



## METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM SUCOS DE CITRUS UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

*J.D. Bresolin<sup>1</sup>, S.Z. Hubinger<sup>1</sup>*

(1) Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP, joana.bresolin@embrapa.br, silviane.hubinger@embrapa.br

**Resumo:** O ácido L-ascórbico (vitamina C), composto encontrado na natureza em frutas e hortaliças, é muito utilizado como indicador da qualidade dos alimentos de origem vegetal durante seu processamento e armazenamento. As metodologias tradicionais utilizadas para a quantificação deste composto em matrizes de origem vegetal são baseadas em colorimetria e por serem de baixa especificidade, podem ocasionar erros analíticos. O presente estudo propõe o uso de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência na quantificação do ácido L-ascórbico em sucos de laranja e limão. Amostras 1 mL dos sucos foram levados a volume conhecido com ácido metafosfórico 3%. A corrida cromatográfica utilizou tampão fosfato pH 2,5 como fase móvel, coluna C18 e detector ultravioleta (254nm). Obteve-se a curva analítica das soluções aquosas do ácido L-ascórbico nas concentrações entre 10 e 125 mg/L. O método se mostrou linear, com valor de  $r^2 = 0,994$ . Através das análises dos cromatogramas dos sucos, observou-se que o método é capaz de separar o pico do ácido L-ascórbico em nível de linha de base, comprovando a especificidade e seletividade do método. Assim, pelos parâmetros avaliados, o método estudado apresentou-se adequado para a quantificação de vitamina C em sucos de citrus.

**Palavras-chave:** ácido ascórbico, suco de citrus, CLAE.

### **METHODOLOGY FOR DETERMINING ASCORBIC ACID IN CITRUS JUICES USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

**Abstract:** The L-ascorbic acid (vitamin C), compound found naturally in fruits and vegetables, is widely used as an indicator of the quality of vegetables and foods during processing and storage. The traditional methods used to quantify this compound in vegetable matrices are based on colorimetry and present low specificity, causing analytical errors. The present study used the High Performance Liquid Chromatography for quantify the L-ascorbic acid in orange and lemon juices. Samples of 1 mL from juices were carried to a known volume with metaphosphoric acid 3%. The chromatographic run used phosphate buffer pH 2.5 as mobile phase, C18 column and UV detector (254nm). We obtained the calibration curve of aqueous solutions of L-ascorbic acid in concentrations between 10 and 125 mg/L. The method was linear, with a value for  $r^2 = 0.994$ . Analysing the chromatograms of juices, we observed that the method is able to separate the L-ascorbic acid at baseline level, proving the specificity and selectivity of the method. Thus, according to the evaluated parameters, the studied method presents a good suitable for the quantification of vitamin C in citrus juices.

**Keywords:** ascorbic acid, citrus juice, HPLC.

### **1. Introdução**

O ácido L-ascórbico, também nomeado de vitamina C, é um composto redutor, naturalmente presente em frutas e hortaliças, sendo encontrado em quantidade elevada em frutas cítricas (HOWARD et al., 1999; JAYAPRAKASHA; PATIL, 2007). Este composto é importante na nutrição humana pela sua ação antioxidante e sua deficiência no organismo leva a um quadro clínico conhecido como escorbuto (BASU; SCHORAH, 1982).

O ácido ascórbico é um dos nutrientes mais afetados durante o processamento de frutas, e começa a sofrer oxidação logo após a colheita do vegetal, principalmente pela ação enzimática dentro da própria fruta (INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VITAMIN C, 1981). Por isso sua quantificação é usada frequentemente como indicativo da qualidade nutricional e até mesmo de conservação dos alimentos (ASHOOR et al., 1984).

A metodologia analítica comumente empregada para a determinação de ácido ascórbico em amostras de origem vegetal é uma análise titulométrica baseada na redução do reagente de Tillmans, composto pelo 2,6-diclorofenol indofenol, e tal reação de oxi-redução pode ser identificada pela descoloração do reagente fenólico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Porém, este método pode gerar um resultado incerto, devido à presença de interferentes (outros agentes redutores), à instabilidade do ácido ascórbico quando em solução aquosa e à coloração já presente nas amostras, que dificulta a identificação do ponto de viragem da titulação (BADOLATO et al., 1996).

Outros métodos bastante empregados também se baseiam em reações de oxidação-redução com iodo ou cobre (BODOLATO et al., 1996). Tais análises também sofrem interferência de demais compostos redutores presentes e da coloração das amostras. Assim, surge a necessidade de se padronizar nova metodologia para a determinação do ácido ascórbico em amostras de origem vegetal, baseada em princípios de alta resolução, repetitividade e que minimizem o erro analítico.

Mais recentemente, com o objetivo de padronizar uma metodologia mais sensível na determinação do teor de ácido ascórbico, diversos estudos empregaram a Cromatografia Líquida de Alta Resolução (CLAE) na quantificação do composto utilizando diversas matrizes, coluna de troca iônica e avaliação da estabilidade (ROSA et al., 2007; BARCIA et al., 2010; BAIERLE et al., 2012). Porém, estes mesmos estudos reportam a dificuldade de quantificação do composto usando colunas de fase reversa pelo efeito causado pela matriz. Com esta finalidade, o presente estudo avaliou o uso de ácido metafosfórico como solução extratora e estabilizadora do composto e utilizou a técnica de CLAE com coluna de fase reversa para quantificar o ácido L-ascórbico extraído de sucos de laranja e limão.

## 2. Materiais e Métodos

Os sucos analisados foram obtidos por meio da extração manual dos frutos de *Citrus sinensis* (Laranja, variedade pera) e *Citrus limonium* (Limão, variedade tahiti). As amostras foram levadas a volume conhecido com ácido metafosfórico 3% (m/v), filtradas em unidades filtrantes descartáveis de teflon hidrofílico (porosidade 0,45 $\mu$ m) e colocadas em frasco âmbar. As amostras foram obtidas no comércio varejista da cidade de São Carlos.

O ácido L-ascórbico foi determinado utilizando uma coluna Agilent C18 (2,5x25mm,5 $\mu$ m) e tampão fosfato pH2,5 como fase móvel. O cromatógrafo líquido utilizado foi modelo Varian com detector Ultravioleta-Visível ajustado para leitura a 254nm. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL/min e o volume de injeção de 20 $\mu$ L.

O ácido L-ascórbico (pureza  $\geq$  99,0%) utilizado como padrão foi obtido de Sigma Life Science e os demais reagentes obtidos de Merck CO. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

## 3. Resultados e Discussão

A figura 1 representa os cromatogramas obtidos com o padrão de ácido L-ascórbico e de uma amostra de suco de laranja e uma amostra de suco de limão. Os cromatogramas apresentaram picos simétricos com resolução em nível de linha de base e tempo de retenção de aproximadamente 4,6 minutos. Esta ótima resolução cromatográfica e o curto tempo de retenção indicam que o método proposto é rápido e eficiente para análises de ácido ascórbico nas matrizes estudadas. Observa-se um pequeno deslocamento do pico de ácido L-ascórbico nos cromatogramas dos sucos, que decorrem do efeito da matriz na corrida cromatográfica. Porém a adição de padrão nas amostras de suco confirmou a identidade do pico do ácido L-ascórbico.

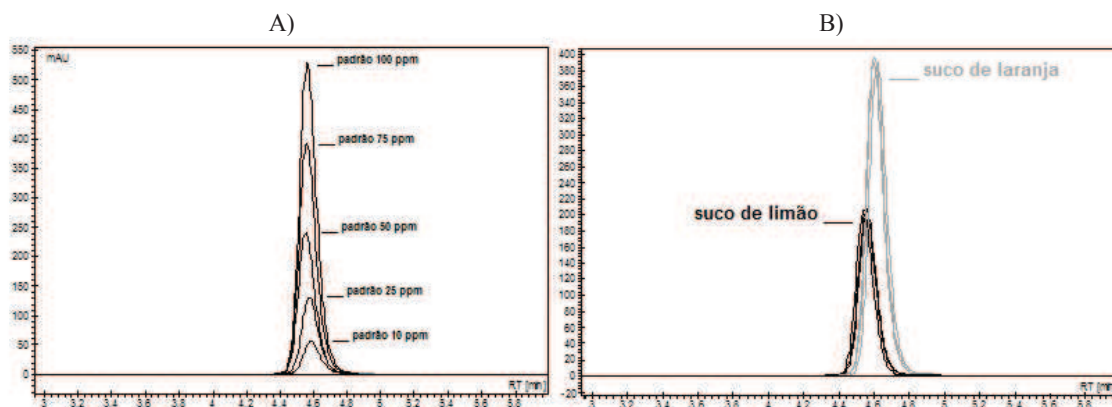


Figura 1. A) Cromatogramas do padrão e ácido L-ascórbico em solução aquosa e diferentes concentrações; B) cromatograma dos sucos de laranja e de limão diluídos 10 vezes em ácido metafosfórico 3%.

A equação da reta para a curva analítica obtida com análise do padrão de ácido L-ascórbico em solução aquosa foi  $y = 0,6988x - 0,6004$  com  $r^2 = 0,994$ . O valor de  $r^2$  demonstra o coeficiente de determinação da regressão linear e, quanto mais próximo de 1 estiver este valor, mais perto da perfeição estará a regressão linear obtida, ou seja, os valores obtidos pela equação da reta estarão próximos aos valores reais das amostras (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Segundo a ANVISA (2003), o critério mínimo aceitável de coeficiente de correlação ( $r$ ) é de 0,99, sendo que neste trabalho obtivemos  $r = 0,997$ . Assim, a curva analítica mostrou excelente linearidade no intervalo de concentração de 10-125 mg/L.

A tabela 1 se refere a teores de ácido L-ascórbico encontrados nas diferentes amostras estudadas. As concentrações empregadas para a determinação da curva analítica foram adequadas para os teores de ácido L-ascórbico encontrados nas amostras de sucos, quando estas foram diluídas 10 vezes em ácido metafosfórico 3%. Levando-se em consideração a variação que pode ocorrer entre diferentes frutos e diferentes estágios de maturação,

os valores encontrados se assemelham ao da literatura (ROSA et al., 2007; BARCIA et al., 2010; COUTO et al., 2010) mostrando que o ácido metafosfórico 3% permite uma eficiente extração e estabilização do composto, sem a necessidade de adição de outras substâncias estabilizantes e que o método em coluna de fase reversa permite a quantificação do composto com pouca interferência da matriz. Em trabalhos futuros, outras matrizes devem ser avaliadas.

Tabela 1. Teores de ácido ascórbico encontrados nas amostras estudadas.

Amostra	Teor de ácido ascórbico encontrado <sup>#</sup>
Suco de Limão Tahiti	373,93
Suco de Laranja pera	711,16

<sup>#</sup> unidade: partes por milhão

#### 4. Conclusões

O presente método de quantificação de ácido L-ascórbico por CLAE em sucos cítricos apresentou excelente sensibilidade analítica, especificidade e linearidade, além de picos simétricos com boa resolução em nível de linha de base. Os parâmetros avaliados estão de acordo com as recomendações da legislação vigente no país (ANVISA, 2003), o que corrobora o uso do método proposto para quantificação deste composto por CLAE. A partir deste desenvolvimento preliminar, pretende-se aprofundar os estudos de quantificação de ácido L-ascórbico por CLAE em diferentes matrizes de origem vegetal.

#### Agradecimentos

À Embrapa Instrumentação pelo apoio financeiro.

#### Referências

- ANVISA 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil, Leis, decretos, etc. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)>. Acesso em: 18 ago. 2014.
- ASHOOR, S. H.; WOODROW, C. M.; WELTY, J. Liquid chromatographic determination of ascorbic acid in foods. *Journal of International Association of Official Analytical Chemists*, v. 67, p. 78-80, 1984.
- BADOLATO, M. I.C.B.; SABINO, M.; LAMARCO, L. C. A.; ANTUNES, J. L. F. Estudo comparativo de métodos analíticos para determinação de ácido ascórbico em sucos de frutas naturais e industrializados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 16, n. 3, p. 206-210, 1996.
- BAIERLE, M.; BAIRROS, A.; MOREIRA, A. P.; BULÇÃO, R.; ROEHRS, M.; FREITAS, F.; DURGANTE, J.; BRUCKER, N.; CHARÃO, M.; GARCIA, S. C. Quantificação sérica de vitamina C por CLAE-UV e estudo de estabilidade. *Química Nova*, v. 35, n. 2, p. 403-407, 2012.
- BARCIA, M. T.; JACQUES, A. C.; PERTUZATTI, P. B.; ZAMBIAZI, R. C. Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE. *Ciências Agrárias*, v. 31, n. 2, p. 381-390, 2010.
- BASU, T. K.; SCHORAH, C. J. Vitamin c in health and disease. Londres: AVI Pub. Co., 1982. 152 p.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M. Bioestatística: princípios e aplicações. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30 (Supl. 1), p. 15-19, 2010.
- HOWARD, L. A.; WONG, A. D.; PERRY, A. K.; KLEIN, B. P.  $\beta$ -carotene and ascorbic acid retention in fresh and processed vegetables. *Journal of Food Science*, v. 64, n. 5, p. 929-936, 1999.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.
- INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VITAMIN C. VITAMIN C: ASCORBIC ACID. Coventry, 1981. In: J.N. COUNSELL and D.H. HORNING (eds.). London, Applied Science Publ, 1981. p. 383.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chemistry*, v. 101, n. 1, p. 410-418, 2007.
- ROSA, J. S.; GODOY, R. L. O.; OIANO NETO, J.; CAMPOS, R. S.; MATTA, V. M.; FREIRE, C. A.; SILVA, A. S.; SOUZA, R. S. Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 4, p.837-846, 2007.

