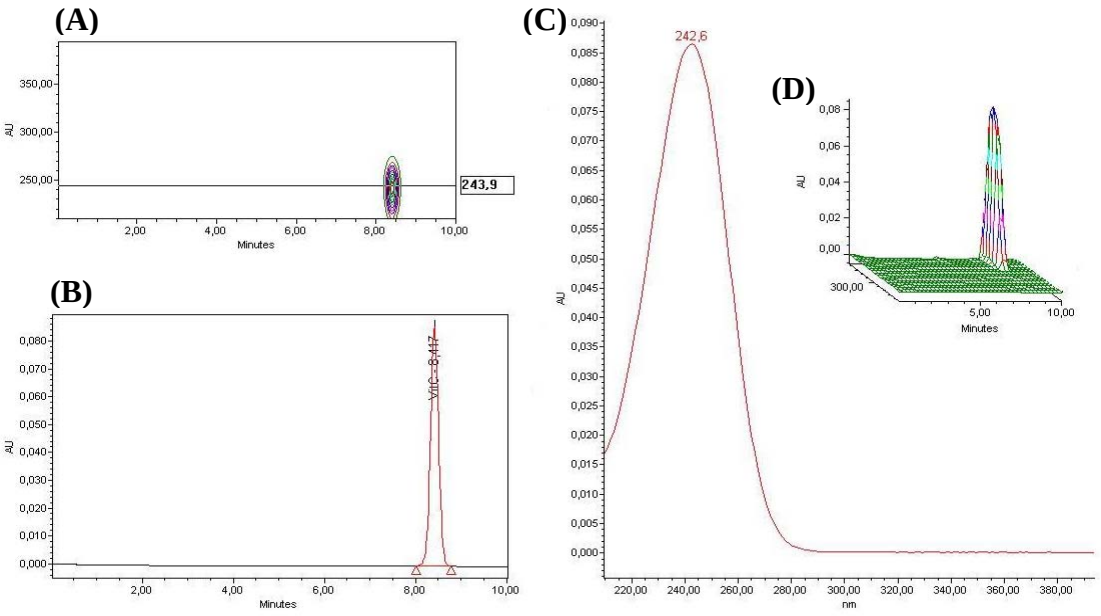


Figura 40: Cromatograma de um padrão de calibração de ácido ascórbico extraído do espectro à 243nm (B); espectro de contorno (vista superior) (A); comprimento de onda de absorção máxima (C) e espectro 3D em miniatura (D).

Em um detetor 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 instantâneamente para uma faixa pré-estabelecida de comprimento de onda e tempo de análise cromatográfica. O intervalo de coleta de dados é de 1,2nanômetros. 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).

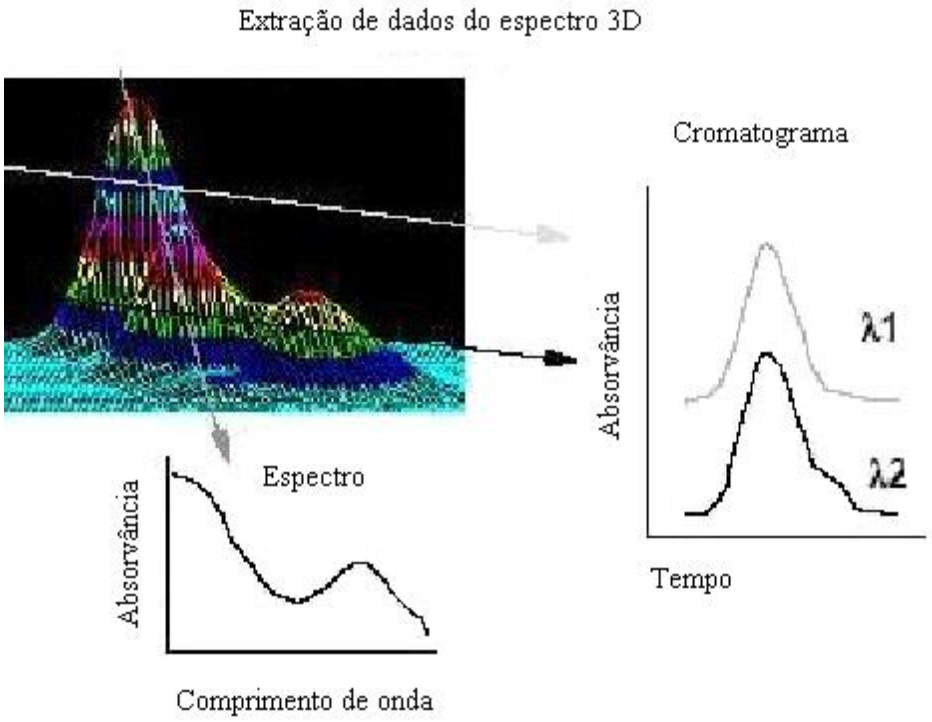


Figura 41: Informações em três dimensões do detetor PDA.

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

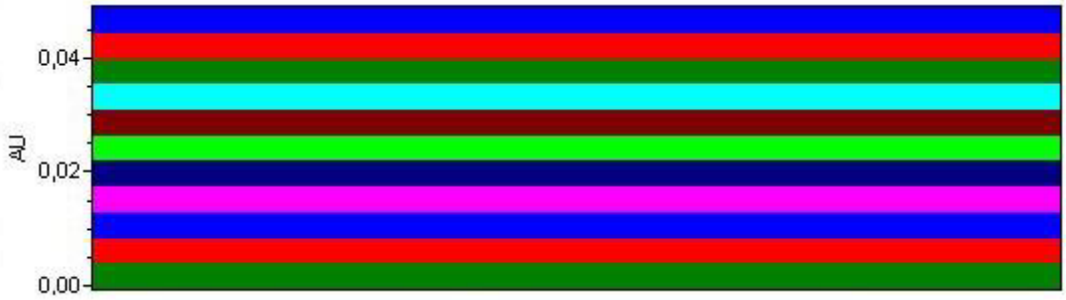


Figura 42: Escala de cores de um espectro de acordo com a intensidade de absorção (AU).

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, as quais estão em regiões bastante distintas, não constituindo interferência próxima à região do pico da vitamina C.

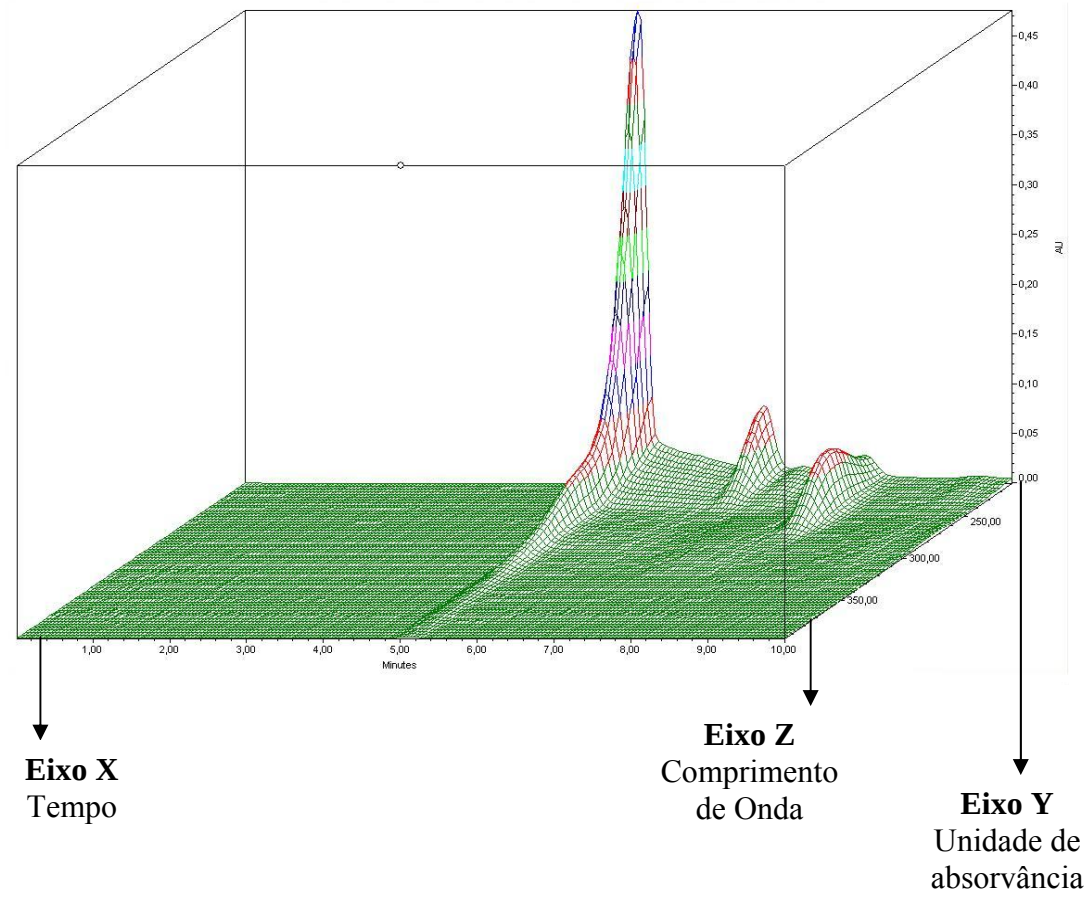


Figura 43: Espectro 3D da vitamina C para uma amostra de morango, segundo o método proposto neste estudo.

4.8 Estudos preliminares

Conforme informado anteriormente, o 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 da analise cromatográfica. Buscou-se, no entanto, não perder o foco principal que visava manter a rapidez e simplicidade do método como um todo.

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. Para as amostras de mamão, conforme verificado anteriormente, obteve-se níveis próximos de 100 mg/100g, portanto 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 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).

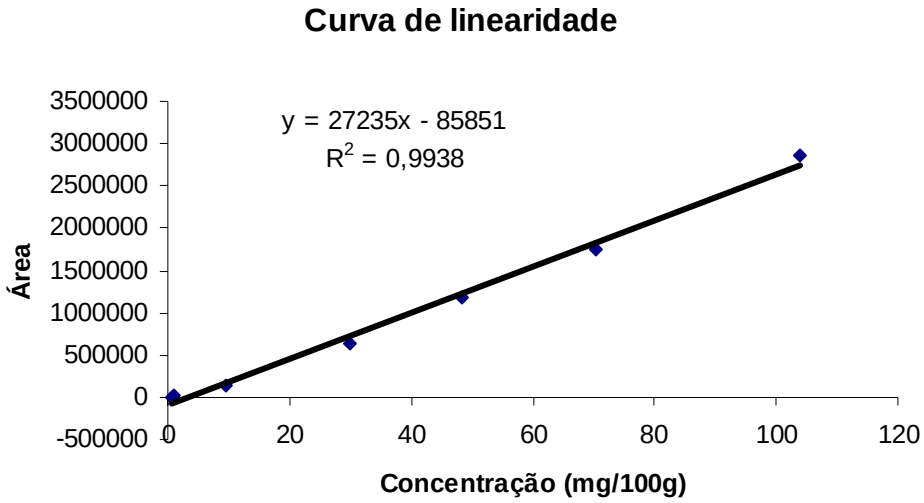


Gráfico 3: Verificação da linearidade do método para análise de ácido ascórbico por cromatografia líquida de troca iônica, a qual apresentou um desvio padrão de 0,9938 (R^2) e equação da reta: y= 27235x-85851.

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 que exclusivamente reportada aos problemas de preparo da amostra e/ou equipamentos.

Este experimento visou verificar a degradação da vitamina C na solução extratora enquanto dentro da câmara refrigerada 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) 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 maiores ajustes. Os testes com matriz são bastante complexos e serão considerados durante a validação do método.

Os cálculos foram feitos com base em fator de resposta (FR) e não em 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, será devido à diminuição de área do pico de vitamina C, ou seja a quantidade deste analíto percebida pelo detetor é menor, neste caso, em função de ocorrência de degradação.

Cada uma das três soluções padrão foram injetadas após o preparo e logo a seguir foram injetadas, seqüencialmente, 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 e pela tabela 7 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 x 10^{-7} a 2,698 x 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 (aproximadamente 1 hora e cinqüenta minutos) não houve degradação significativa da vitamina C nas soluções padrão.

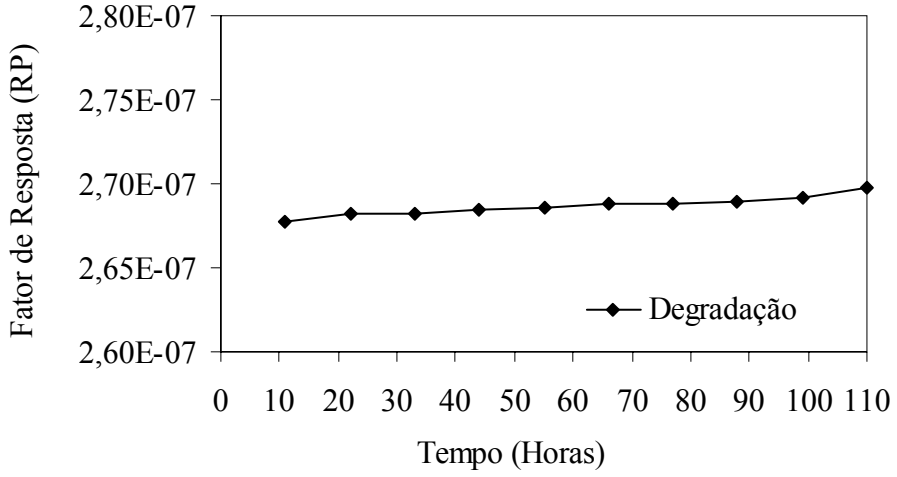


Gráfico 4: Verificação da degradação do padrão de ácido ascórbico em função do tempo de permanência da amostra no injetor.

Tabela 7: Dados do teste de degradação em fator de resposta

	Fatores de Resposta				
Tempo	FR1	FR2	FR3	Média	Erro Padrão
11	2,7279E-07	2,6716E-07	2,6336E-07	2,678E-07	2,74E-09
22	2,7348E-07	2,6742E-07	2,6389E-07	2,683E-07	2,80E-09
33	2,7330E-07	2,6726E-07	2,6418E-07	2,682E-07	2,68E-09
44	2,7354E-07	2,6762E-07	2,6421E-07	2,685E-07	2,73E-09
55	2,7363E-07	2,6783E-07	2,6420E-07	2,686E-07	2,75E-09
66	2,7375E-07	2,6769E-07	2,6505E-07	2,688E-07	2,58E-09
77	2,7373E-07	2,6804E-07	2,6480E-07	2,689E-07	2,61E-09
88	2,7414E-07	2,6799E-07	2,6483E-07	2,690E-07	2,73E-09
99	2,7449E-07	2,6757E-07	2,6536E-07	2,691E-07	2,75E-09
110	2,7454E-07	2,6926E-07	2,6564E-07	2,698E-07	2,59E-09
			Desvio Padrão =	**5,677E-10**	
			Média =	**2,687E-07**	
			CV* (%) =	**2,113E-01**	

* Coeficiente de Variação

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

Este teste foi realizado em duas partes com o objetivo de verificar a capacidade de estabilização do ácido ascórbico por soluções extratoras diferentes em solução padrão e em uma amostra escolhida aleatoriamente.

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 hidroxi e também íons metálicos. Quando o ácido ascórbico é dissolvido em água, o pH da solução diminui devido à ionização parcial do grupo enediol no carbono 3 (LEE *et al.*, 2004). A estabilização do ácido ascórbico se dá através de acréscimo de H^+, dificultando sua ionização, estabilizando o grupo hidroxila e consequentemente o anel da lactona, prevenindo a hidrólise irreversível ao ácido 2,3-dicetogulônico (DAVEY *et al.,* 2003).

Em formulações ou quando adicionada em 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 significantemente a recuperação do ácido ascórbico (RIZZOLO *et al.*, 2002).

Entre as soluções mais utilizadas para extrair o ácido ascórbico e também estabilizá-lo pode-se citar o ácido oxálico ou ácido metafosfórico 3-6% (m/v). 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% (m/v) 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), cita 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.

O método acima citado também utilizou uma coluna HPX 87H BIORAD e ácido sulfúrico 0,02M como fase móvel (dez vezes mais diluída 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 no 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. Todos as soluções foram feitas em ácido sulfúrico 0,05M em função da necessidade da coluna cromatográfica utilizar esta fase móvel.

O teste teve por objetivo comparar o comportamento do ácido ascórbico em quatro soluções: ácido sulfúrico 0,05M suprapuro (fase móvel), soluções de ácido oxálico 6% (m/v) em ácido sulfúrico grau PA 0,05M, ácido metafosfórico 3% (m/v) em

ácido sulfúrico PA 0,05M e Solução de EDTA 0,05% (m/v) também em ácido sulfúrico PA 0,05M. Cada uma destas soluções foram analisadas quanto ao teor de vitamina C pelo método com coluna de troca iônica e os resultados reportados em termos de fator de resposta. Pois quanto menor, o fator de resposta, maior a área e conseqüentemente menor terá sido a degradação do padrão de ácido ascórbico.

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 0,05M suprapuro (pH 1,3). Desta forma, considera-se que a solução de ácido sulfúrico suprapuro 0,05M é uma boa escolha para estabilizar a vitamina C e também manter a idéia de praticidade do método, não inserindo neste, o preparo de outra solução extratora, diferente da fase móvel.

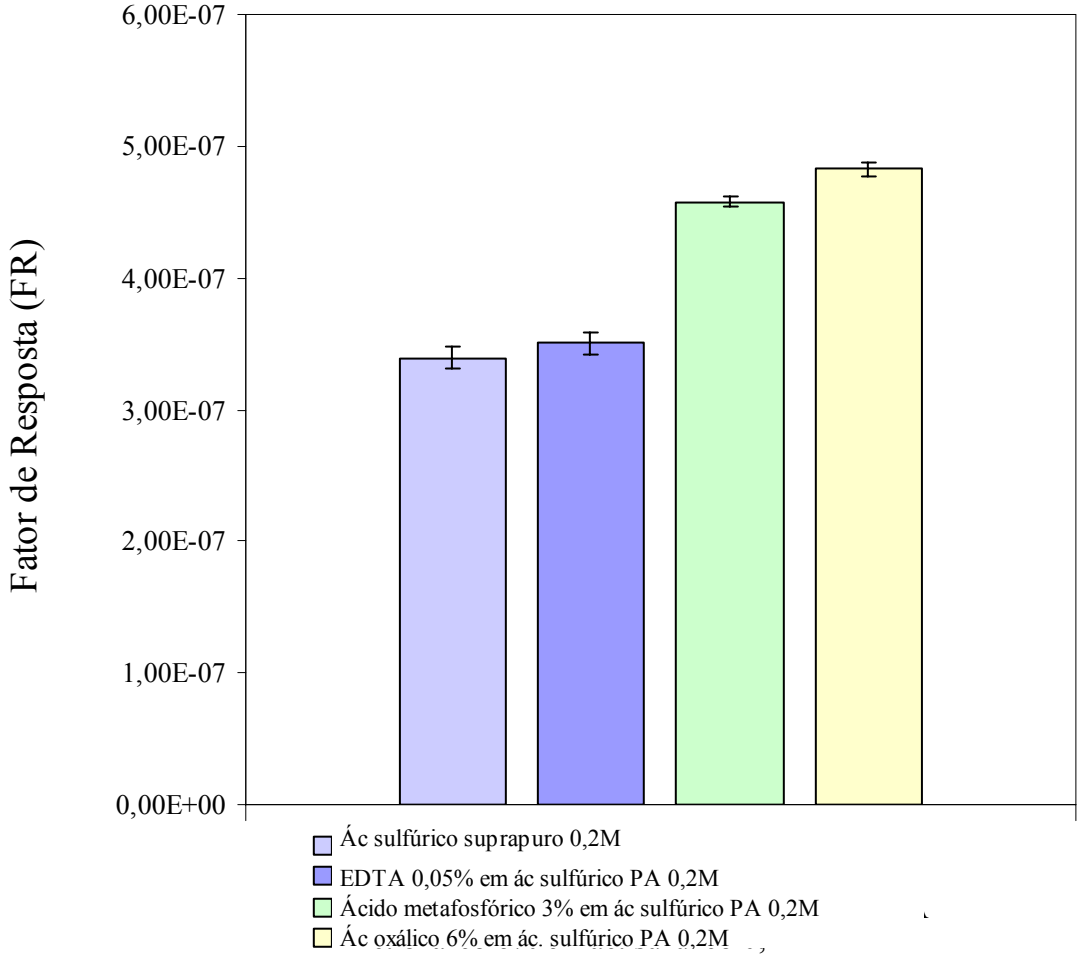


Gráfico 5: Comparação da resposta obtidas após análise de ácido ascórbico (AA) em diversas soluções extratoras. Os resultados estão expressos pelo fator de resposta, o qual é inversamente proporcional à quantidade de AA extraída. Barras verticais representam o erro padrão da média.

Parte 2 - Este experimento objetivou testar a eficiência das soluções extratoras que forneceram os melhores resultados na parte 1, verificando a estabilização da vitamina C em solução de EDTA 0,05% (m/v) e ácido sulfúrico PA 0,05M contra a solução de ácido sulfúrico suprapuro 0,05M na extração de uma amostra e com isso avaliar o efeito de matriz. A amostra escolhida aleatoriamente foi suco de maracujá.

O teor médio em mg de vitamina C por 100mL de suco, obtidos nas 10 repetições com a solução de EDTA e somente com ácido sulfúrico 0,05M foram, respectivamente, 14,36 ±0,21 e 15,60 ±0,13 (Gráfico 6 e Tabela 8). O teor informado no rótulo do produto foi de 15mg/100mL.

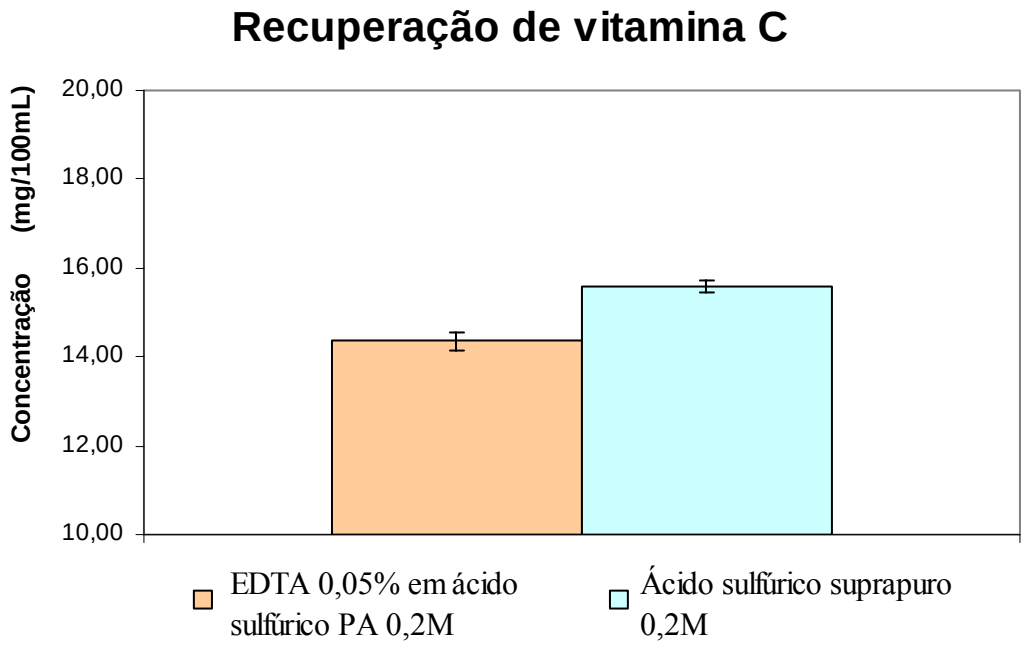


Gráfico 6: Extração de vitamina C em suco de maracujá utilizando soluções extratoras diferentes.Barras verticais representam o erro padrão da média.

Tabela 8: Teores encontrados nas duas soluções extratoras testadas

Repetição	Ác Sulfúrico Suprapuro 0,2M (mg/100mL)	0,05 % de EDTA em Ác Sulfúrico PA 0,2M (mg/100mL)
am 1	16,31	15,70
am2	15,24	15,33
am 3	14,92	14,21
am 4	15,82	14,27
am 5	16,01	14,53
am 6	15,58	14,23
am 7	15,76	14,11
am 8	15,57	13,70
am 9	15,20	13,82
am 10	15,00	13,67
Média	**15,54**	**14,36**
Desvio Padrão	**0,45**	**0,67**
CV (%)	**2,90**	**4,69**

A diferença de aproximadamente 1,2 mg de vitamina C ocorrida entre as duas extrações não permite concluir que a solução de ácido sulfúrico suprarpuro extrai e/ou

estabiliza melhor a vitamina C no meio melhor do que a solução de EDTA, 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).

Próxima etapas a serem testadas neste método podem ser a extração em outras matrizes de suco e a extração de uma matriz sólida sem adição de ácido ascórbico. Neste último 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 e reprodutivo de recuperação da vitamina C na matriz estudada.

4.8.4 Testes de recuperação

4.8.4.1 Verificação da recuperação a partir de suplemento vitamínico – parte I

O objetivo deste teste foi verificar a recuperação percentual do método a partir de amostras de Cewin®. 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 9) para as dez repetições da amostra de suplemento vitamínico foi de 99,45% ± 0,63.

Tabela 9: Resultados da recuperação de vitamina C numa amostra de Cewin®.

Preparo	Teor encontrado	Recuperação
1	201,91	100,96
2	203,39	101,7
3	197,95	98,98
4	196,99	98,5
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
	Média:	**99,45**
	***Erro:**	**0,63**
	Desvio Padrão	**1,98**
	CV %	**1,99**

*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 o tamanho de partículas. Uma recuperação de 81,22% (Tabela 10), 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 10: 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
Média:	**81,22**
***Erro:**	**0,59**

*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.

O mamão, como todo tecido vegetal, apresenta grande variação nos teores de vitamina C em função de condições de plantio, grau de maturação e controle de condições pós-colheita. Para as amostras em questão, a média dos resultados representados na Tabela 10 supondo 100% de recuperação seria de 70,4mg vitamina C /100g de amostra. Estes teores encontram-se abaixo do encontrado na literatura, mas conforme visto anteriormente, não coube ao escopo deste estudo controle relacionado às variáveis acima descritas.

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 ±0,62 e o método titulométrico 59,61 ± 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). A presença

de SO_2 (utilizado como conservante em alguns sucos) também pode causar redução da vitamina C (VINCI *et al.,* 1995).

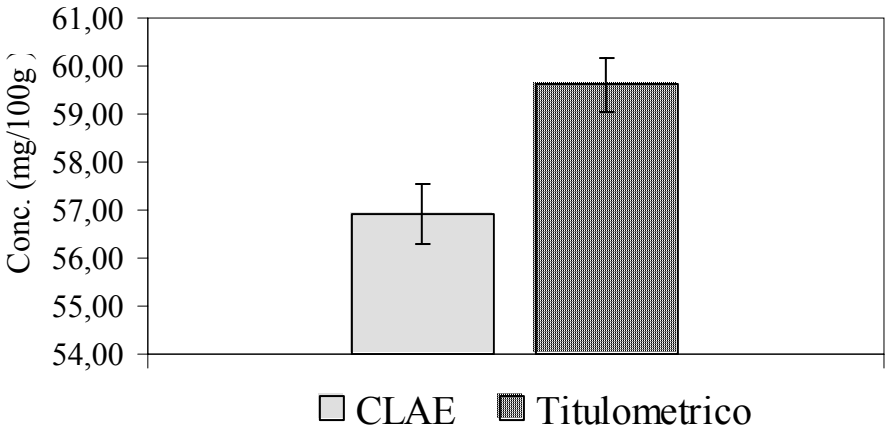


Gráfico 7: Comparação entre os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de troca iônica e por titulometria para análise de ácido ascórbico em matriz de suco de laranja. Barras verticais representam o erro padrão da média.

4.8.6 Ensaio de proficiência

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).

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 necessários em laboratórios de análise de alimentos, pois 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.

Ser aprovado em testes de proficiência é essencial na tentativa de assegurar a qualidade dos resultados de um método. O FAPAS® (*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- escore 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

σ = Valor alvo de desvio padrão

O critério estabelecido para classificar o resultado de um participante encontra-se discrimanado na Tabela 11:

Tabela11: Critérios de classificação do FAPAS.

|Z|	**Resultado**
$z < 2$	Satisfatório
$2 < z < 3$	Questionável
$z > 3$	Insatisfatório

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 (≤ 2).

O resultado obtido no 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 deste método rápido de análise de vitamina C por coluna de troca iônica.

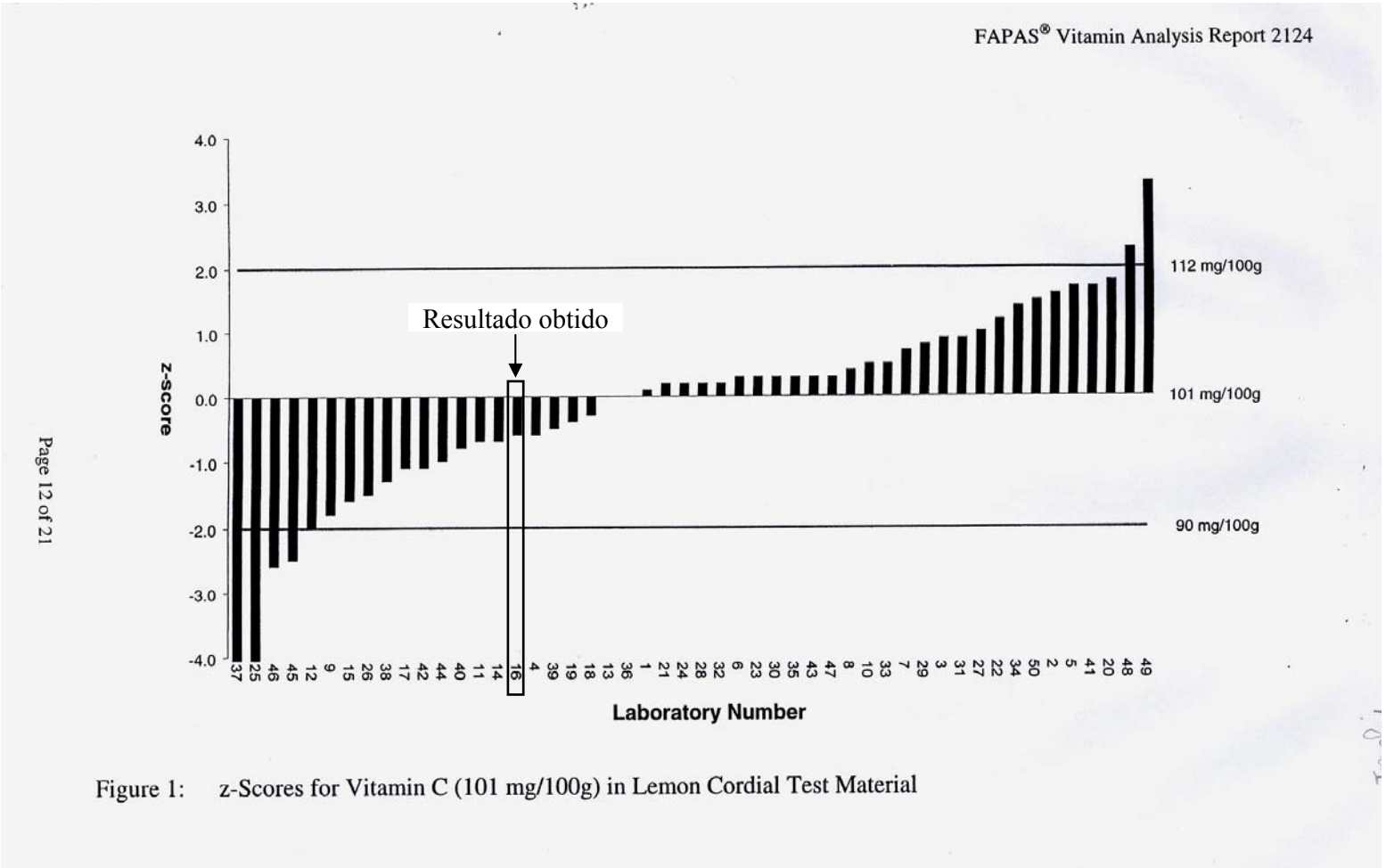


Figura 44: Gráfico de z-escore, resultado do ensaio interlaboratorial FAPAS® de vitamina C realizado em fevereiro de 2004. A altura da barra indica o valor de z-escore atingido pelo laboratório participante e a posição horizontal indica o distanciamento deste do valor certificado de 101 mg/100g.

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 permanência 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 à presença de interferentes redutores.

A validação do método com a variação sistemática de parâmetros como robustez, precisão, linearidade com avaliação de efeito de matriz, seletividade, limite de detecção e limite de quantificação deverá ser o próximo passo, 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 análise 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. **Portaria nº 41 de 14 de janeiro de 1998,** anexo A. Regulamento técnico para rotulagem nutricional de alimentos embalados. República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 de janeiro de 1998. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=82&word=> Acesso em: 06 ago. 2005.

ALI, M. S.; PHILLIPPO, E. T. Simultaneous determination of ascorbic, dehydroascorbic, isoascorbic and dehidroisoascorbic acids in meat-based food products by liquid chromatography with post column fluorescence detection: a method extension. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 3, p. 803-807, 1996.

ALMAGRO, I.; SAN ANDRES, M. P.; VERA, S. Determination of water-soluble vitamins in pharmaceitical preparations by reversed-phase liquid chromatography with a mobile phase containing sodium dodecylsulphate and n-propanol. **Chromatographia**, 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. **Talanta**, v. 58, p. 961-967, 2002.

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.

AQUINO, F. R. N.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 179p.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática.** 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 1999. 416p.

ARGIROV, O. K.; LIN, B.; OLENSEN, P.; ORTWERTH, B. J. Isolation and characterization of a new advanced glycation endproduct of dehydroascorbic acid and lysine. **Biochimia et Biophysica Acta**. v. 1620, p. 235-244, 2003.

ARONSON, J. K. Forbidden fruit. **Nature Medicine**, v. 7, n. 1, p. 29-30, 2001.

ASHOOR, SH.; WOODROW C. M.; WELTY J. Liquid chromatographic determination of ascorbic acid in foods. **J. AOAC**, 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.

Food Chemistry, v. 74, p. 133-137, 2001.

AUSTIN, S.; HITCHCOCK, C. The Linus Pauling – Mayo Clinic controversy involving vitamin C and cancer tests. **Nutrition Health Review**, 1995. Disponível em: < http://www.parentsurf.com/p/articles/mi_m0876/is_n71/ai_16535117>. Acesso em 06 ago. 2005.

AUSTRIA, R.; SEMENZATO, A.; BETTERO, A. Satability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis**, v. 15, p. 795-801, 1997.

BASU, T. K.; SCHORAH, C. J. **Vitamin c in health and desease**. Londres: AVI Pub. Co.,1982. 152p.

BEHRENS, W. A.; MADÈRE, R. Ascorbic acid, isoascorbic acid, dehydroascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in selected food products. **J. of Food Composition and Analysis**, 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. **J. of Micronutrient Analysis**, v. 1, p. 3-11, 1985.

BUSINES COMMUNICATION COMPANY. **World Market for Citric, Ascorbic & Isoascorbic Acids**., 2002, 151p.

CARPENTER, K. J. **The history of scurvy and vitamin C**. 8. ed. New York: Cambridge University Press,1966. 288p.

CARR, A. C.; FREI, B. Toward a new recommended dietary alloeance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. **Am. J. Clin. Nutr,** v. 69, n. 6, p. 1086-1107, 1999.

CECCHI, H. M. F**undamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2003. 207p.

CHANG, M.; CHANG, C. Simultaneous HPLC determination of hydrophilic whitening agents in cosmectic products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 617-626, 2003.

CHEFTEL, J. C.; CHEFTEL, H.; BESANÇON, P. **Introduccion a la bioquimica y tecnologia de los alimentos.** Tradução de Francisco López Capont. Zaragoza: Editorial Acribia, 1977. 404p.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. 606p.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**. São Paulo: Edgard Blucher, 2003. 192p.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. **Introdução a métodos cromatográficos**. 2. ed. Campinas: Editora Unicamp, 1987. 279**p.**

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. **Journal of Agric. and Food Chem.**, 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. **Analist**, 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. **Analytical Biochemistry**, 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. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, n. 7, p. 825-860, 2000.

DRISKO, J. A.; CHAPMAN, J.; HUNTER V. J. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. **Gynecologic Oncology**, v. 88, p. 434-439, 2003.

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. **Food Chemistry**, v. 52, p. 99-102, 1995.

FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme). Protocol – organization and data analysis. 6. ed., York, 2002, 42p.

FURUSAWA, N. Rapid high-performance liquid chromatographic identification and quantification of total vitamin C in fruit drinks. **Food Control**, v. 12, p. 27-29, 2000.

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. **Food Chemistry**, v. 68, p. 471-474, 2000.

GEIGERT, J.; HIRANO, D. S.; NEIDLEMAN, S. L. High performance liquid chromatographic method for the determination of L-ascorbic acid and D-isoascorbic acid. **J. of Chromatography**, v. 206, p. 396-399, 1981.

GHANI, A. G. A.; FARID, M. M.; CHEN, X. D. Theoretical and experimental investigation of thermal destruction of vitamin C in food pouches. **Computers and eletronics in agriculture**, v. 34, p. 129-143, 2002.

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. **J. Of Chromatography A**, v. 881, p. 309-316, 2000.

GÜÇLÜ, K.; SÖZGEN, K. TÜTEM, E.; ÖZYÜREK, M.; APAK, R.

Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper (II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals. **Talanta**, In Press, 2004.

HEMILÄ, H. Vitamin C and the common cold, **British J. Nutrition**, v. 67, n. 1, p. 1-16, 1992.

HEMILÄ, H. Vitamin C supplementation and common cold symptoms: factors affecting the magnitude of the benefit. **Medical Hypotheses**, v. 52, n. 2, p. 171-178, 1999.

HEMILÄ, H. Vitamin C supplementation and common cold symptoms: problems with inaccurate reviews. **Nutrition**, v. 12, n. 11/12, p. 804-809, 1996.

HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. **Food Chemistry**, In Press, 2005.

HIDIROGLOU, N.; MADÈRE, R.; BEHRENS, W. Electrochemical determinatio of ascorbic acid and isoascorbic acid in ground meat and in processed foods by high pressure liquid chromatography. **J. of Food Composition and Analysis**, v. 11, p. 89-96, 1998.

HYVER, K. J.; SANDRA, P. **High resolution gas chromatography**. 3. ed., Avondale: Hewlett-Packard Co., 1989. 320p.

INMETRO **(**Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial**)**. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008, março 2003, 35 p.

IVANOVIC, D.; POPOVIC, A.; RADULOVIC, D.; MEDENICA, M. Reversed-phase íon pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, p. 999-1004, 1999.

JEFFERY G. H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C. **Vogel: Análise química quantitativa.** 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-erythoascorbic acid. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 355, n. 1, p. 9-14, 1998.

JUPILLE, T.; GRAY, M.; BLACK, B.; GOULD, M. Ion moderated partition HPLC. **International Laboratory**, v. 11, n. 6, p. 84-89, 1981.

JUPILLE, T.; GRAY, M.; BLACK, B.; GOULD, M. Ion moderated partition HPLC. **International laboratory**, september, p. 84-89, 1981.

KABASAKALIS, V.; SIOPIDOU, D.; MOSHATOU, E. Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. **Food Chemistry**, v. 70, p. 325-328, 2000.

KLENNER, F. R. Observations on the dose and administration of ascorbic acid when

employed beyond the range of a vitamin in human pathology. **Journal of Applied Nutrition**, v. 23, n. 3-4, p. 61-88, 1971.

LAM, F.; HOLCOMB, I. J.; FUSARI, S. A. Liquid chromatographic assay of ascorbic acid, niancinamide, pyridoxine, thiamine and riboflavin in multivitamin-mineral preparations. **J. AOAC**, v. 67, n. 3, 1007-1011, 1984.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa.** São Carlos: Acta, 1993. 254p.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise.** 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. **Clinical Chemistry,** v. 50, n.1, p. 135–140, 2004.

LEE, J. S.; KIM, J. W.; HAN, S. H.; CHANG, I. S.; KANG, H. H.; LEEE, O. S.; OH, S. G.; SUH, K. D. The stabilization of L-ascorbic acid in aqeous solution and water-in-oil-in-water double emulsion by controlling de pH and electrolyte concentration. **J. Cosmet. Sci.**, v. 55, p. 1-12, 2004.

LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Posthaverst Biology and Technology**, v. 20, p. 207-220, 2000.

LEONG, L. P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**, v. 76, p. 69-75, 2002.

LESTER P.; FUCHS, J. **Vitamin C in health and desease**. New York: M. Dekker, 1997. 538p.

LINDSAY, S. **High performance liquid chromatography**. 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. **Phytochemistry**, 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. **Cereal Chem.**, 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. **Cereal Chem.**, v. 75, n. 2, p. 200-206, 1998.

MACRAE, R.; SCHWEIGERT, B. **HPLC in food analysis**. Hardbound, Academic Press, 1988. 340p.

McCAL, M. R.; FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in Humans? **Free Radical & Medicine**, v. 26, n. 7/8, p. 1034-1053, 1998.

MERCK & CO., INC. **The Index Merck**. 9. ed. Rahway: Merck & Co. inc.**,** 1976

MILLIPORE CORPORATION Manual do MilliQ Gradient A10
ASTM - **Standard specificacion for reagents water**. ASTM document. D 1193-91(2001).

MOSCA, L.; RUBENFIRE, M.; MANDEL, C.; TARSHIS, T.; TSAI, A.; PEARSON, T. Antioxidant nutrient suplementation reduces the susceptibility of low density lipoprotein to oxidation in patients with coronary artery disease. **J. American College of Cardiology**, v. 30, n. 2, p. 392-399, 1997.

MOSER, U.; BENDICH, A. Vitamin C. In: MACHLIN. L. J. **Handbook of vitamins**. 2. ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1991. p. 195-232.
NAIDU, K. A.Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. **Nutrition Journal**, v. 2, p.2-7, 2003.

NAKUMURA, J.; CSIKSZENTMIHALYI, M. Catalytic creativity, the case of Linus Pauling. **American Psychologist**, v. 56, n. 4, p. 337-341, 2001.

NORMAN, W. M. Vitamin C in the prevention of colds. **The Medical Journal of Australia**, v.2, n.26, p. 777-778, 1947.

NYE, M. J. Physical and biological modes of thought in the chemistry of Linus Pauling. **Stud. Hist. Phil. Mod. Phys.**, v. 31, n. 4, p. 475-491, 2000.

NYE, M. J. Science and political controversy. **Endeavour**, v. 23, n. 4, p. 148-154, 1999.

NYYSSONEM, K.; PIKKARAINEM, S.; PARVIAINEM, M. T.; HEINONEM, K. Quantitative estimation of dehydroascorbic acid and ascorbic acid by high performance liquid chromatography – application to human milk, plasma and leukocytes. **J. of Liquid Chromatography**, v. 11, n. 8, p. 1717-1728, 1988.

PACHLA, L. A.; REYNOLDS, D. L. Review of ascorbic acid methodology. **J. AOAC**, 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 eletrochemical detection. **Analytical Biochemistry**, v. 263, p. 176-182, 1998.

PAULING, L. Speech at natural foods exposition. **Natural Food Merchandiser**, June, p. 65, 1982.

PENTEADO, M. D. V. C. **Vitaminas – Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos.** São Paulo: Ed. Metha, 2003. 611p.

PÉREZ, A. G.; OLIÁS, R.; ESPRADA, J.; OLÍAS, J. M.; SANZ, C. Rapid determination of sugar, nonvolatile acids and ascorbic acid in strawberry and other fruits. **J. Agric. Food Chem.**, 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. **Lebensm.-Wiss. u.- Technol**, v. 36, p. 257-262, 2003.

PISCHETSRIEDER, M. Reaction of L-ascorbic acid with L-arginine derivatives. **J. Agric. Food. Chem**., v. 44, p. 2081-2085, 1996.

RAPISARDA, P.; INTELISANO, S. Sample preparation for vitamin C analysis of pigmented orange juices. Italian J. of **Food Science**, v. 8, n.3, p. 251-256, 1996.

RATH, M.; PAULING, L. Immunological evidence for the accumulation of lipoprotein in artherioesclerotic lesion of the hypoascorbemic guinea pig. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, n. 16, p. 6204-6207, 1990.

REIF, W. Linus Pauling: an ispirational and humane genius. **The Lancet**, v. 355, p. 415-416, 2000.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, C.S.F. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
RIZZOLO, A.; POLESELLO, A. HPLC assay of ascorbic acid in fresh and processed fruit and vegetables. **Food Chemistry**, 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. **Food Chemistry**, v. 77, p. 257-262, 2002.

ROIG, M. G.; RIVERA, Z. S.; KENNEDY, J. G. L. Ascorbic acid: an overview, **Int. J. Food Sci. Nutr**. 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 **Photochemistry and Photobiology**, v.031, p. 8655-8658, 2003.

SHARPLESS, K. E.; MARGOLIS, S.; THOMAS J. B. Determination of vitamins in food-matrix standard reference materials. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 171-181**,** 2000.

SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Quim. Nova**, v. 27, n. 2, p. 270-276, 2004.
SILVA, F. O. Total ascorbic acid determination in fresh squeezed orange juice by gas chromatography. **Food Control**, v. 16, p. 55-58, 2005.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 5. ed. Fort Worth: Saunders College Publishing, 1997. 849p.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2. ed. New York: Wiley-Interscience Publication, 1979. 896 p.

SOARES, B. G.; SOUZA, N. A.; PIRES, D. X. **Química orgânica: teoria e técnicas de preparação, purificação e identificação de compostos orgânicos**. Editora Guanabara, 1988. 322p.

SOLOMONS, T. W. G. **Organic chemistry**. 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. **J. Agric. Food Chem.**, v. 32, p. 352-355, 1984.

STONE, I. Fifty years of research on ascorbate and the genetics of scurvy **Orthomolecular Psychiatry**, v. 13, n. 4, p. 280, 1984.

STONE, I. Fifty years of research on ascorbate and the genetics of scurvy. **Orthomolecular Psychiatry**, v. 13, n. 4, p. 280-286, 1984.

STURM, K.; KORON, D.; STAMPAR, F. The composition of fruit of different strawberry varietiesdepending on maturity stage. **Food Chemistry**, v. 83, p. 417-422, 2003.

TERABE, S.; MARKUSZEWSKI, M. J.; INOUE, N.; OTSUDA, K.; NISHIOKA, T. **Pure and Applied Chemistry**, 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. **Food Chemistry**, v. 53, p. 43-50, 1995.

TRAN, M. T. T.; FARID, M. Ultraviolet treatment of orange juices. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 5, p. 495-502, 2004.

TRUSWELL, A. S. Ascorbic acid (letter). **New England Jornal of Medicine**, v. 315, p.709, 1986.

VECCHI, M.; KAISER, K. The gas chromatographic determination of ascorbic acid in the form of its trimethyl ether derivative. **J. of Chromatography A**, v. 26, p. 22-29, 1967.

VENDRAMINI, A. N.; TRUGO, L. C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 71, p. 195-198, 2000.

VERDINI, R. A.; LAGIER, C. M. Voltamétric iodometric titration of ascorbic acid with dead-stop end-point detection in fresh vegetables and fruit samples. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 2812-2817, 2000.

VINCI, G.; BOTRÈ, F.; MELE, G. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. **Food Chemistry**, v. 53, p. 211-214, 1995.

WEISS, S. M. The emerging acceptance and importance of alternative medical therapies. **Cancer Control Journal**, 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. **J. AOAC**, v. 66, n. 6, p. 1377-1379, 1983.

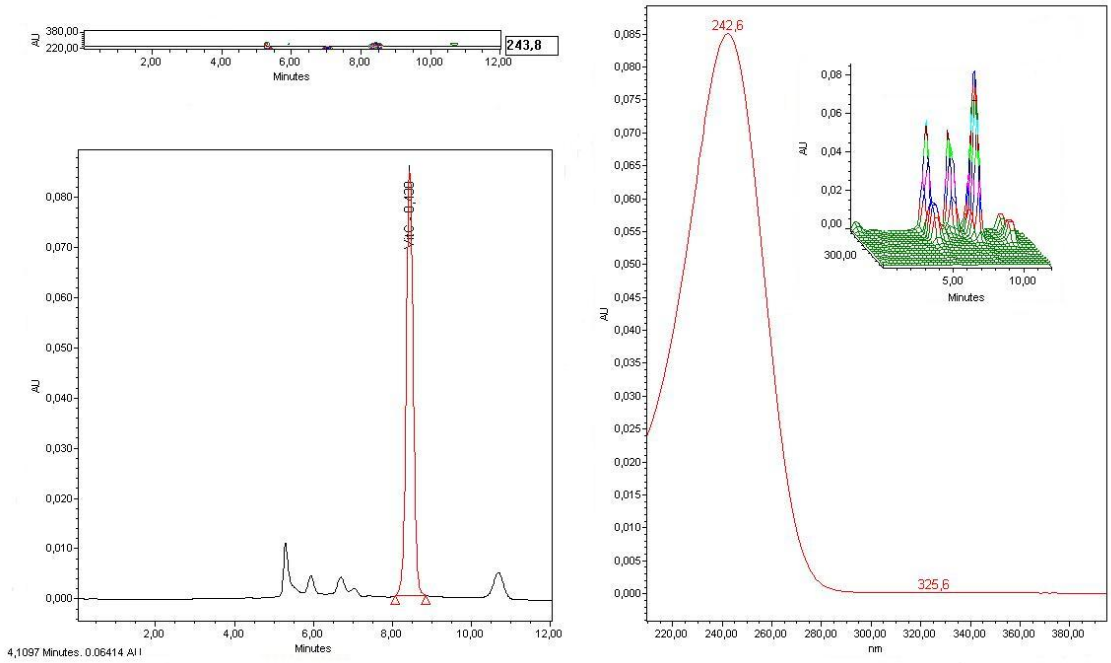
WIMALASIRI, P.; WILLS, R. B. H. Simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fruit and vegetables by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 256, p. 368-371, 1983.

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. **Lebensm.-Wiss. u.- Technol**, v. 34, p. 452-457, 2001.

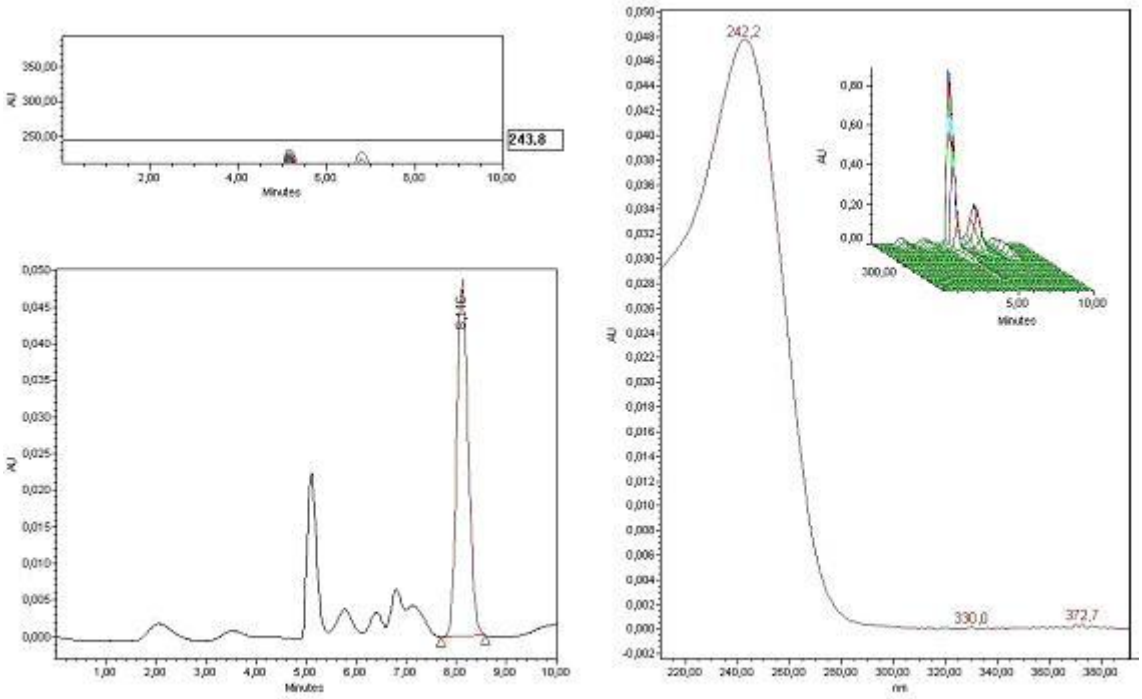
YARDIM-AKAYDIN, S.; ÖZKAN, Y.; ÖZKAN, E; TORUN, M.; SIMSEK, B. The role of plasma thiol compounds and antioxidant vitamins in patients with cardiovascular diseases. **Clinica Chimica**, v. 338, p. 99-105, 2003.

7. ANEXO

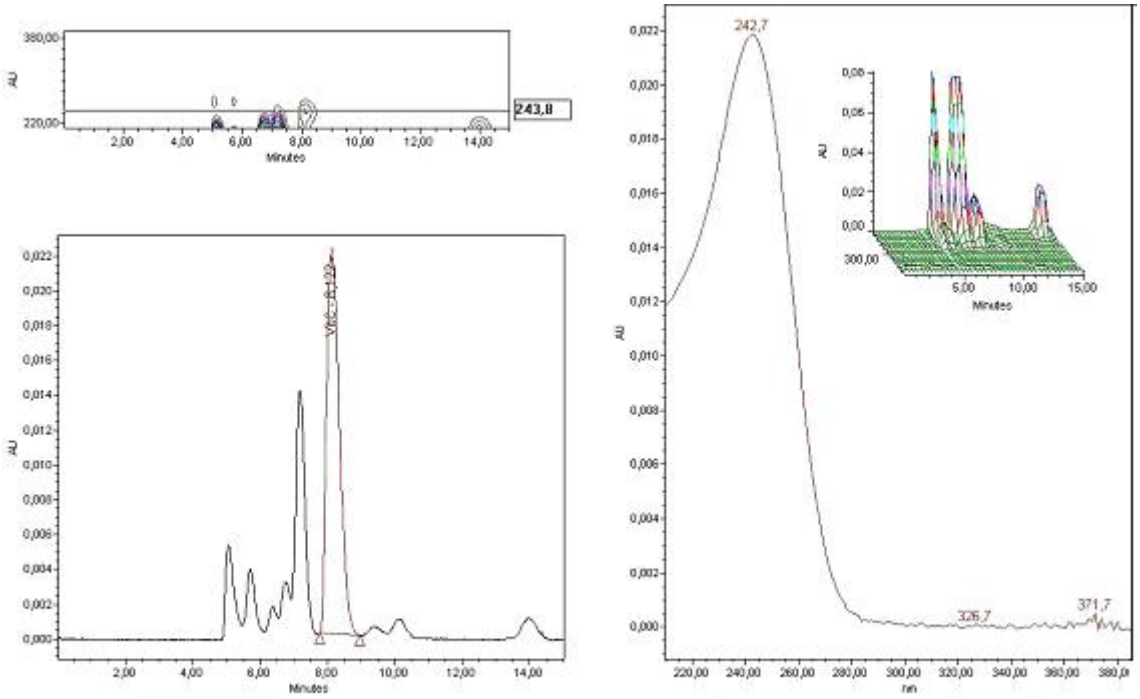
Cromatograma e espectros de uma amostra de tomate.



Cromatograma e espectros de uma amostra de batata.



Cromatograma e espectros de uma amostra de mandioca.



Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo