

Otimização de metodologia colorimétrica para a determinação de ácido ascórbico em geleias de frutas

Optimization of a colorimetric method to determine ascorbic acids in fruit jelly

Raquel Grando de OLIVEIRA^{1*}, Helena Teixeira GODOY¹, Marcelo Alexandre PRADO¹

Resumo

A metodologia indicada pela AOAC para a determinação de Vitamina C em sucos e preparados emprega uma titulação com o indicador 2,6-diclorofenol-indofenol. Esta técnica apresenta dificuldades quando são analisadas amostras com intensa coloração. Tendo em vista a necessidade de uma metodologia mais adequada para estas amostras, foram feitas modificações no método tradicional e sua eficácia foi comprovada. Testes comparativos foram realizados entre a metodologia original, a modificada e um método cromatográfico. Seis diferentes geleias de frutas foram analisadas e as modificações propostas foram satisfatórias, ao passo que os resultados foram mais semelhantes aos obtidos pelo método cromatográfico. O sistema apresentou-se linear, repetitivo (desvio padrão de 2,50%), com alta recuperação (102,10%), e uma economia de 92,88% de reagentes foi realizada. Foram encontradas concentrações entre 0 a 6,08 mg de ácido ascórbico por 100 g de amostra.

Palavras-chave: ácido ascórbico; 2,6-diclorofenol-indofenol; geleias.

Abstract

The AOAC standard methodology for determination of vitamin C in juices and preparations employs a titration with the indicator 2,6-di-chlorophenol-indophenol. This technique presents difficulties when samples with intense coloration are analyzed. Considering the need for a more adequate methodology to deal with these samples, adaptations of the traditional method were performed and their efficacy was verified. Comparative tests were performed on the standard methodology, the modified methodology and the chromatography method. Six different jelly fruits were analyzed and the proposed modifications were considered satisfactory, because these results were closest to the chromatographic results. The system proved to be linear, repeatable (standard deviation of 2.50%), with high recovery (102.10%) and an economy of 92.88% of reagents was achieved. Concentrations were between 0 to 6.08 mg of ascorbic acid per 100 g of sample.

Keywords: ascorbic acids; 2,6-dichlorophenol-indophenol; methodology.

1 Introdução

Em 1937, Albert Von Szent Györgyi ganhou o prêmio Nobel pela descoberta de um composto capaz de curar o escorbuto, uma enfermidade comum na época; este composto é conhecido como ácido ascórbico (AA). Apesar de apresentar características nutricionais, atualmente o interesse por esse ácido está voltado à sua capacidade antioxidante (BARATA-SOARES et al., 2004; NEVES et al., 2008). No organismo humano, essa característica está relacionada à captura de radicais livres tóxicos e outras espécies reativas de oxigênio, substâncias que estão associadas com diversos danos e doenças, como doenças cardiovasculares, certas complicações pré-natais, tumores malignos, inflamações, catarata, mal de Parkinson e Alzheimer, bem como aceleração do processo de envelhecimento celular (SIKORA; CIESLIK; LESZCZYNSKA, 2008). O AA atua ainda junto à formação de tecido conjuntivo e transporte de íons (BARATA-SOARES et al., 2004). Casos de toxicidade envolvendo a ingestão de vitamina C são poucos, uma vez que se trata de uma vitamina hidrossolúvel e é regularmente excretada pelo corpo, no entanto, doses excessivas podem estar relacionadas a cálculos renais e, em casos

mais raros, à anemia, causada pela interferência na absorção de vitamina B₁₂ (WOLKOFF, 2004).

Grande parte do suprimento de AA da dieta humana é proveniente de frutas e vegetais, (BARATA-SOARES et al., 2004; LOPEZ et al., 2005; ISHIKAWAL et al., 2006). O teor desta vitamina nos alimentos pode variar bastante de acordo com o plantio, incidência solar, estágio de maturação, manuseio pós-colheita, entre outros (ARRIGONI; TULLIO, 2002; LOPEZ et al., 2005; CORDENUNSI et al., 2002). Kulkani e Aradhya (2005) analisaram a concentração de AA em romã (*Punica granatum*) durante os estágios de maturação e verificaram uma diminuição no teor deste ácido e no teor de fenólicos em contraposição a um aumento de açúcares totais e antocianinas (KULKARNI, 2005).

Yamashita et al. (2003) analisaram a estabilidade do AA presente em acerola (*Malpighia glabra*) frente a processos industriais e verificaram que a degradação foi proporcional à temperatura empregada, isto é, quanto maior a temperatura, maior foi a perda de AA do meio (YAMASHITA et al., 2003). A incidência de luz, a presença de oxigênio e de compostos

Recebido para publicação em 8/5/2008

Aceito para publicação em 25/9/2009 (003477)

¹ Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, CEP 13083-862, Campinas – SP, Brasil, E-mail: rgrando@gmail.com

*A quem a correspondência deve ser enviada

metálicos e a atividade de água alta também podem acelerar reações de oxidação, que favorecem a degradação (GABAS; TELIS-ROMERO; MENEGALLI, 2003). Além da perda nutricional, essa degradação é muitas vezes responsável por uma importante alteração durante a estocagem de alimentos, limitando sua vida de prateleira através da formação de compostos intermediários, como o furfural (AL-ZUBAID; KHALIL, 2007). Processamentos de alimentos contendo AA devem, então, ser realizados de modo a evitar tais degradações. (AL-ZUBAID; KHALIL, 2007).

Há muitos métodos que permitem a identificação e a quantificação de AA. Os métodos biológicos foram os primeiros a serem desenvolvidos e foram utilizados inicialmente para determinar a quantidade necessária para se prevenir o escorbuto. Como são métodos demorados, de alto custo e pouco repetitivos, foram perdendo campo e são pouco utilizados na atualidade. Hoje os métodos químicos são os mais empregados (ALDRIGUE, 1998; EMADI-KONJIN et al., 2005).

Tilmans (1927), citado por Aldrigue (1998), foi o responsável por desenvolver a metodologia colorimétrica mais empregada atualmente. Trata-se de uma titulação utilizando o indicador 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFI). Neste método, o AA reduz o DCFI a uma solução incolor e, no ponto final da titulação, o excesso do indicador não reduzido confere à solução ácida uma coloração rosa, o que facilita a visualização do ponto final a olho nu, mas este também pode ser verificado eletrometricamente ou fotometricamente (ALDRIGUE, 1998). Esta é uma técnica de fácil aplicação e baixo custo, principalmente quando comparada à técnica cromatográfica, por exemplo. O uso do DCFI é de grande frequência, tanto para a análise de produtos alimentícios quanto para produtos farmacêuticos, além de ser utilizado como base de comparação para novas metodologias. Esta técnica é ainda aquela indicada pela AOAC, 1997 (*Association of Official Analytical Chemists*) para a determinação da vitamina C em preparados e sucos de frutas.

Aldrigue (1998) avaliou diversos modos de se determinar vitamina C em polpa de acerola: a) método espectrofotométrico, descrito por Contreas-Gúzman et al. (1984); b) método volumétrico do Iodato de Potássio, que se fundamenta na redução do iodo liberado por uma solução de AA; c) método de Tilmans, que utiliza o DCFI; e d) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Quando comparou em porcentagem a recuperação do AA às amostras de acerola, o autor verificou que o método de Tilmans foi aquele que mais se aproximou dos dados obtidos para CLAE, considerando-o então, o mais eficiente para a determinação de AA nestas amostras (ALDRIGUE, 1999).

Apesar da eficiência, o método de Tilmans apresenta dificuldades quando são analisadas amostras de intensa coloração, como no caso de frutas, geleias, sucos e outros. A coloração natural da amostra dificulta a visualização do ponto final (ALDRIGUE, 1999; JAIN; GHOURASIA; VERMA, 1995). O presente trabalho visou desenvolver e quantificar a vitamina C presente em algumas geleias de frutas com intensa coloração. Modificações no método original foram propostas e os resultados foram comparados entre si e também entre os resultados obtidos por CLAE.

2 Materiais e métodos

Foram utilizadas amostras de 10 geleias diferentes, cedidas pelo fornecedor Klaus J. G. Bouillon ME: acerola com morango (A), laranja (B), rosela (C), acerola com goiaba (D), acerola com rosela (E), acerola com maná (F), acerola com maracujá (G), acerola (H), acerola com banana (I) e goiaba com rosela (J).

Foram utilizados ácido l-ascórbico da marca Synth, brometo de hexadecil-trimetil amônio (citrimida) da Sigma, 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFI) da Fluka, fosfato de sódio anidro, acetato de sódio cristalino e ácido ortofosfórico da Merck e EDTA da Reagen.

Logo após o recebimento, as amostras foram armazenadas sob refrigeração em frascos de coloração âmbar. As extrações foram realizadas individualmente e imediatamente antes das titulações, de modo a minimizar a exposição a agentes degradantes.

A metodologia original (método I) foi realizada segundo o indicado pela AOAC (967.21): 0,5 g de amostras foram homogeneizadas em 50 mL de ácido metafosfórico 1% por 3 minutos. A solução resultante foi titulada com DCFI (50 mg de DCFI e 20 mg de bicarbonato de sódio em 100 mL de água destilada). O indicador DCFI foi padronizado com 10 mL de uma solução padrão de 10 mg.100 mL⁻¹ de ácido l-ascórbico. O ponto final da titulação foi definido no momento em que a solução titulada apresentou coloração rosa, reservando-se um período de 15 segundos para a confirmação do ponto de viragem.

Para o cálculo da quantidade de AA presente na amostra, foi aplicada a Equação 1:

$$C = \frac{V \times f \times 100}{m} \quad (1)$$

sendo que (Equação 2),

$$f = \frac{10 \times c}{p} \quad (2)$$

Em que “C” é a quantidade de AA (mg) presente em 100 g de amostra, “p” é o volume (mL) gasto de indicador – DCFI que reage com 10 mL de uma solução padrão de AA cuja concentração é “c” (mg.mL⁻¹). “V” é o volume (mL) de indicador – DCFI utilizado na titulação do extrato de amostra e “m” é a quantidade de amostra (g) utilizada na extração.

A metodologia desenvolvida no presente estudo (método II) utilizou 0,5 g de amostra homogeneizada em 50 mL de ácido metafosfórico 1%. Esta solução foi centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm, e o sobrenadante resultante foi usado para titular uma solução de 2 mL de indicador DCFI e 18 mL de água destilada. O ponto final da titulação foi definido no momento em que a solução titulada apresentou coloração idêntica à solução titulante (amostra diluída em ácido metafosfórico e centrifugada), reservando-se um período de 15 segundos para a confirmação do ponto de viragem.

Para o cálculo da quantidade de AA presente na amostra, foi aplicada a Equação 3:

$$C = \left(\frac{p \times c \times 50}{V \times m} \right) \times 100 \quad (3)$$

Em que “C” é a quantidade de AA (mg) presente em 100 g de amostra, “p” é o volume (mL) gasto de solução padrão de AA, cuja concentração é “c” (mg.mL⁻¹) na padronização do DCFI. “V” é o volume (mL) de extrato de amostra utilizado durante a titulação e “m” é a quantidade de amostra utilizada na extração.

Para a determinação por CLAE (método III), foi utilizado o equipamento da Hewlett-Packard série 1050 com DAD a 265 nm, com coluna Waters Spherisolb ODS-2 (250 × 4,6 mm). A fase móvel apresentou 2,3 mmol.L⁻¹ de citrimida, 2,5 mmol.L⁻¹ de EDTA sódico, 80 mmol.L⁻¹ de fosfato de sódio anidro dibásico e 20 mmol.L⁻¹ de acetato de sódio, ajustado para pH 4,5 com ácido ortofosfórico, e vazão de 0,8 mL.min⁻¹. Método desenvolvido e validado pelos autores (dados ainda não publicados).

3 Resultados e discussão

O estudo, inicialmente, buscava apenas verificar a quantidade de AA presente nas amostras de geleias de frutas através da metodologia indicada pela AOAC, 1997, porém, durante o decorrer das análises, houve dificuldade em se utilizar esta metodologia para amostras de intensa coloração. Outro problema foi quanto à necessidade de extração das amostras, uma vez que se trata de amostras sólidas e a metodologia inicial foi desenvolvida para alíquotas líquidas (sucos e preparado).

Como a vitamina C é um composto de grande instabilidade frente à temperatura, luz e também ao oxigênio, para resultados precisos, é necessário que os agentes degradantes tenham sua ação minimizada. As amostras foram armazenadas sob refrigeração (aproximadamente 4 °C), em frascos âmbar bem vedados e com ausência de luz. A extração foi realizada imediatamente antes da titulação e as análises procederam em ambiente com pouca luz.

A metodologia indicada pela AOAC, 1997 prevê o uso de ácido oxálico como solução extratora, porém Aldrigue (1998), em seu estudo, verificou que a extração do AA é mais eficiente quando se utiliza o ácido metafosfórico em substituição ao ácido oxálico ou apenas água. O ácido metafosfórico apresenta ainda a capacidade de precipitar proteínas e inativar enzimas do grupo oxidase. Deste modo, no presente estudo foi empregada a extração do composto utilizando uma solução de ácido metafosfórico 1%. Aldrigue (1998) verificou também que quanto maior o tempo no qual a solução extratora entra em contato com a amostra, menor é a quantidade de AA detectada; fato que pode ser explicado pela alta instabilidade que a vitamina apresenta. Alto tempo de agitação pode favorecer a extração da vitamina da matriz, porém favorece também a degradação dessa vitamina.

Em um primeiro ensaio foi adicionando o ácido metafosfórico 1% a 0,5 g de amostra e essa solução foi agitada manualmente, porém a amostra não se solubilizou totalmente, o que impede a eficiência do processo. A extração utilizando um ultrassom se mostrou mais adequada. Para evitar maiores degradações, um curto período de extração foi proposto (3 minutos). Logo após este processo a solução foi titulada.

Aydogmus e Cetin (2002) observaram que, apesar da determinação de AA por DCFI ser um método frequentemente utilizado e obter resultados rápidos, o reagente tem baixa estabilidade, o que pode gerar resultados errôneos após longo período de preparo. Deste fato, surgiu a necessidade de se realizar uma padronização do DCFI antes de seu uso. A cada dia de trabalho uma nova padronização foi realizada, evitando erros devidos a esta degradação. O valor obtido na padronização variou significativamente de um dia para outro, chegando a 20%, evidenciando a necessidade de tal procedimento.

Como previsto anteriormente, as determinações de AA segundo a metodologia I apresentaram dificuldade de visualização do ponto final da reação, principalmente para as geleias de intensa coloração rosa. A mudança da cor natural da amostra para uma coloração rosada foi, por muitas vezes, sutil, sendo que, quanto maior é a intensidade da cor natural da amostra, maior também é a dificuldade. Um maior excesso de indicador DCFI foi necessário para que o ponto de viragem pudesse ser detectado visualmente, o que gera uma titulação com ponto de viragem mascarado. Ainda em relação ao ponto de viragem, a metodologia indica que a cor rosada deve permanecer por 15 segundos após sua detecção do ponto final, devido ao tempo de reação do DCFI com o AA. Em várias amostras, a coloração permanecia durante estes 15 segundos, mas, após mais alguns segundos, desaparecia, gerando dúvidas sobre o ponto final da reação.

Outro problema na análise que utiliza a metodologia I diz respeito a amostras com pequenas quantidades de AA. Estas utilizam um baixo volume de DCFI, chegando até a 0,3 mL, volume muito baixo para uma titulação em bureta. Esta observação implica que, para um volume maior de DCFI, é necessário utilizar maiores quantidades de amostras.

Tendo em vista que a mudança de uma coloração rosa para uma coloração incolor poderia facilitar a visualização do processo, inverteu-se a titulação, desenvolvendo-se a metodologia II. Neste caso, a amostra foi colocada na bureta utilizada para a titulação e o reagente DCFI foi adicionado em um erlenmeyer, juntamente com água. A única alteração referente à preparação da amostra em relação ao procedimento anterior foi a inclusão de uma centrifugação após a etapa de extração em ultrassom, com a finalidade de retirar maiores sedimentos que pudessem provocar entupimento da bureta.

Neste método modificado, o ponto final da reação teve sua visualização significativamente facilitada: a coloração da solução titulada (DCFI + água) apresentou-se roxa, e, após algumas gotas de amostra (solução titulante), a coloração passou a ter um tom rosa intenso que foi clareando à medida que se adicionava amostra. O AA contido na amostra reduz o DCFI tornando-o incolor. No momento em que a coloração da solução titulada apresentar a mesma coloração da amostra titulante, não há mais DCFI para ser reduzido, ou seja, foi atingido o ponto final da análise. Esta nova forma de visualizar o ponto final da análise é vantajosa, uma vez que a cor final da solução titulada é a mesma da solução titulante, presente na bureta.

Amostras com colorações iniciais rosa intenso continuaram apresentando dificuldades de visualização do ponto final da

reação a olho nu mesmo após estas modificações, como é o caso da amostra C, mas também sua visualização do ponto final no método I foi impraticável.

Após a verificação da eficiência do método em facilitar a visualização do ponto final da titulação, sua linearidade foi avaliada frente à variação da quantidade de DCFI empregada, considerando uma solução de ácido ascórbico de concentração fixa. Na Figura 1 é possível observar que o sistema apresentou uma linearidade indiscutível, no ponto que o coeficiente de correlação (R^2) tem valor de 0,99. A quantidade de solução de AA necessária para a titulação aumentou proporcionalmente ao aumento da quantidade de DCFI. Esta proporção está intimamente ligada à quantidade de ácido ascórbico que 1 mL de DCFI que é capaz de reagir com 1 mg de AA. O coeficiente angular da curva analítica obtida no teste de linearidade é justamente essa razão entre AA e DCFI. Como consequência, extingue-se a necessidade da construção de uma curva analítica para a quantificação de AA nas amostras, sendo necessária apenas a padronização da solução de DCFI com uma solução conhecida de AA. Este cálculo pode ser simplificado pela Equação 3. O resultado desta análise também permite que a quantidade de DCFI utilizada na análise possa ser variada com segurança, o que confere maior versatilidade ao sistema.

É importante observar também que essa Equação 3 traz como incógnita o volume de amostra utilizado na titulação e essa incógnita está situada no denominador da Equação, assim, quando a curva analítica de volume titulado versus concentração de AA na amostra é construída, obtém-se uma Equação da ordem de $y = a/x$. Para essa Equação, novamente a linearidade é obtida, tendo-se como coeficiente de correlação o valor de 0,99 (Figura 2).

Durante o desenvolvimento da metodologia II, verificou-se que a solução titulada deve apresentar um volume constante no erlenmeyer para que o método apresente repetibilidade aceitável. Ao variarmos a quantidade de DCFI, mantendo a quantidade de água fixa (por exemplo, 2 mL de DCFI com 18 mL de água e 5 mL de DCFI com os mesmos 18 mL de água), foi obtido um erro de até 9% entre as replicatas de uma mesma amostra. Quando o mesmo estudo foi realizado mantendo-se

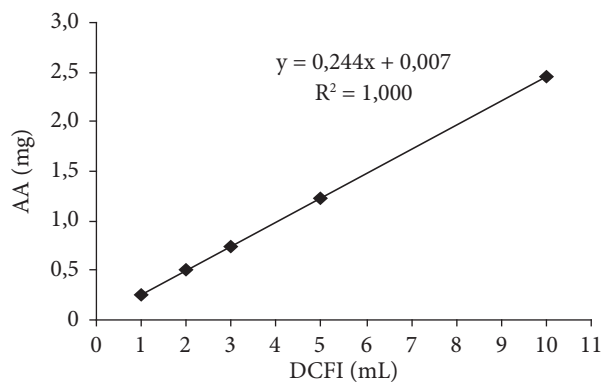


Figura 1. Quantidade de ácido ascórbico analisada de acordo com a quantidade de DCFI utilizada.

um volume fixo de solução titulada (2 mL de DCFI + 18 mL de água e 5 mL de DCFI + 15 mL de água), as replicatas de uma mesma amostra tiveram erro mais baixo. (2,51%)

Em análises preliminares, amostras com baixa concentração de AA utilizaram maior quantidade de solução titulante (amostra extraída), dificultando em parte a visualização do ponto final da reação, uma vez que a cor rosada apresentada, quando ainda há DCFI no reduzido da solução, ficou extremamente diluída. Este problema pode ser facilmente resolvido aumentando-se a concentração de amostra ou diminuindo-se a quantidade de DCFI. Esta última opção é a mais fácil de ser realizada, embora a amostra já tenha sido extraída e a concentração após a extração possa ocasionar perdas significativas na quantidade de AA. Esta alteração na quantidade de DCFI usada na análise pode ser facilmente realizada no método II, diminuindo-se os 2 mL empregados. Já para o método I, seria necessário realizar uma diluição do DCFI, alterando sua concentração.

Foi verificada também a resposta da metodologia frente à variação na quantidade de AA. Neste teste, fixou-se a quantidade de 2 mL de DCFI e 18 mL de água e variou-se a quantidade de AA em solução. Como a quantidade de DCFI é constante, a quantidade de AA titulada é a mesma, variando então apenas o volume utilizado para cada diluição. Os resultados apresentaram um desvio padrão de 3,27%, confirmando a eficiência do método em determinar várias quantidades de AA em amostras, não importando sua concentração.

A repetibilidade do método também foi verificada. Titulou-se uma mesma solução de 3 mg.100 mL⁻¹ de AA e outra de 10 mg.100 mL⁻¹ de AA por 10 vezes. Os resultados apresentaram apenas 1,14 e 1,5% de erro, respectivamente. Para a amostra, a repetibilidade foi avaliada repetindo-se por 10 vezes a amostra “E” e um desvio padrão de 2,51% foi encontrado.

A amostra “A” demonstrou ter maior quantidade de AA que as amostras “E” e “I” e, assim, para titular 2 mL de DCFI foi necessário um volume de 6,90 mL de extrato. A amostra “I”, no entanto, apresenta uma baixa quantidade de AA, necessitando

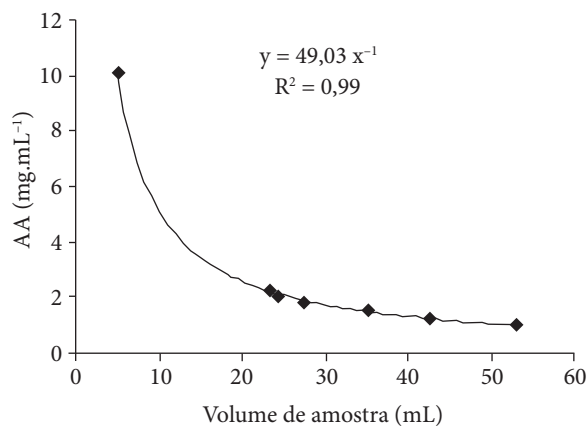


Figura 2. Variação do volume de amostra titulado pelo método II versus concentração presente de AA na mesma amostra.

Tabela 1. Concentrações e desvios de AA em mg.g⁻¹ de amostra segundo as metodologias empregadas.

Amostra	Padrão	Adaptado	CLAE
A	1,88 ± 0,00	2,10 ± 0,00	3,29 ± 0,06
B	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C	2,88 ± 0,09	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
D	2,03 ± 0,00	2,00 ± 0,03	2,97 ± 0,02
E	1,59 ± 0,01	1,93 ± 0,09	3,20 ± 0,00
F	1,86 ± 0,01	1,72 ± 0,00	2,74 ± 0,09
G	2,91 ± 0,05	3,15 ± 0,05	3,81 ± 0,04
H	1,92 ± 0,07	4,49 ± 0,05	6,08 ± 0,09
I	0,77 ± 0,02	1,01 ± 0,01	1,23 ± 0,01
J	0,32 ± 0,01	0,33 ± 0,00	1,61 ± 0,03

de grande volume de extrato (17,80 mL). Para as amostras em questão, a quantidade de DCFI não necessitou ser alterada, uma vez que foi preparado um extrato de 50 mL para cada amostra.

Diante dos ensaios anteriores, análises das amostras de geleias de frutas foram realizadas em triplicatas. A média dos resultados obtidos e o desvio padrão correspondente para cada amostra podem ser visualizados na Tabela 1.

Para verificar estatisticamente qual a melhor metodologia a ser empregada para as amostras em questão, foi aplicado aos dados o Teste “t” de *Student*. Além de serem comparados entre si, os métodos I e II foram comparados ao método III. Por se tratar de uma técnica instrumental validada, as análises por CLAE podem ser consideradas mais precisas que as realizadas por métodos de bancada e estão sujeitas a menores erros do operador e instrumentação, além de menor susceptibilidade a agentes degradantes, uma vez que ocorrem em um sistema fechado, com ausência de luz. Os resultados deste teste podem ser observados na Tabela 1.

Todos os métodos de determinação de vitamina C indicaram a presença deste composto na amostra “A”. O teste “t” verificou que os resultados obtidos no método I foram iguais ao método II, porém, ambos os métodos diferem do método III. Este mesmo comportamento pode ser observado para as amostras “D” e “F”.

A amostra “B” apresentou uma quantidade muito baixa de vitamina C, tanto para o método I como para o II, porém em quantidades diferentes entre si e também em comparação com o método III. Entre os métodos que empregam o reagente DCFI, o segundo foi aquele que mais se aproximou dos resultados obtidos pelo método cromatográfico.

No caso da amostra “C”, pode-se verificar como a coloração rosa de uma amostra interfere significativamente na eficácia do método I. O ponto final da titulação foi mascarado pela coloração, uma vez que foi necessário grande excesso de DCFI para ser verificado o ponto de viragem. Este fato foi minimizado no método II. O teste estatístico indicou que todas as respostas são diferentes entre si, porém o método III retornou valores nulos para a quantidade de AA encontrada e também para a

variância. Observando os valores, fica claro que o método II se aproxima mais do método III do que o método I. Com isso, para esta amostra, o método II também foi mais eficiente que o método I.

As amostras “E”, “G”, “H” e “J” apresentaram comportamentos parecidos com o da amostra “C”, uma vez que as quantidades de ácido ascórbico diferiram entre si, porém os valores indicados no método II foram mais próximos dos resultados do método III do que os do método I.

Para a amostra J, os resultados do método I e II apresentaram-se semelhantes segundo o teste estatístico, porém, apenas o método II mostrou-se semelhante ao método III.

Em resumo, a partir das observações feitas para cada teste estatístico, pode-se inferir que o método II traz vantagens para a maioria das análises de amostras com intensa coloração analisadas, quando comparado com o método I, uma vez que se aproxima mais do método utilizado como padrão de comparação (método III). Mas também se pode verificar que ambos os métodos ainda não apresentaram resultados equivalentes ao método III.

Outra vantagem do método II é a menor utilização do reagente DCFI, ou seja, houve uma menor geração de resíduos em relação ao método I. Se compararmos a quantidade utilizada para a determinação de vitamina C em todas as amostras do presente estudo, foi necessário em torno de 281 mL de solução de DCFI para o método I, enquanto o método II usou apenas 20 mL, ou seja, uma economia de aproximadamente 93 % de solução de DCFI.

Quanto ao resíduo gerado pelos testes, os extratos de amostra não utilizados são apenas soluções ácidas que podem ser descartadas após neutralização, assim, o resíduo a ser tratado com maior ênfase consiste nas soluções que apresentam DCFI. Para o método II, este volume é, em média, 25 ml por replicata; já no método I, este resíduo fica em torno de 55 ml. A menor produção de resíduos também consiste em uma vantagem do método II.

4 Conclusões

O método desenvolvido no presente estudo demonstrou ser confiável e apresentou vantagens quando comparado com o método original indicado pela AOAC, 1997, quando ambos são comparados ao método cromatográfico. A quantidade de reagentes utilizados no método desenvolvido diminuiu consideravelmente em relação ao anterior, diminuindo também a quantidade de resíduo gerado. A avaliação da eficiência da metodologia foi realizada de modo que sua repetibilidade foi satisfatória para a amostra e soluções de padrões individuais. A quantidade de vitamina C encontrada nas geleias variou de 0 a 6,08 mg de ácido ascórbico por grama de amostra. Pode-se afirmar que o objetivo do presente trabalho foi concluído, de modo que a determinação empregando o indicador DCFI foi facilitada, permitindo que amostras de intensa coloração fossem analisadas com maior precisão, porém ainda há problemas quando se analisam amostras de coloração rosa intenso.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao fornecedor Klaus J. G. Bouillon ME por conceder gentilmente as amostras de geleia de frutas para o presente estudo e à Capes o financiamento dos estudos.

Referências bibliográficas

- ALDRIGUE, M. L. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica, utilizando a CLAE, para determinação de vitamina C em frutas e seus principais produtos**. Campinas, 1998. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.
- AL-ZUBAIDY, M. M. I.; KHALIL, R. A. Kinetic and prediction studies of ascorbic acid degradation in normal and concentrate local lemon juice during storage. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 254-259, 2007.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the AOAC**. Washington, 1997. p. 16-17. (v. 2)
- ARRIGONI, O.; TULLIO, M. Ascorbic acid: much more than an antioxidant. **Biochemical et Biophysical Acta**, v. 1569, n. 1, p. 1-9, 2002.
- AYDOGMUS, Z.; CETIN, S. M. Determination of Ascorbic Acid in Vegetables by Derivative Spectrophotometry. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 697-704, 2002.
- BARATA-SOARES, A. D. et al. Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 3, p. 147-154, 2004.
- CORDENUNSI, B. R. et al. Influence of cultivar on quality parameters and chemical: composition of strawberry fruits grown in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2581-2586, 2002.
- EMADI-KONJIN, P. et al. Measurement of intracellular vitamin C levels in human lymphocytes by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC). **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 450-456, 2005
- GABAS, A. L.; TELIS-ROMERO, J.; MENEGALLI, F. C. Cinética de degradação do ácido ascórbico em ameixas liofilizadas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, supl., p. 66-70, 2003.
- JAIN, A.; GHOURASIA, A.; VERMA, K. K. Determination of Ascorbic acid in Soft Drinks, Preserved fruit juices and pharmaceuticals by flow injection spectrophotometry: matrix absorbance correction by treatment with sodium hydroxide. **Talanta**, v. 42, n. 6, p. 779-787, 1995.
- LOPEZ, A. et al. Quantification of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Fresh Olives and in Commercial Presentations of Table Olives. **Food Science and Technology International**, v. 11, n. 3, p. 199-204, 2005.
- NEVES, L. C. et al. Dano de frio em limas-cidas tahiti, colhidas em diferentes pocas e submetidas a tratamentos trmicos e bioquímicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 377-384, 2008.
- SIKORA, E.; CIESLIK, E.; LESZCZYNSKA, T. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 55-59, 2008.
- WOLKOFF, D. B. **Estudo da estabilidade de repositores hidroeletrólitos formulados à base de sucos clarificados de acerola e caju**. Campinas, 2004. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.
- YAMASHITA, F. et al. Produtos de acerola: estudo da estabilidade de vitamina C. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 92-94, 2003.