

Novas Metodologias para a Determinação do Conteúdo de Ácido Ascórbico em Alimentos Frescos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vítor Agostinho Rodrigues Spínola

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

Setembro | 2011

UMa

Nov

Novas Metodologias para a Determinação do Conteúdo de Ácido Ascórbico em Alimentos Frescos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vítor Agostinho Rodrigues Spínola

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTAÇÃO

Paula Cristina Machado Ferreira Castilho



NOVAS METODOLOGIAS PARA A DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM ALIMENTOS FRESCOS

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DA MADEIRA para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Aplicada, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Paula Cristina Machado Ferreira Castilho (Centro de Química da Madeira)

Vítor Agostinho Rodrigues Spínola

2011

Funchal - Portugal

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais Agostinho e Fátima. Muito obrigado por todo o vosso amor, incentivo e força transmitidos.

Um agradecimento especial à minha orientadora Prof.^a Doutora Paula Cristina Castilho pela oportunidade, experiência, compreensão e disponibilidade.

Agradeço também ao Prof. Doutor José Câmara pelo apoio, interesse e cedência do equipamento para a realização deste estudo.

À Doutora Sandra Gouveia pelo acompanhamento e transmissão de conhecimentos ao longo da realização do projecto.

Agradeço ao Gabinete de Promoção do Comércio Agro-Alimentar – GPCA, Direcção Regional de Agricultura e Desenvolvimento Rural a selecção dos produtos a estudar e ao supermercado Continente o fornecimento gratuito dos produtos hortofrutícolas necessários à elaboração do trabalho experimental.

Aos colegas de turma de mestrado, Berta Rodrigues e Rita Castro, e colegas do Laboratório João Gonçalves e Tatiana Costa pela amizade e colaboração em todos os momentos.

Agradeço igualmente ao Centro de Química da Madeira (CQM) e à Universidade da Madeira que proporcionaram os meios necessários para a realização desta dissertação. Não posso deixar de reconhecer o apoio da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo financiamento do projecto PEst-OE/QUI/UI0674/2011 (CQM, fundos do Governo Português).

Por último, agradeço às técnicas de laboratório, Paula Andrade e Paula Vieira, pela atenção e disponibilidade.

RESUMO

Novas Metodologias para a Determinação do Conteúdo de Ácido Ascórbico em Alimentos Frescos

A vitamina C é uma das vitaminas mais importantes para a nutrição humana e destaca-se pela sua eficiente acção antioxidante e participação em inúmeras reacções metabólicas como cofactor enzimático. A vitamina C inclui vários compostos que têm actividade biológica semelhante ao ácido L-ascórbico (L-AA), incluindo o produto da sua oxidação, ácido desidroascórbico (DHAA), e as formas sintéticas. Os seres humanos não são capazes de sintetizar a vitamina C, sendo necessário obter este nutriente através da alimentação. As frutas e vegetais são alimentos ricos em vitamina C, ao contrário das carnes e cereais.

Existem diversos métodos analíticos disponíveis para quantificação dos teores de vitamina C nos alimentos, sendo os métodos cromatográficos os mais utilizados devido à sua capacidade de separação e elevada sensibilidade e precisão. Neste trabalho, foi desenvolvido e validado um método de cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC) para determinar o conteúdo de vitamina C total (L-AA + DHAA) em várias frutas e vegetais com proveniências diferentes. A produção de produtos hortofrutícolas na ilha da Madeira não é auto-suficiente, sendo necessário importar alguns alimentos. Realizou-se um pequeno estudo comparativo do teor total de vitamina C e a sua degradação nos produtos locais e importados. O DHAA foi medido indirectamente através da reacção com o redutor DL-1,4-ditiotreitol (DTT), antes da injeção cromatográfica. Os resultados obtidos foram comparados com a titulação iodométrica. As amostras foram extraídas durante 5 dias consecutivos sendo os extractos resultantes armazenados a -80°C imediatamente após a extracção até ao dia de análise. A estabilidade do L-AA nos extractos conservados a diferentes temperaturas e os efeitos do cozimento dos alimentos sobre esta molécula foram avaliados. A actividade antioxidante dos produtos hortofrutícolas foi também medida pelo método ABTS (2,2-azino-bis(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato). O estudo da validação do método apresentou resultados bastante satisfatórios, demonstrando uma boa repetibilidade e sensibilidade elevada. Além disso, o método proposto revelou ser uma abordagem melhorada, simples e rápida para a determinação do conteúdo de vitamina C total em diversos produtos alimentares.

Palavras-Chave: Ácido Ascórbico; Ácido desidroascórbico; vitamina C total; Cromatografia Líquida de Ultra-eficiência; Validação; Capacidade antioxidante.

SUMMARY

New Methodologies for the Determination of Ascorbic Acid content in Fresh Foodstuffs

Vitamin C is one of the most important vitamins for human nutrition, due to its effective antioxidant action and participation in numerous metabolic reactions as enzymatic cofactor. Vitamin C is defined as the generic term for all compounds that have similar biological activity to L-ascorbic acid (L-AA), including its oxidation product, dehydroascorbic acid (DHAA), and synthetic forms. Humans are unable to synthesize vitamin C, so it is necessary to obtain this nutrient from diet. Fruits and vegetables are rich sources of vitamin C, unlike meat and cereals.

There are many analytical methods to measure L-AA content in food, the liquid chromatography methods being the most used and reliable, because of their separation capability and high sensitivity and accuracy. In this work, an ultrahigh performance liquid chromatography (UHPLC) method was developed and validated in order to determine the total vitamin C content (L-AA + DHAA) in various fruits and vegetables, with different origins. Madeira island produces some exotic fruits and vegetables, but it's not self sufficient, being necessary importing some of these commodities. We developed a small comparative evaluation of total vitamin C contents and its degradation on locally produced and imported foodstuffs. DHAA was determine indirectly after its reduction with DL-1,4-dithiotreitol (DTT) before analysis. Results were compared with L-AA content obtained by an iodometric titration method. Samples were extracted for 5 consecutive days and the extracts were prepared and stored at -80 ° C immediately after extraction until the day of analysis. The stability of L-AA on extracts stored at different temperatures and the effects of cooking process on this molecule were evaluated. The antioxidant activity of fruits and vegetables has also been measured by the ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) assay. The method validation gave satisfactory results, showing a good repeatability and high sensivity. Moreover, it proves to be an improved, simple and ultra-fast approach for determination of the total content of vitamin C in various foods commodities.

Keywords: Ascorbic Acid; Dehydroascorbic Acid; Total vitamin C; Ultra Performance Liquid Chromatography; Validation; Antioxidant capacity.

LISTA DE POSTERS

Spínola V., Câmara J. S., **Castilho P. C.**; Rapid Determination of L-ascorbic acid content in fruits consumed in Madeira Island, locally produced and imported – a comparative study; EUROanalysis 16, Challenges in Modern Analytical Chemistry; Belgrade, Serbia; 11 - 15th September; ID number: FA64 ; **2011**.

Spínola V., Mendes B., Pereira J., Câmara J. S., **Castilho P. C.**; Rapid Analytical approach for quantification the total L-ascorbic acid content in fruits and vegetables by ultra-performance liquid chromatography; HPLC2011, 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques; Budapeste, Hungary; 19 - 23th June; ID number: P1-G-241-MO, **2011**.

LISTA DE APRESENTAÇÕES ORAIS

Spínola V., Câmara J. S., **Castilho P. C.**; UHPLC-PDA as An Improved and Ultrafast Methodology for Determination of L-Ascorbic and Dehydroascorbic acids in fruits and vegetables; 7^o Encontro Nacional de Cromatografia; Porto, Portugal; 9 – 11th January, page 50, **2012**.

Spínola V., Câmara J. S., **Castilho P. C.**; Determination of vitamin C in fresh fruits. A comparative study using UHPLC; I Encontro do Grupo de Investigação em Produtos Naturais do CQM; Funchal, Portugal; 13 September, **2011**.

LISTA DE ARTIGOS

Spínola V.; Mendes B.; Câmara J. S.; **Castilho P. C.**; An improved and fast UHPLC-PDA methodology for determination of L-ascobic and dehydroascorbic acids in fruits and vegetables. Evaluation of degradation rate during storage. ABC-02149-2011.R1

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico
AA [·]	Radical ascorbato
ABTS	2,2-azino-bis(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato)
ABTS ^{•+}	Radical catião ABTS
ACN	Acetonitrilo
BAL	Dimercaptopropanol
CE	Electroforese capilar
CAD	Detecção aerosol carregado
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCIP	2,6-dicloroindofenol
DFQ	3-(1,2-dihidroxietil)furo[3,4b]quinoxalina-1-ona
DHAA	Ácido desidroascórbico
DKG	Ácido 2,3-diceto-L-gulónico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazina
DTT	DL-1,4-Ditiotreitol
ECD	Detecção Electroquímica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EFSA	Autoridade Europeia de Segurança Alimentar
ESI	Ionização spray-electrónico
ESI ⁻	Ionização spray-electrónico (modo negativo)
ESI-MS	Ionização Spray-electrónico – Espectrometria de Massa
FCDB	Bases de dados da composição dos alimentos
FD	Detecção Fluorescência
FR	Factor de resposta
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro
GAL	L-galactose
GalL	L-galactono-lactona
GUIL	L-gulono-lactona
GC	Cromatografia gasosa
GPGD	6-fosfatoglucanato desidrogenase

GRD	Glutathione Reductase
GSH	Glutathione (L-γ-glutamyl-L-cysteinylglycine)
GSH-px	Glutathione-peroxidase
GSSG	Glutathione oxidized
HCl	hydrochloric acid
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HMF	Hydroxymethylfurfural
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
iso-AA	D-isoascorbic acid
iso-DHAA	iso-deshydroascorbic acid
L-AA	L-Ascorbic acid
LC	Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry
LDL	Low Density Lipoprotein
LODs	Limit of Detection
LOQs	Limit of Quantification
MDT	5-methyl-3,4-dihydroxyacetone
MPA	Metaphosphoric acid
MS	Mass Spectrometry
MSG	Sodium glutamate
Na ₂ EDTA	sodium salt of ethylenediaminetetraacetic acid
OA	Oxalic acid
ODS	Octadecylsilane
OPDA	o-phenylenediamine
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate-buffered saline
PCA	Perchloric acid
PDA	Photodiode Array Detector
PS/DVB	Polystyrene/divinylbenzene
RAM	Região Autónoma da Madeira
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RP	Reverse Phase Chromatography

TBAOH	Hidróxido tetrabutilamónio
TCA	Ácido tricloroacético
TCEP	Tris [2-carboxiletil] cloridrato de fosfina
TEAC	Actividade Antioxidante equivalente ao Trolox
TFA	Ácido trifluoracético
TRX	Tioredoxina reductase
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência
UHPLC-PDA	Cromatografia líquida ultra-eficiência - Detector arranjo de fotodiodos
UV	Ultra-Violeta
UVD	Detecção Ultra-Violeta
UV/vis	Ultra-violeta/visível
λ	Comprimento de onda
λ_{Ex}	Comprimento de onda de Excitação
λ_{Em}	Comprimento de onda de Emissão

ÍNDICE GERAL

RESUMO	III
SUMMARY	V
LISTA DE POSTERS	VII
LISTA DE APRESENTAÇÕES ORAIS	VII
LISTA DE ARTIGOS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XVII
ÍNDICE DE TABELAS	XXI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Histórico	5
2.2. Vitamina C: Estrutura e Propriedades Físico-Químicas	7
2.2.1. Estrutura	7
O ácido L-ascórbico	8
2.2.2. Propriedades Físico-Químicas	8
2.2.2.1. Ácido desidroascórbico	11
2.3. Síntese e Biodisponibilidade da vitamina C	12
2.3.1. Biosíntese do Ácido L-Ascórbico	12
2.3.2. Síntese Química do Ácido L-Ascórbico	13
2.3.3. Biodisponibilidade do Ácido L-Ascórbico	13
2.4. Funções Bioquímicas e Fisiológicas da vitamina C	15
2.4.1. Cofactor Enzimático	15
2.4.2. Antioxidante	17
2.5. Vitamina C nos alimentos	22
2.5.1. Fontes e requerimentos do Ácido L-Ascórbico	22
2.5.2. Variações do conteúdo de vitamina C entre os alimentos	24

2.5.3. Amadurecimento e perdas pós-colheita.....	25
2.5.4. Processamento e Armazenamento dos alimentos.....	27
2.6. Métodos de Análise da vitamina C.....	29
2.6.1. Extracção da vitamina C.....	30
2.6.2. Métodos Clássicos de Análise da vitamina C	32
2.6.2.1. Titulações	32
2.6.2.2. Métodos Espectrofotométricos.....	33
2.6.3. Abordagens Recentes para a Análise da vitamina C	36
2.6.3.2. Métodos de Separação Cromatográfica	36
2.7. Determinação <i>in vitro</i> da capacidade antioxidante	48
2.7.1. Ensaio da descoloração do ABTS ^{•+}	48
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	51
3.1. Métodos.....	51
3.1.1. Desenvolvimento e Validação do método analítico	51
3.1.2. Colheita das amostras/ matéria-prima	54
3.1.3. Conservação e preparação das amostras para análise.	55
3.1.4. Determinação do teor de vitamina C total por UHPLC-PDA	56
3.1.4. Estudo de degradação do Ácido L-Ascórbico	58
3.1.5. Estudo da degradação vitamina C nos brócolos.....	58
3.1.6. Titulação Iodométrica	58
3.1.7. Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	59
3.2. Material e Reagentes utilizados	60
3.2.1. Material Utilizado	60
3.2.2. Equipamentos Utilizados	61
3.2.3. Reagentes utilizados	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1. Desenvolvimento e Validação do Método.....	63
4.2. Análise da vitamina C total nos produtos hortofrutícolas	70
4.2.1. Aplicação do método a matrizes vegetais	74

4.2.1.1. Maracujás.....	74
4.2.1.2. Agriões	78
4.2.1.3. Pimentos Verdes.....	79
4.2.1.4. Pimentos Vermelhos.....	82
4.2.1.5. Anonas	84
4.2.1.6. Morangos	86
4.2.1.7. Papaias.....	88
4.2.1.8. Limões	91
4.2.1.9. Brócolos	93
4.2.2. Estudo da estabilidade do ácido L-ascórbico nos extractos.....	98
4.2.2.1. Estabilidade do ácido L-ascórbico no injecto.....	98
4.2.2.2. Estabilidade do ácido L-ascórbico a 4 °C.....	100
4.2.2.3. Estabilidade do ácido L-ascórbico a -20 °C.	101
4.2.2.4. Estabilidade do ácido L-ascórbico a -80 °C	102
4.2.3. Discussão Geral	103
4.2.4. Titulação Iodométrica.....	109
4.3. Actividade Antioxidante pelo método ABTS ^{•+}	113
5. CONCLUSÕES	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas do ácido L-ascórbico e seus isómeros.....	7
Figura 2 - Reacções de oxidação/redução do ácido L-ascórbico e produtos resultantes.	10
Figura 3 - Comparação da biossíntese do L-AA em diferentes organismos.	12
Figura 4 - Interacção entre o ácido ascórbico e a glutathione.	18
Figura 5 - Produtos da degradação do Ácido L-Ascórbico nos alimentos.	26
Figura 6 - Principais reacções do ácido L-ascórbico aplicadas na análise da vitamina C.	35
Figura 7 - Espectro de massa do ácido L-ascórbico.	45
Figura 8 - Reacção utilizada no teste do ABTS ou ensaio TEAC (actividade antioxidante equivalente ao Trolox).	49
Figura 9 - Distribuição geográfica das áreas de produção dos produtos hortofrutícolas na Ilha da Madeira.	55
Figura 10 - Metodologia aplicada na determinação da Vitamina C total (L-AA + DHAA) nos produtos hortofrutícolas.	56
Figura 11 - Cromatograma (a) e espectro de absorção UV (b) obtido da solução padrão de ácido L-ascórbico (50 µg/mL) na faixa dos 200 - 400 nm.	65
Figura 12 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos da solução padrão de ácido L-ascórbico (50 µg/mL), sumo de limão e sumo de laranja ($\lambda = 245$ nm).....	66
Figura 13 -Espectros de absorção UV obtidos do ácido L-ascórbico do sumo de limão (a) e sumo de laranja (b) na faixa dos 200 - 400 nm.	66
Figura 14 - Redução do ácido desidroascórbico pelo DTT.	73
Figura 15 - Cromatograma (a) e espectros de absorção da polpa de maracujá regional pré (b) e pós-redução (c) com DTT (245 nm).....	74
Figura 16 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras de maracujá regional, armazenadas a 4 °C, durante 15 dias.	75
Figura 17 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras de maracujá importado, armazenadas a 4 °C, durante 15 dias.	76
Figura 18 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) na polpa de maracujá regional conservada a -18 °C.	77
Figura 19 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras agrião, armazenadas à temperatura de 4°C, durante 5 dias.	78
Figura 20 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras de pimento verde regional, armazenadas à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.....	80

Figura 21 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras de pimento verde importado, armazenadas à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.	81
Figura 22 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras de pimentos vermelhos regionais, armazenadas à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.	82
Figura 23 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nos pimentos vermelhos importados, armazenados à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.	83
Figura 24 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras de anona, armazenadas à temperatura ambiente, durante 5 dias.	85
Figura 25 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras de morango regional, armazenadas à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.	86
Figura 26 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras de morango importado, armazenadas à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.	87
Figura 27 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas papaias regionais, armazenadas à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.	89
Figura 28 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas papaias importadas, armazenadas à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.	90
Figura 29 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nos limões regionais, armazenados à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.	91
Figura 30 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nos limões importados, armazenados à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.	92
Figura 31 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nos brócolos regionais, armazenados à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.	93
Figura 32 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) brócolos importados, armazenados à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.	94
Figura 33 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nos brócolos regionais após cozedura.	96
Figura 34 - Recuperação do ácido L-ascórbico em extractos de maracujá e solução padrão (50 µg/mL) à temperatura ambiente durante 5 horas.	99
Figura 35 - Recuperação do ácido L-ascórbico em extractos de maracujá e solução padrão (50 µg/mL) armazenados a 4 °C durante 2 meses.	100
Figura 36 - Recuperação do ácido L-ascórbico em extractos de maracujá e solução padrão (50 µg/mL) armazenados a -20°C durante 2 meses.	102
Figura 37 - Recuperação do ácido L-ascórbico em extractos de agrião regional e solução padrão (50 µg/mL) armazenados a -80°C durante 2 meses.	102

Figura 38 - Perdas médias diárias do L-AA nos frutos e vegetais ao longo do período de armazenamento.....	106
Figura 39- Reacção entre as moléculas de iodo (bolas azuis) e a hélice β -amilase	109
Figura 40 - Comparação do teor de L-AA nos produtos hortofrutícolas determinado pela titulação iodométrica e pelo método UHPLC-PDA.	111
Figura 41- Actividade antioxidante das polpas dos produtos hortofrutícolas, expressa em TEAC ($\mu\text{mol Trolox/g polpa}$).	114
Figura 42 - Correlação entre o teor médio de L-AA obtido e o método ABTS.	120

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades Físicas do ácido L-ascórbico.	8
Tabela 2 - Funções Bioquímicas do ácido L-Ascórbico e as principais enzimas que utilizam esta molécula como cofactor e/ou modulador da sua actividade.....	21
Tabela 3 - Conteúdo de vitamina C em algumas frutas e vegetais.....	23
Tabela 4 - Doses diárias recomendadas para a vitamina C.	24
Tabela 5 - Visão geral dos métodos cromatográficos para a determinação de ácido ascórbico e ácido desidroascórbico em alimentos por ordem cronológica.	46
Tabela 6 - Pontos das curvas de calibração preparados a partir de diluições da solução padrão <i>stock</i> (200 µg/mL) de ácido L-ascórbico.....	52
Tabela 7 - Informações sobre as espécies, variedade/cultivar, data de colheita e proveniência para cada um nove produtos hortofrutícolas analisados.	54
Tabela 8 - Condições cromatográficas utilizadas na determinação da vitamina C total nos produtos hortofrutícolas.	57
Tabela 9 - Condições experimentais do Método ABTS.	60
Tabela 10 - Material Utilizado	60
Tabela 11 - Equipamentos utilizados.....	61
Tabela 12 - Reagentes e Solventes utilizados.....	61
Tabela 13 - Linearidade e sensibilidade do método UPLC-PDA para a determinação do ácido L-ascórbico.	68
Tabela 14 - Precisão intra-dias (Repetibilidade) do método UHPLC-PDA para a determinação do ácido L-ascórbico.	68
Tabela 15 - Precisão inter-dias do método UHPLC-PDA para a determinação do ácido L-ascórbico.	69
Tabela 16 - Recuperação do método UHPLC-PDA para a determinação do ácido L-ascórbico e vitamina C total nas diversas amostras.....	69
Tabela 17 - Efeito do cozimento dos brócolos sobre a vitamina C total durante 5 minutos.	96
Tabela 18 - Conteúdo de vitamina C total nos 9 produtos hortofrutícolas analisados e a sua contribuição (%) para a DDR da vitamina C em homens e mulheres adultos saudáveis.....	104
Tabela 19 - Comparação do teor de L-AA nos produtos hortofrutícolas determinado pela titulação iodométrica e pelo método UHPLC-PDA.	112
Tabela 20 - Actividade antioxidante dos extractos dos produtos hortofrutícolas analisados. .	115

1. INTRODUÇÃO

Uma dieta rica em frutas e vegetais tem sido associada a vários benefícios na saúde humana, devido à presença de compostos nutricionais e substâncias com acção antioxidante. Os nutrientes responsáveis por esses efeitos incluem algumas vitaminas (A, C, E), minerais, carotenóides e compostos fenólicos, os quais exercem uma acção protectora contra a evolução de processos degenerativos que conduzem a doenças e ao envelhecimento precoce.

As vitaminas constituem um grupo de micronutrientes essenciais para a manutenção da saúde do organismo. Não representam uma fonte de energia, mas participam numa série de processos metabólicos relevantes. A vitamina C é uma das vitaminas mais importantes pois desempenha inúmeras funções bioquímicas. Provavelmente, o papel mais reconhecido da vitamina C ou ácido L-ascórbico (L-AA) é na prevenção de gripes e resfriados. Participa também na prevenção/cura do escorbuto, metabolismo do ferro, síntese do colagénio, hormonas, redução dos níveis de colesterol no plasma, auxilia a actividade de enzimas através da doação de electrões (cofactor enzimático) e é também capaz de neutralizar radicais livres resultantes do metabolismo (antioxidante). A sua capacidade antioxidante está associada à redução do risco de arteriosclerose, doenças cardiovasculares e na prevenção de algumas formas de cancro. É também útil na indústria alimentar, utilizada como aditivo alimentar, prevenindo a oxidação dos alimentos. A vitamina C encontra-se presente naturalmente na maior parte dos alimentos de origem vegetal. Frutas e hortaliças, nomeadamente citrinos, brócolos, couve-flor e pimentos são as principais fontes de vitamina C nos alimentos. No entanto, o seu conteúdo varia consoante a espécie vegetal analisada, condições edafoclimáticas (época e região), grau de amadurecimento e condições de cultivo. Por exemplo, citrinos, pimentos e vegetais verdes são uma excelente fonte desta vitamina. Já as cenouras e maçãs são pobres em vitamina C. Como os humanos não são capazes de sintetizar esta molécula, devido à ausência da enzima gulonolactona oxidase, torna-se importante a sua ingestão através dos alimentos e/ou suplementos vitamínicos. A ingestão de cerca de 100 - 200 mg/dia de vitamina C tem sido sugerida de modo a combater as agressões diárias provocadas pelo stress oxidativo.

A vitamina C é conhecida pela sua instabilidade e reactividade. O L-AA oxida-se facilmente a ácido desidroascórbico (DHAA) devido à presença de dois grupos hidroxilo na sua estrutura. Esta reacção é reversível e constitui a base das suas propriedades físico-químicas. A oxidação do DHAA origina o ácido 2,3-dicetogulónico (DKG), que não possui actividade

biológica, e esta reacção é irreversível. O termo “vitamina C” corresponde a todas as moléculas que possuem actividade vitamínica semelhante ou equivalente ao ácido L-ascórbico. Neste grupo estão incluídos o produto da sua oxidação (DHAA), isómeros e formas sintéticas. A degradação da vitamina C depende de muitos factores, nomeadamente pH alcalino, elevadas temperaturas, luz, contacto com oxigénio, presença de iões metálicos e enzimas. Estes factores contribuem para a perda do conteúdo de vitamina C nos alimentos. Outros factores como o transporte, processamento, armazenamento pós-colheita prolongado e confeção tornam os alimentos ainda mais susceptíveis à degradação do ácido ascórbico. Isto resulta numa grande variação dos níveis de vitamina C encontrados nos alimentos crus e confeccionados, em diferentes amostras de um mesmo produto.

Como o ácido desidroascórbico é facilmente convertido a ácido ascórbico no organismo, torna-se importante a medição do teor da vitamina C total nos alimentos, isto é, a soma do conteúdo em ácido L-ascórbico e ácido desidroascórbico. Existem inúmeras técnicas analíticas utilizadas na determinação do teor de vitamina C nos alimentos. Os métodos clássicos incluem a titulometria, espectrofotometria, fluorimetria, entre outros. Estes métodos mais antigos baseiam-se nas propriedades redox da vitamina. Contudo, estas metodologias carecem de especificidade pois são sujeitas à interferência de outros compostos presentes nas amostras exigindo etapas de limpeza morosas. Actualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando colunas de troca iónica e fase reversa, com sistema de detecção por Ultra-Violeta (UV), electroquímico (ECD), fluorescência (FD) ou espectrometria de massa (MS) é sem dúvida o método mais empregado. As principais vantagens desta técnica são a sua simplicidade, reprodutibilidade, precisão, exactidão e elevada sensibilidade. Permite também a possibilidade de separar e diferenciar numa única análise as diferentes formas activas da vitamina C, mesmo quando estas estão presentes em quantidades mínimas e em matrizes complexas, como os alimentos. No entanto, a detecção simultânea do ácido L-ascórbico e produtos relacionados é, hoje em dia, um dos grandes desafios no desenvolvimento de metodologias analíticas. O DHAA apresenta uma fraca absorção UV e um dos procedimentos aplicados para melhorar a sua detecção é a sua derivatização, produzindo compostos fluorescentes facilmente detectáveis. Outra solução inclui a redução do DHAA para L-AA, pela acção de um agente redutor, e determinar o seu conteúdo indirectamente.

A capacidade antioxidante dos alimentos está relacionada com a presença de vitaminas, carotenóides, polifenóis, entre outros, que protegem o organismo dos danos provocados pelo stress oxidativo. Os métodos mais comuns utilizados na análise da actividade

antioxidante das frutas e vegetais incluem o ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazina), FRAP (Poder antioxidante de redução do ferro), ORAC (Capacidade de absorção dos radicais oxigênio), entre outros. Todos estes métodos apresentam uma excelente reprodutibilidade sob condições estabelecidas, porém as substâncias analisadas podem mostrar diferenças significativas nas suas respostas antioxidantes. Como tal, deve ser aplicado mais do que um método para obter informações úteis sobre a capacidade antioxidante total dos produtos analisados. Além disso, os resultados obtidos *in vitro* não se traduzem obrigatoriamente nos mesmos efeitos *in vivo*.

Este trabalho teve como principal objectivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação do ácido L-ascórbico, utilizando a cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC), a validação do método, e a sua aplicação na análise da vitamina C total em produtos hortofrutícolas. Os resultados obtidos por este método foram comparados com os obtidos pela titulação iodométrica. Como aspecto secundário, a capacidade antioxidante dos produtos foi também avaliada através do teste do ABTS, que por ser o mais amplamente descrito para este tipo de produtos torna mais imediata a comparação com dados bibliográficos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico

A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico (AA), é um micronutriente essencial na dieta humana. A deficiência nutricional desta vitamina na alimentação provoca a avitaminose designada por escorbuto [1, 2].

A descoberta histórica dos benefícios do AA remonta à Idade Média, no entanto, existem vários relatos sobre o escorbuto no Antigo Egito, Grécia e Roma. Esta doença já era do conhecimento do filósofo Hipócrates e do naturalista romano Plínio [3, 4]. No entanto, foi só no final da Idade Média que o escorbuto se tornou uma doença epidêmica, principalmente no norte e centro da Europa. Era uma doença bastante comum entre os soldados e marinheiros durante as longas expedições marítimas (séc. XV e XVI), pois a dieta não continha quantidades adequadas de vitamina C, mas também durante o Inverno quando as frutas e hortaliças frescas não estavam disponíveis. Os principais sintomas de escorbuto apresentados pelas tripulações eram hemorragias, perda dos dentes, depressão e fadiga. Estima-se que Vasco da Gama tenha perdido cerca de cem dos seus cento e sessenta homens, durante as viagens marítimas para a Índia (1497 - 1499), vítimas de uma alimentação deficiente em vitamina C. A marinha inglesa também sofreu perdas humanas causadas pelo escorbuto. Em 1744, numa viagem de regresso à Inglaterra desde a América do Sul, o almirante britânico George Anson perdeu cinco dos seus seis navios. Sobreviveram apenas 335 homens numa tripulação inicial de 1500, onde a maioria morreu sobretudo pelo escorbuto [2, 3].

A primeira demonstração da importância das vitaminas na dieta humana foi realizada pelo médico de bordo escocês James Lind. Em 1747 iniciou um ensaio clínico controlado para o estudo do escorbuto. Provou que a falta de uma substância na dieta era responsável pelo aparecimento desta doença ao incluir deliberadamente vegetais verdes e citrinos na dieta dos seus marinheiros. Este método revelou ser eficiente na recuperação e/ou prevenção do escorbuto. Os resultados da sua investigação foram publicados, em 1753, no livro *“Treatise on the Scurvy”*. Neste constava um inquérito sobre a natureza, causas e possíveis curas da doença, além de uma visão crítica e cronológica do que tinha sido publicado anteriormente sobre esta temática. Desde então, a marinha britânica incluiu o sumo de limão na alimentação dos seus tripulantes o que levou que estes ficassem conhecidos como *limeys* [1-4]. O capitão James Cook seguiu o seu exemplo e adicionou citrinos à sua provisão durante as viagens pelo mundo

(1772-1776). Na viagem de Fernão de Magalhães, a sua preferência pela compota de marmelo protegeu-o e aos seus tripulantes do escorbuto [5, 6].

Mesmo assim, o problema do escorbuto não foi completamente eliminado e perdurou em períodos da história onde a escassez de alimentos era aguda. Existem relatos desta doença durante a descoberta do ouro na Califórnia, do Alasca, guerra civil americana e durante a primeira guerra mundial [1, 3, 4].

Em 1907, Axel Holst e Teodor Frolich realizaram um estudo clínico no qual induziram o escorbuto em porcos da índia e utilizaram este animal como modelo para testar a actividade anti-escorbútica de vários alimentos [4].

Albert Szent-Gyorgyi foi o primeiro cientista a isolar a vitamina C (1928) a partir das glândulas adrenais de animais. Tendo em conta a sua fórmula empírica ($C_6H_8O_6$), Szent-Gyorgyi designou o composto por ácido hexurónico. Simultaneamente, King e Waugh [1, 3] identificaram um composto idêntico no sumo do limão com actividade antiescorbútica. Como já tinham sido nomeados os factores de crescimento e saúde “A” e “B”, Drumond propôs dar o nome factor “C” à substância, que mais tarde passou a ser designada como vitamina C [1].

No ano de 1933, com a descoberta da sua estrutura química pelos cientistas Hirst e Haworth, foi sugerida a mudança do nome de vitamina C para ácido ascórbico. Nesse mesmo ano, Reichstein divulgou a síntese do ácido L-ascórbico, iniciando-se assim a sua produção industrial em grande escala. O composto sintético provou ter a mesma capacidade vitamínica que a apresentada pela forma natural. Haworth e Szent-Gyorgyi receberam em 1937 o prémio Nobel da química e medicina, respectivamente, pelos seus trabalhos relacionados com a vitamina C [1, 3, 5].

Nas décadas seguintes, vários estudos demonstraram a relação entre a vitamina C com outras doenças. Linus Pauling publicou um livro polémico “ *Vitamin C and the common Cold*” (1970) no qual defendia que a ingestão de elevadas doses diárias de ácido ascórbico poderia prevenir gripes, doenças cardiovasculares e até mesmo o cancro. Estas afirmações e os métodos utilizados pelo cientista foram bastante questionados, principalmente porque ele não realizou qualquer tipo de ensaio clínico e derivou as suas conclusões de estudos prévios [5, 7]. Os defensores das teorias de Pauling refutam estes argumentos e alegam que não existe nenhuma evidência científica que demonstre que mesmo doses muito grandes de vitamina C são tóxicas ou podem exercer sérios efeitos adversos à saúde. As declarações de Pauling sobre os efeitos da vitamina C, nas doenças cardiovasculares e cancro, ainda estão por ser provadas [2, 7].

2.2. Vitamina C: Estrutura e Propriedades Físico-Químicas

2.2.1. Estrutura

O nome químico oficial da vitamina C ($C_6H_8O_6$) é ácido L-treo-2-hexonona-1,4-lactona (ou ácido 2,3-enediol-gulónico- γ -lactona) [2-4]. Em 1965, a comissão do IUPAC-IUB (do inglês “International Union of Pure and Applied Chemistry – International Union of Biochemistry”) alterou a designação química desta molécula para ácido ascórbico (AA) ou ácido L-ascórbico (L-AA). A palavra “ascórbico” representa o valor biológico desta molécula na protecção contra o escorbuto (do latim *scorbutus*) e a designação L- indica que se trata de uma espécie opticamente activa (levógira) [1].

O termo genérico “vitamina C” diz respeito a todos os compostos que apresentam uma actividade biológica equivalente ou semelhante ao ácido L-ascórbico. Este grupo inclui os seus produtos da oxidação, isómeros, ésteres do ácido ascórbico e as formas sintéticas [1, 4, 8]. Esta molécula apresenta uma estrutura bastante simples: conformação em anel γ -lactona estável quase planar constituído por cinco membros. Os dois centros quirais nas posições 4 e 5 permitem a existência de quatro estereoisómeros. Os pares de enantiómeros correspondem aos ácidos L e D-ascórbico e ácidos L e D-araboascórbico (também conhecido como ácido isoascórbico ou ácido eritórbico). Por sua vez, os ácidos L-isoascórbico e D-ascórbico e os ácidos L-ascórbico e D-isoascórbico são epímeros. Diferem apenas na orientação do hidrogénio e do grupo hidroxilo no carbono 5. As estruturas do ácido L-ascórbico e seus isómeros são apresentadas na Figura 1.

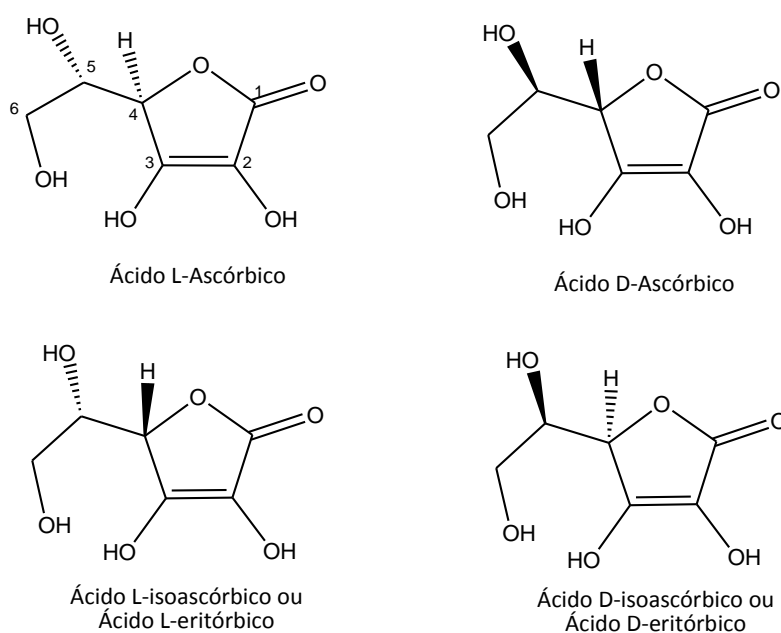


Figura 1 - Estruturas do ácido L-ascórbico e seus isómeros (adaptado da Fonte: [4]).

O ácido L-ascórbico é a forma da vitamina C que apresenta maior actividade biológica. O ácido desidroascórbico, principal produto da oxidação do L-AA, apresenta aproximadamente 80% da sua actividade vitamínica. O ácido D-ascórbico, bem como ácidos D-e L-isoascórbico têm apenas actividade marginal de vitamina C (aproximadamente 2,5 - 5%). O estereoisómero do L-AA, D-isoascórbico (iso-AA), é sobretudo encontrado nos fungos e leveduras. O iso-AA não se encontra presente de forma natural nos alimentos, no entanto, é usado na indústria alimentar como um antioxidante. São também conhecidas formas sintéticas como o 2-fosfato-ascorbato e 6-palmitato-ascorbato (ou ascorbil palmitato). Esta molécula é um éster derivado dos ácidos gordos combinado com o ácido ascórbico [3-5].

2.2.2. Propriedades Físico-Químicas

O ácido ascórbico é um sólido cristalino branco (massa molecular de 176,13 g/mol), que escurece em contacto com a luz. Faz parte do grupo das vitaminas hidrosolúveis e, como tal, apresenta uma elevada solubilidade em água. Os seus sais, ascorbato de sódio e ascorbato de cálcio, são ainda mais solúveis. Todos os derivados desta vitamina são, então, insolúveis em gorduras e óleos, à excepção do ascorbil palmitato [4, 9]. As principais propriedades físico-químicas do L-AA estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades Físicas do ácido L-ascórbico.

Fórmula Empírica	C ₆ H ₈ O ₆
Massa Molecular (g/mol)	176,13
Aparência	Sólido branco cristalino, inodoro
Densidade (g/cm³)	1,65
Ponto de fusão (°C)	190 - 192
Solubilidade	Água - 33 g/100 mL; Etanol -2 g/100 mL; Glicerol - 1g/100 mL . Insolúvel em lípidos, éter dietílico, clorofórmio,
Acidez (pKa)	benzeno, éter de petróleo, entre outros. 4,17 (pKa ₁); 11,6 (pKa ₂)
pH	≈3 (5 mg/mL); ≈ 2 (50 mg/mL)
Espectro Absorção	^a ε Max (1%, 10 mm) = 695 (λ= 245 nm, pH = 2) ε Max (1%, 10 mm) = 940 (λ= 265 nm, pH = 6,4)

^acoeficiente de extinção molar da solução 1 % de L-AA (largura da cuvete = 10 mm) (adaptado da Fonte: [4]).

O AA é pouco solúvel em ácido acético, acetona e álcoois de cadeia curta como o metanol e o etanol. É insolúvel em éter, clorofórmio, benzeno e éter de petróleo [10]. Apesar de não possuir grupos carboxílicos, a vitamina C apresenta características de um ácido orgânico. A deslocalização dos electrões π entre os carbonos 2 e 3 do sistema conjugado enediol aumenta a estabilidade da molécula e faz com que o hidrogénio do grupo hidroxilo (C3) torne-se bastante ácido ($pK_{a1} = 4,17$) contribuindo para a natureza ácida da vitamina C [5]. A sua elevada solubilidade em água e outros solventes, carácter ácido, forte agente redutor e reactividade são características atribuídas à sua estrutura química (presença do grupo hidroxil-enólico) [1, 4]. As ligações duplas no anel γ -lactona estão relacionadas com as suas propriedades de absorção. A absorção UV do ácido ascórbico é dependente das espécies iónicas presentes, ou seja, do pH do meio (Tabela 1). Em ambientes ácidos (níveis de pH baixos), o AA encontra-se na forma protonada e a sua absorção máxima ocorre entre os 244-245 nm. Acima do pH 5, o L-AA encontra-se predominantemente como espécie monoaniónica (anião L-ascorbato) e possui absorção máxima por volta dos 265 nm. Em soluções com pH acima de 12 (básico) o L-AA encontra-se totalmente dissociado e absorve à volta dos 300 nm. O ácido ascórbico não possui propriedades de fluorescência [4, 10].

As propriedades físico-químicas mais importantes de vitamina C baseiam-se na sua dissociação reversível a anião ascorbato e subsequente oxidação para DHAA. O ácido L-ascórbico é relativamente estável quando sólido. No entanto, em solução aquosa, é rapidamente oxidado a ácido desidroascórbico devido à perda de electrões dos dois grupos hidroxilo [11]. A vitamina C é uma das vitaminas mais instáveis e facilmente oxidada por vários agentes (halogénios, peróxido de hidrogénio, cloreto férrico, entre outros) [9]. São muitos os factores que influenciam a degradação do AA, nomeadamente, o aumento da temperatura, presença de oxigénio e iões metálicos (cobre, Cu^{2+} ; prata, Ag^+ ; e ferro, Fe^{3+}), presença de luz e pH alcalino, que podem actuar isolados ou combinados [1, 12, 13]. A reacção do L-AA com oxigénio, na presença de iões metálicos de transição, é de grande importância na estabilidade da vitamina C. Os dois electrões do L-AA são transferidos para o oxigénio e os produtos são o DHAA e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Os iões metálicos servem de catalisadores da oxidação da vitamina C, na presença do oxigénio. A oxidação catalisada pelos metais ocorre muito mais rapidamente que a oxidação espontânea [2, 3]. A vitamina C é muito susceptível à degradação pela acção da luz (radiação ultra-violeta), através da absorção directa da energia radiante. Alterar o pH ou força iónica das soluções pode influenciar a taxa de degradação do AA [11]. Por exemplo, o AA é estabilizado em soluções ácidas (pH 2 - 3). No entanto, valores de pH básicos (acima do pH 7) promovem a sua degradação em vários compostos (Figura 2) [9].

A conversão do L-AA é um processo rápido com duas etapas que origina o radical L-ascorbato e/ou DHAA. A primeira ionização ocorre no grupo hidroxilo do carbono 3. O produto da primeira dissociação ($pK_{a1}= 4,17$) é um anião monovalente designado por L-ascorbato [1, 5]. O L-ascorbato é um importante intermediário das reacções metabólicas e a sua oxidação (perda de um electrão) origina o radical livre ascorbato (ácido monodesidroascórbico ou semidesidroascórbico). Uma vez formado, o radical ascorbato decai rapidamente (10^{-5} s). Apesar de ser uma espécie muito instável, não tem a capacidade de formar radicais livres nocivos e pode ser reversivelmente reduzido a ascorbato. A segunda dissociação ocorre no grupo hidroxilo C-2 ($pK_{a2}=11,6$). Com a perda de outro electrão, o radical ascorbato decompõe-se rapidamente para formar o ácido desidroascórbico (Figura 2). Esta oxidação reversível é a base da actividade fisiológica da vitamina C e das suas propriedades químicas [1, 2, 9].

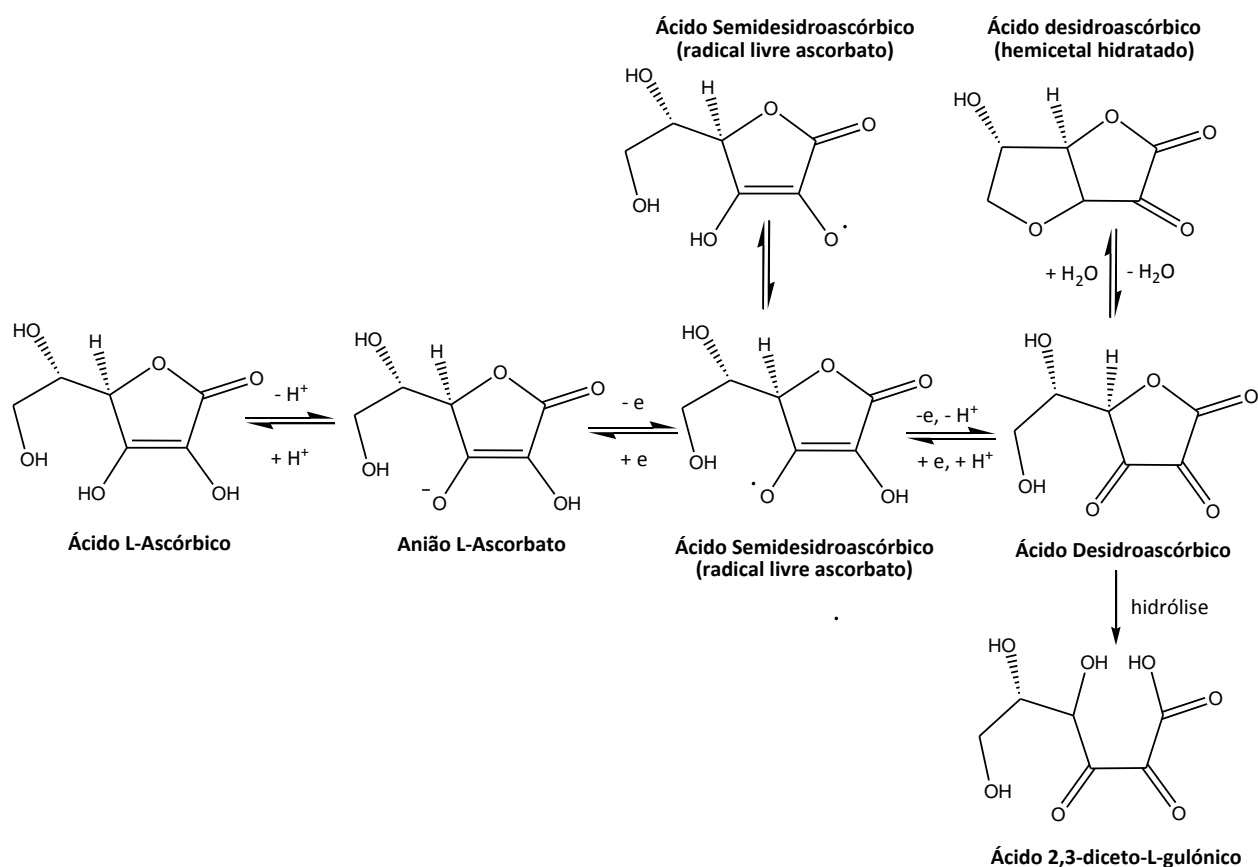


Figura 2 - Reacções de oxidação/redução do ácido L-ascórbico e produtos resultantes. O L-AA, como um agente redutor, doa sequencialmente dois electrões formando o intermediário radical ascorbato (ácido semidesidroascórbico). Devido à sua elevada instabilidade, esta molécula sofre uma oxidação adicional para formar um produto mais estável, o ácido desidroascórbico, que apresenta mais do que uma forma estrutural. A hidrólise do DHAA, com ruptura do anel, origina o ácido 2,3-diceto-L-gulónico (DKG) (adaptado da fonte:[14]).

Deste modo, o L-AA e DHAA constituem um par redox (AA/DHAA), pois o DHA pode ser reduzido a L-AA e depois rapidamente oxidado, funcionando em simultâneo como um agente redutor (antioxidante) e oxidante [9, 10].

O DHAA é também uma molécula bastante instável em solução aquosa e a sua hidrólise origina o ácido 2,3-diceto-L-glucónico (DKG). Esta reacção é irreversível, pois ocorre a abertura do anel da lactona. Além disso, o DKG não apresenta qualquer actividade biológica. O tempo de semi-vida do DHAA em pH fisiológico (aproximadamente 7,4) é menos de 10 minutos [3, 5]. No entanto, o processo de degradação da vitamina C não termina aqui. Em condições adversas, o DHAA é rapidamente degradado noutros compostos. A sua degradação depende em muito da temperatura e pH do meio. Em soluções ácidas, origina o ácido L-tartárico, furfural e outros compostos derivados do furano. A degradação no meio alcalino resulta em mais de 50 compostos, sendo maioritariamente ácidos mono-, di- e tricarboxílicos [2, 9]. Nos sistemas biológicos, o DKG pode sofrer reacções de descarboxilação e redução originando produtos como o ácido oxálico, lioxónico e xilónico, lioxose e xilose (Figura 5) [1, 5, 9].

2.2.2.1. Ácido desidroascórbico

O ácido desidroascórbico (ácido treo-2,3-hexodiolosónico- γ -lactona) é a forma oxidada do L-AA e possui actividade vitamínica quase idêntica a este (cerca de 80%). Ambos os ácidos são componentes importantes da dieta humana, pois o DHAA é facilmente convertido a AA no meio intracelular. O DHAA pode existir como hemicetal hidratado (monómero), em solução aquosa, (solução aquosa) ou como dímero no estado cristalino (Figura 2) [1, 9]. Antigamente, o DHAA era considerado apenas como um produto da oxidação do AA em vez de uma espécie com as suas próprias características químicas e biológicas importantes. Hoje em dia sabe-se que o DHAA tem várias propriedades que o distinguem do AA. Por exemplo, é relativamente hidrofóbico, penetrando mais facilmente nas membranas celulares, e é mais reactivo e instável em solução aquosa que o AA [9, 15].

O ácido desidroascórbico (174,1 g/mol) pode ser facilmente reduzido *in vivo* de volta a ácido ascórbico (Figura 2) por uma variedade de processos que envolvem enzimas mas também, o NADH ou NADPH e glutationa (*L*- γ -glutamil-*L*-cisteinilglicina, GSH) em reacções redox (sistemas não enzimáticos) [6, 9]. As enzimas envolvidas na redução *in vivo* do DHAA incluem a tioredoxina reductase (EC 1.8.1.9.), glutationa-peroxidase (E.C. 1.11.1.9, GSH-px), GSH-reductase (EC 1.8.1.7.), monodesidroascorbato reductase (EC 1.6.5.4) e desidroascorbato reductase (1.8.5.1.) [1, 15].

Os estudos *in vitro* utilizam com sucesso o dimercaptopropanol (BAL), mercaptoetanol, homocisteína, bromina, DL-1,4-diotreitól (DTT), ou tris-[2-carboxi-etil] cloridrato de fosfina (TCEP) como agentes redutores [9, 13].

2.3. Síntese e Biodisponibilidade da vitamina C

2.3.1. Biosíntese do Ácido L-Ascórbico

O ácido L-ascórbico é amplamente sintetizado na natureza. As plantas que contém clorofila, algumas algas verdes e animais como os anfíbios, aves, répteis e poucos mamíferos são capazes de produzir o seu próprio ácido ascórbico. A D-glucose é o principal precursor do AA usada pelos animais. A biosíntese ocorre no fígado e rins (órgãos armazenadores de glicogénio) através de um conjunto de reacções metabólicas (lactonização, oxidação, tautomerização) [5, 16]. O caminho do ácido D-glucorónico, nos animais, é um importante ciclo metabólico. As hexoses são transformadas por uma série de processos bioquímicos, via ácido D-glucorónico, a ácido L-ascórbico, L-xilulose, entre outros. Nesta via ocorre ainda a inversão da cadeia de carbonos dos derivados da D-glucose [2, 3]. No caso dos animais o ácido L-gulónico é o precursor do ácido L-ascórbico. Esta via não ocorre nas plantas, daí que os precursores do L-AA sejam diferentes [2, 3, 6]. Os insectos, invertebrados, a maioria dos peixes e seres humanos são incapazes de sintetizar o ácido ascórbico. A última reacção enzimática para a biossíntese do ácido ascórbico nos microsomas hepáticos não ocorre nos primatas. Esta etapa corresponde à oxidação do L-gulono- γ -lactona a 2-ceto-L-gulono- γ -lactona pela enzima L-gulono-1,4-lactona oxidase (EC1.1.3.8). O gene que codifica esta enzima nos humanos não é expresso, logo a enzima está ausente. Deste modo, os humanos não conseguem transformar a glicose do sangue em ácido ascórbico. Como o ácido ascórbico participa em inúmeras actividades fisiológicas, torna-se um componente essencial para a saúde humana [1-3, 16].

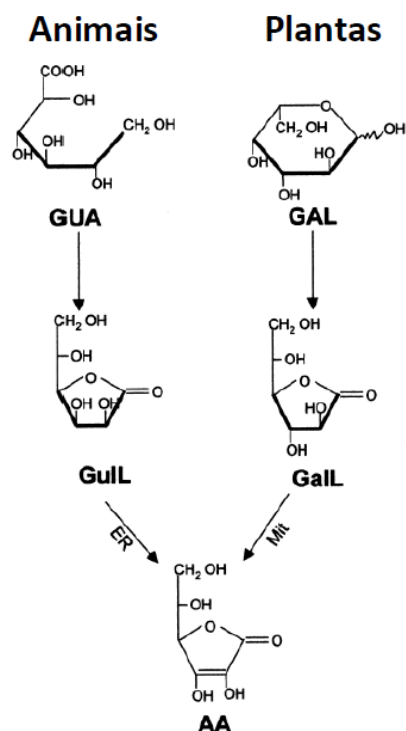


Figura 3 - Comparação da biossíntese do L-AA em diferentes organismos. Apenas os últimos dois passos da síntese nos animais e plantas são ilustrados. O precursor imediato do L-AA é o L-gulono-lactona (GulL) e L-galactono-lactona (GalL) nos animais e plantas, respectivamente. A conversão ocorre em sítios diferentes: retículo endoplasmático (ER) nos animais e mitocôndrias (Mit) no caso das plantas. GUA: ácido L-gulónico; GAL: L-galactose (adaptado da Fonte: [6]).

A síntese do ácido ascórbico nas plantas é mais complexa que nos animais. Esta ainda não está totalmente elucidada ao contrário dos animais que foi estabelecida nos anos 60 [3, 6]. O L-AA é sintetizado nas plantas a partir dos açúcares resultantes da fotossíntese, sendo a L-galactose o precursor desta molécula nas plantas [3, 8, 16]. Neste caso, não se verifica a inversão da cadeia de carbonos e o último passo da reacção é a conversão da L-galactono-1,4-lactona a ácido L-ascórbico pela acção da enzima L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (EC 1.3.2.3) [6, 16].

2.3.2. Síntese Química do Ácido L-Ascórbico

A vitamina C disponível em suplementes vitamínicos pode ser directamente extraída de plantas ou sintetizada a partir da glicose, pelo processo clássico Reichstein-Grussner [1]. A síntese química do ácido L-ascórbico envolve várias etapas, nomeadamente hidrogenação da D-glucose originando D-sorbitol seguida da oxidação desta molécula a L-sorbose pela bactéria *Acetobacter suboxydans* (fermentação). Posteriormente, um grupo carboxilo é introduzido na molécula com a derivatização para L-sorbose-diacetona [1, 2]. A hidrólise desta molécula e subsequente aquecimento em meio ácido resulta no ácido L-ascórbico, que pode ser depois cristalizado [1, 2]. Uma abordagem biológica envolve o uso da enzima L-sorbose desidrogenase, que converte directamente poliálcoois, como L-sorbose, a L-AA e ácido 2-ceto-L-gulónico [1]. Muitos dos derivados do ácido ascórbico têm sido preparados sinteticamente. No entanto apresentam pouca ou nenhuma actividade biológica. Por exemplo, o ácido 6-desoxi-L-ascórbico e o ácido 2-amino-2-desoxi-L-ascórbico, possuem respectivamente 30% e 0% da actividade do ácido ascórbico. Já o 2-fosfato-L-ascorbato tem actividade comparável à do ácido L-ascórbico e é aproximadamente 10 - 20 vezes mais estável em relação ao oxigénio [3, 5].

2.3.3. Biodisponibilidade do Ácido L-Ascórbico

A principal fonte do AA e DHAA na nutrição humana são os alimentos de origem vegetal, onde o AA é a forma predominante da vitamina C [8]. No plasma, a quase totalidade da vitamina C encontra-se ionizada, na forma do anião ascorbato (concentrações 50 - 100 µM). A biodisponibilidade do ascorbato no organismo depende da sua absorção no tracto gastrointestinal para o sangue. Cerca de 80-90% da vitamina C consumida é absorvida pelo intestino delgado, por transporte activo e passivo, sendo menor na boca e estômago [5]. A utilização do L-AA como antioxidante ou cofactor enzimático provoca a sua oxidação a DHAA.

A concentração do DHAA no plasma é baixa (5 - 7% da vitamina C total plasmática), mas pode ser aumentada em condições de stress oxidativo [15, 17]. O ácido ascórbico distribui-se amplamente em todos os tecidos do organismo. A vitamina C não é armazenada no organismo, mas alguns tecidos como a glândula supra-renal, hipófise e fígado são ricos em AA. Os músculos e tecido adiposo apresentam teores de AA menores [5]. A relação AA/DHAA tem sido utilizada como indicador do estado da oxidação celular [11]. As concentrações de ácido ascórbico no plasma e leucócitos são frequentemente usadas para avaliar os níveis de vitamina C presentes no organismo. Análises ao sangue que revelem níveis de ácido ascórbico e de leucócitos abaixo de 0,2 mg/dL e 2 mg/10⁸ células no plasma, respectivamente, indicam um consumo deficiente de vitamina C [3, 4].

Em comparação com os níveis no plasma, os níveis de DHAA nos tecidos são muito mais elevados. O transporte do DHAA do sangue para as células ocorre por difusão passiva através dos transportadores da glicose. Este atravessa a membrana plasmática mais rapidamente que o L-AA, pois no último caso o transporte ocorre contra o gradiente de concentração (transporte activo). Uma vez no interior destas células, o DHAA é facilmente convertido a AA. Esta reacção ocorre em todos os tecidos por mecanismos enzimáticos ou não enzimáticos provocando a acumulação do L-AA nos tecidos. Esta acumulação é máxima quando as células necessitam de protecção adicional contra os oxidantes resultantes do seu metabolismo [15, 17]. A redução do DHAA a AA mantém os níveis de DHAA no citoplasma baixos, originando um gradiente favorável à absorção contínua da forma oxidada da vitamina C através da membrana celular [15]. Os sistemas de reciclagem são essenciais para a conservação dos níveis intracelulares do AA. Desta forma, a vitamina C mantém-se na forma reduzida e capaz de exercer as suas funções bioquímicas (Figura 4) [1, 4, 15].

Condições patológicas como a diabetes influenciam o transporte celular do ascorbato, pois os elevados níveis de açúcar competem com L-AA pelos mesmos transportadores. Consequentemente, a concentração intracelular desta molécula diminui, afectando todos os outros processos metabólicos [1, 15].

Os principais metabolitos do ácido ascórbico (catabolismo) nos humanos são o ácido desidroascórbico, DKG e ácido oxálico. A principal via de eliminação do AA e seus metabolitos é através da urina e fezes [5].

2.4. Funções Bioquímicas e Fisiológicas da vitamina C

Os efeitos benéficos da vitamina C são quase universalmente reconhecidos. O ácido ascórbico e o ácido desidroascórbico participam numa ampla gama de reacções e processos bioquímicos, baseados nas suas propriedades redox [6, 11]. A oxidação do AA a DHAA fornece dois átomos de hidrogénio que podem ser usados na redução de compostos biologicamente activos [8, 17].

2.4.1. Cofactor Enzimático

O ácido L-ascórbico está envolvido num grande número de reacções bioquímicas, sendo necessário para a actividade óptima de várias enzimas e processos metabólicos. O ácido L-ascórbico é o cofactor de diversas metaloenzimas (mono- e dioxigenases) funcionando como doador de electrões. Essas enzimas participam na hidroxilação do colagénio, biosíntese da carnitina, hormonas esteróides, neurotransmissores e aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) [4, 5, 10]. O ácido ascórbico potencia a actividade destas enzimas ao manter o seu centro activo metálico (ferro ou cobre) reduzido [1].

O ácido ascórbico desempenha um papel importante na manutenção do colagénio, que representa cerca de um terço da proteína corporal total, constituindo a principal proteína da pele, ossos, dentes e cartilagens, tendões, vasos sanguíneos e córnea. A vitamina C é um factor essencial no metabolismo da matriz extracelular e a sua deficiência afecta a síntese do colagénio e dos demais componentes do tecido conjuntivo (lamina, integrinas, elastina) [1]. Desempenha um papel crítico na reparação das feridas ao estimular o processo de cicatrização/regeneração dos tecidos. Muitos dos sintomas do escorbuto são atribuídos ao enfraquecimento da biossíntese do colagénio [4, 5]. A vitamina C afecta também a regulação e expressão das proteínas da matriz extracelular. O ascorbato é o cofactor de enzimas importantes que participam nas modificações traducionais das proteínas da matriz e, influencia também a regulação da transcrição destas proteínas. No caso do colagénio e elastina, os efeitos do ascorbato são pós-traducionais e possivelmente transcricionais [1, 17]. A hidroxilação da prolina e lisina pelas enzimas prolina hidroxilase (EC 1.14.11.28) e lisina hidroxilase (EC 1.14.11.4), respectivamente, é um passo determinante na síntese do colagénio [5, 6]. A redução do ferro é obrigatória para a coordenação com o oxigénio, o principal co-substrato das mono- e dioxigenases. No entanto, o papel da vitamina C na expressão genética do colagénio ainda não está totalmente esclarecido, pois são vários os factores que podem ter impacto na expressão dos genes [1, 6].

O ácido ascórbico parece ter um efeito indirecto sobre a transcrição dos genes do colagénio, pois esta é induzida pelo colagénio maduro [6]. A transcrição da tirosina hidroxilase (EC 1.14.16.2) e do mRNA, que codifica diversas formas do citocromo P450 e ubiquitinas nos microsomas do fígado, são reforçadas pelo ácido ascórbico [1, 6, 17]. Outros mRNAs cuja transcrição parece ser regulada pelo ácido ascórbico incluem as integrinas relacionadas com o colagénio, a collagenase tipo IV (72 kDA) e nas plantas, o gene *Hrgp* do milho [1, 6]. É interessante notar que pelo menos uma parte dos genes que têm sua transcrição induzida pelo AA codificam proteínas que contêm resíduos de prolina hidroxilados ou necessitam do AA para a sua actividade catalítica [6].

O ácido ascórbico é essencial para a síntese da carnitina muscular [5]. Funciona como um co-factor das duas enzimas responsáveis pelas hidroxilações envolvidas na biosíntese da carnitina. A fadiga e fraqueza provocada pelo escorbuto estão associadas com o incorrecto funcionamento desta enzima [1, 6]. O ácido ascórbico intervém na acção da enzima dopamina- β -hidroxilase (E.C. 1.14.17.1), que catalisa a conversão do neurotransmissor dopamina a norepinefrina, durante a síntese da catecolamina [4, 5]. Estudos recentes mostram que a vitamina C é essencial na amidação enzimática dos neuropeptídeos formando compostos bioactivos no cérebro e sistema nervoso periférico. Além disso, o ácido ascórbico catalisa outras reacções enzimáticas importantes para a actividade máxima das hormonas ocitocina, vasopressina e adrenalina [5]. A função do ascorbato reside em manter o cobre do complexo enzimático num estado reduzido [1, 4, 5]. Isto explica em parte a existência de elevadas concentrações de L-AA nos tecidos nervosos e glândulas adrenais [1].

O ácido ascórbico é também necessário para a transformação do colesterol em ácidos biliares. Um consumo insuficiente de ácido ascórbico resulta na acumulação de colesterol no fígado, hipercolesterolemia, e formação cálculos biliares [5].

A vitamina C exerce também efeito no controlo da glicemia em pessoas portadoras de diabetes. A absorção da vitamina C é facilitada pela insulina reduzindo assim a acumulação de sorbitol nos eritrócitos. Complicações derivadas da diabetes como gengivites e dificuldade de cicatrização podem ser atenuadas com a vitamina C [15, 18].

O benefício mais conhecido para a saúde do consumo do ácido ascórbico é na profilaxia ou o alívio dos resfriados comuns, popularmente conhecidos como “constipações”. Pauling [7] sugeriu que a ingestão de doses maciças de vitamina C previne/ ameniza os sintomas das constipações comuns. Após a publicação do seu livro, a utilização da vitamina C para o tratamento de resfriados tornou-se muito popular. No entanto, o papel da vitamina C

por via oral na prevenção e tratamento das gripes e resfriados permanece controverso, apesar dos muitos estudos realizados. Tem havido um longo debate sobre o papel do ácido ascórbico no aumento da imunidade durante infecções gripais. Os estudos não são conduzidos todos com o mesmo rigor o que dificulta as suas conclusões e comparações [5]. A evidência mais consistente mostrou que o ácido ascórbico reduziu a gravidade e duração dos sintomas dos resfriados durante o período de infecção. Não apresenta, portanto, um efeito profilático significativo. Isto é apoiado pelo facto do L-AA acelerar a destruição da histamina (anti-histamínico), um mediador das alergias e dos sintomas dos resfriados [1, 5]. Estudos realizados demonstraram que o L-AA promove a proliferação de células-T, aumentando assim resposta do sistema imunitário contra infecções [5]. Outro papel do ascorbato na função imunitária é a sua participação na formação do peróxido de hidrogénio, utilizado pelos neutrófilos como mecanismo de defesa [1].

2.4.2. Antioxidante

O stress oxidativo tem uma contribuição importante no desenvolvimento de inúmeros processos degenerativos e doenças crónicas. O papel da vitamina C como um antioxidante *in vivo* tem recebido muita atenção nas últimas décadas [5]. A vitamina C é um antioxidante importante pois diminui significativamente a toxicidade dos radicais livres produzido pela respiração celular. O excesso destes produtos está associado com a oxidação de várias macromoléculas como os lípidos, DNA e proteínas [1, 5, 6]. As células lidam com o excesso de oxidantes através de vários mecanismos. O ácido L-ascórbico faz parte do conjunto de antioxidantes no qual está incluindo a vitamina E, β -caroteno, luteína, licopeno e os flavonóides. Estas moléculas juntamente com um grupo de enzimas (superóxido dismutase, catalase, peroxidase, entre outros), constituem a primeira linha de defesa do organismo contra a oxidação fisiológica [10]. O L-AA inactiva os radicais livres, eliminando as suas reactividades e protegendo as células. O ascorbato é capaz de actuar efectivamente sobre espécies reactivas de oxigénio e azoto (ROS, RNS), tais como o anião radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical alquilo (RO^{\bullet}), radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$), peróxidos (RO_2^{\bullet}), oxigénio singleto (1O_2), dióxido de azoto (NO_2^{\bullet}), hipoclorito (ClO^{\bullet}), entre outros [4, 5].

A actividade antioxidante da vitamina C envolve a doação de um ou dois electrões a várias moléculas. O ascorbato doa um H^{\bullet} ou $[H^+ + e^-]$ para um radical, resultando na formação do anião semidihidroascorbato (ou radical ascorbato) e posteriormente no DHAA. O DHAA é depois reciclado por vários sistemas enzimáticos ou não enzimáticos [1-3]. A GSH é um importante antioxidante presente nas células, sendo o principal responsável pela regeneração

do L-AA (ou anião ascorbato). Deste modo, mantém os níveis intracelulares do AA constantes além de neutralizar algumas espécies reactivas [1, 2]. O papel do AA nos sistemas biológicos, como antioxidante, está ilustrado na Figura 4.

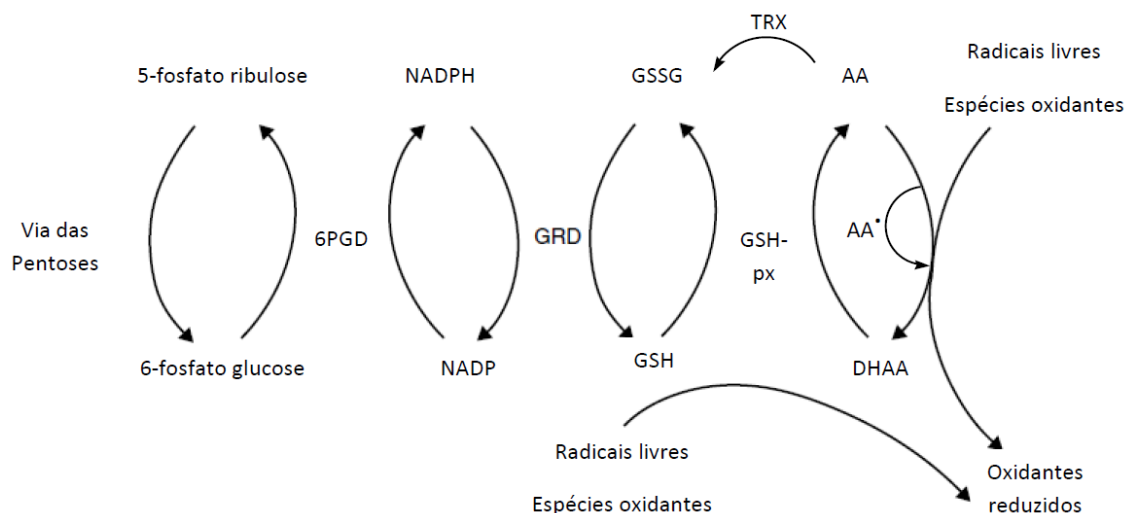


Figura 4 - Interação entre o ácido ascórbico e a glutatona. O excesso de oxidantes pode ser reduzido directa ou indirectamente pelo AA e GSH. A glutatona, e outros agentes redutores derivados da via das pentoses, como o NADPH, são responsáveis pela redução do DHAA e consequente reciclagem do AA intracelular. Estes agentes redutores funcionam também como antioxidantes, protegendo as células dos danos oxidativos. A redução do DHAA envolve duas moléculas de GSH através da GSH-peroxidase (GSH-px). A GSH oxidada (GSSG) é reduzida de novo a GSH pela acção da GSH reductase (GRD). Simultaneamente, esta enzima promove a oxidação do NADPH a NADP. Além dos agentes redutores fornecidos pela via das pentoses, a regeneração da GSSG pode ser feita pela oxidação do AA, catalisada pela TRX (tioredoxina). 6PGD: 6-fosfatoglucanato desidrogenase; GRX: glutatona-peroxidase; AA^{*} : radical ascorbato (adaptado da Fonte: [1]).

Graças a este sistema redox, a vitamina C opera na máxima eficácia, permitindo que outros sistemas de enzimas possam tirar vantagem da sua capacidade antioxidante [1]. Pode também actuar directamente nas membranas celulares, ao impedir a iniciação da peroxidação lipídica ou indirectamente ao regenerar a vitamina E que actua como antioxidante [1, 4, 11]. O ácido ascórbico funciona como co-antioxidante pois é capaz de regenerar outras moléculas antioxidantes como a vitamina E (α -tocoferol), ácido úrico e o radical β -caroteno [1, 4, 5]. A vitamina E parece reagir primeiro com os radicais livres, sendo depois regenerada pela vitamina C. O ácido ascórbico reduz o radical α -tocoferoxil a α -tocoferol, prevenindo a formação deste radical mediante reacções de peroxidação lipídica. Desta reacção resulta o DHAA, que é reciclado de volta a AA [4, 5, 10].

A vitamina C previne a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), impedindo a peroxidação lipídica e colabora na redução do risco de arteriosclerose. A vitamina C reage mil vezes mais rapidamente com os radicais feroxilo do que os ácidos gordos polinsaturados. No

entanto, não é tão eficaz a neutralizar os radicais hidroxilo [1, 5]. Além disso, estudos *in vivo* provaram que o ácido ascórbico reduz a adesão dos leucócitos às células endoteliais das artérias e vasos sanguíneos. A interacção entre estas células é um passo importante no desenvolvimento da arteriosclerose [5, 6]. Embora os dados sejam limitados, o L-AA extracelular parece fornecer alguma protecção às proteínas plasmáticas e ao DNA contra a oxidação fisiológica [1, 17].

Vários estudos analisaram a associação entre a ingestão do ácido ascórbico e o risco de desenvolver doenças cardiovasculares. No entanto, nenhuma evidência conclusiva está disponível sob o possível efeito protector da suplementação com ácido ascórbico sobre as patologias do sistema cardiovascular [5].

Pauling também afirmava que a ingestão diária de elevadas doses de ácido ascórbico auxiliava no tratamento do cancro [5, 7]. As evidências recentes sugerem que a acção da vitamina C por si só não é suficiente no tratamento da maioria dos cancros activos. Parece ter um efeito mais preventivo do que curativo. Actualmente acredita-se que o ácido ascórbico previne o cancro, neutralizando os radicais livres antes que estes possam danificar o DNA e iniciar o crescimento do tumor [1, 5]. Uma das descobertas epidemiológicas mais consistentes sobre a vitamina C está associada ao risco reduzido de cancro do estômago devido ao consumo elevado de ácido ascórbico ou alimentos ricos neste nutriente. Provas bioquímicas e fisiológicas sugerem que as funções do ácido ascórbico como esponja de radicais livres oferecem uma protecção contra o cancro do estômago. O L-AA bloqueia a produção de nitrosaminas, compostos nitrogenados potencialmente carcinogénicos, originando ácido desidroascórbico e óxido nítrico [5, 10].

Em certas condições (baixas concentrações *in vitro*, presença de iões metálicos), o L-AA tem actividade pró-oxidante, onde actua como agente redutor para fornecer catalisadores para a reacção de Fenton. Desta reacção resultam as mesmas espécies químicas reactivas que era suposto o L-AA neutralizar ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, H_2O_2). A existência e a relevância fisiológica da natureza pró-oxidante do L-AA *in vivo* têm sido questionadas, pois normalmente os metais encontram-se associados às proteínas no organismo. Apenas em casos excepcionais, como talassemia ou hemonecrose, em que a concentração de metais livres no sangue aumenta pode-se verificar esta hipótese. No entanto, não existem dados concretos que confirmem este efeito [2, 17].

Outras funções incluem a transformação de xenobióticos e facilitação da absorção intestinal do ferro. Este mecanismo envolve a capacidade do AA em reduzir o ferro do estado de oxidação férrico (+3) para o ferroso (+2) que é mais facilmente absorvido [2, 4, 5].

A adição artificial do ácido L-ascórbico é utilizada com sucesso na indústria alimentar para proteger os alimentos contra a oxidação (efeito antioxidante), contribuindo para a conservação/preservação dos alimentos [4, 5].

O ascorbato é também um composto essencial para as plantas, com um papel importante no combate ao stress oxidativo e como um modulador do desenvolvimento das plantas através da síntese de hormonas (giberelinas, etileno e ácido abscísico) [6, 16]. Nas plantas, esta molécula encontra-se em concentrações relativamente elevadas (2- 25 mM) e actua na desintoxicação dos peróxidos. A enzima ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11) catalisa a redução do peróxido de hidrogénio a água, usando o ascorbato como agente redutor [1]. Actua também nos mecanismos de protecção dos cloroplastos e contribui para o crescimento das plantas, diferenciação e metabolismo. A sua capacidade de doar electrões é significativa no ciclo respiratório das plantas. Nalgumas espécies de plantas, o ácido ascórbico é ainda o substrato para a síntese do ácido oxálico e ácido tartárico e alguns flavonóides [3, 6, 10]. Na Tabela 2 encontra-se uma lista com os principais papéis fisiológicos da vitamina C e enzimas intervenientes.

Tabela 2 - Funções Bioquímicas do Ácido L-Ascórbico e as principais enzimas que utilizam esta molécula como cofactor e/ou modulador da sua actividade. A sua função como cofactor enzimático, em animais e plantas, está muito bem descrita. As funções postuladas da vitamina C foram demonstradas *in vitro* mas a sua relevância *in vivo* ainda está por esclarecer. Estas baseiam-se na sua característica de agente redutor (Adaptado das Fontes: [1, 3, 5]).

Cofactor enzimatico		Agente redutor/ Antioxidante	
Enzimas	Função das enzimas	Local	Função
Prolina 4-hidroxilase; Lisina hidroxilase	Hidroxilação do colagénio	Células	Regula a expressão genética do colagénio (modificações pós-traducionais do mRNA); previne danos oxidativos nas proteínas intracelulares; evita ou reverte a oxidação da glutatona e vitamina E .
Trimetil-lisina hidroxilase	Biosíntese da carnitina		
Dopamina- β -monooxigenase	Biosíntese da noroepinefrina	Plasma	Neutralização de ROS e RNS; termina as reacções de peroxidação lipídica.
Peptidilglicina monooxigenase	Biosíntese da catecolamina		
4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase	Amidação de hormonas péptídicas	Estômago	Previne a formação de compostos nitrosos.
		Intestino	Facilita a absorção do ferro.

Apesar da maioria dos efeitos fisiológicos da vitamina C serem atribuídos ao L-AA, o DHAA também apresenta algumas funções celulares próprias. Estas incluem a inibição competitiva pelos transportadores de glicose, hexocinase, 3-fosfato-gliceraldeído desidrogenase, 6-fosfato-glucose desidrogenase; a oxidação e estimulação da síntese do NADPH e GSH; e constitui a principal fonte do L-AA intracelular [9, 15]. Por todas as razões descritas anteriormente, a vitamina C, presente em muitas frutas e vegetais, constitui um nutriente indispensável à dieta humana.

2.5. Vitamina C nos alimentos

2.5.1. Fontes e requerimentos do Ácido L-Ascórbico

A vitamina mais importante para a nutrição humana é a vitamina C [8, 11]. Não é difícil obter um fornecimento adequado na dieta diária, pois o ácido ascórbico encontra-se amplamente distribuído no reino vegetal: frutas (goiaba, limão, maracujá) e vegetais e legumes frescos (brócolos, salsa, pimentões). Mais de 90% da vitamina C na dieta humana é fornecida por estes dois grupos de alimentos. O seu teor em alimentos de origem animal é muito reduzido. Produtos lácteos, carnes e grãos de cereais são pobres em vitamina C [4, 11]. Uma vez que o L-AA e DHAA são as formas da vitamina C mais abundantes nos alimentos e possuem actividades biológicas equivalentes nos seres humanos, o teor de vitamina C nos alimentos deve ser relatado como vitamina C total, isto é, a soma dos conteúdos de L-AA e DHAA (L-AA + DHAA). Caso contrário, o conteúdo deste nutriente nos alimentos pode ser subestimado [12, 13, 19]. Na Tabela 3, encontram-se os teores de vitamina C de alguns alimentos e foi construída a partir da informação recolhida de diferentes bases de dados da composição dos alimentos (FCDB).

De acordo com a tabela seguinte, as frutas constituem a fonte mais comum do ácido ascórbico, sendo encontradas quantidades relativamente elevadas de vitamina C na acerola com aproximadamente 1300 - 1677 mg/100g de fruta. Esta fruta garante um excelente suplemento natural de vitamina C. No caso dos vegetais, a família das *Brassicaceae* (repolho, couve bruxelas, brócolos, couve-flor) é particularmente rica em ácido ascórbico (35 -158 mg/100g). Outras fontes significativas incluem os pimentões verdes e vermelhos, salsa e goiabas. No entanto, nem todos os frutos contêm níveis tão altos, por exemplo, as maçãs e as pêras representam uma fonte moderada do nutriente (2 - 31 mg/100g). Já as cebolas e as cenouras apresentam um conteúdo baixo (3 - 14 mg/100g).

Tabela 3 - Conteúdo de vitamina C em algumas frutas e vegetais (Fontes: [20-23]).

Fonte	Conteúdo de vitamina C (mg/100g produto)	Fonte	Conteúdo de vitamina C (mg/100g produto)
Acerola	1300 - 1677	Toranja	30 - 71
Salsa	246 - 358	Maracujá	30
Goiaba	173 - 283	Mango	28– 36
Pimento Vermelho	128 - 240	Rabanete	22 - 50
Groselha preta	113 - 255	Ananás	20– 48
Rábano	102 - 260	Espinafre	18 - 86
Couve de Bruxelas	85 - 158	Framboesa	14 - 38
Pimentos Verde	80 - 154	Batata	10 - 40
Brócolos	87 - 133	Anona	10 – 13
Kiwi	77 - 118	Feijão-verde	10 - 21
Papaia	62	Uva	9 - 13
Couve-flor	50 - 103	Amora	6 - 24
Morango	44 - 109	Banana	6 - 16
Agrião	40 - 80	Cebola	5 - 14
Couve	37 - 88	Pepino	3 - 15
Laranja	35 - 79	Cereja	3 - 20
Limão	35 - 62	Maçã	3 - 31

É de notar que em termos da contribuição relativa dos alimentos na dieta, não é só os níveis de nutrientes que importam, mas também, o nível de consumo do alimento [1, 3, 8]. Por exemplo, a salsa é muito mais rica que a batata em vitamina C mas o seu consumo mássico é muito inferior. Devido ao seu alto consumo, as batatas, couves e citrinos são provavelmente as fontes principais de vitamina C para a maioria da população ocidental [1, 8]. Um regime de alimentação saudável recomenda o consumo de várias doses de fruta e ou legumes frescos diariamente. O maior consumo de frutas e vegetais está associado com a redução do risco de doenças cardiovasculares, bem como de vários cancros. A evidência científica de que dietas ricas em frutas e hortaliças protegem contra o cancro e doenças degenerativas é cada vez mais forte e consistente apoiada pela identificação dos diversos fitoquímicos que apresentam actividade antioxidante nestes alimentos [24-26]. As vitaminas C, natural e sintética, encontra-se disponível numa ampla variedade de suplementos, comprimidos, cápsulas e líquidos. Ambas são quimicamente idênticas e possuem a mesma actividade biológica e biodisponibilidade [4, 5].

Actualmente os casos de escorbuto são muito raros. As frutas e vegetais estão disponíveis ao longo de todo o ano nos países industrializados. A carência desta vitamina nos países industrializados, está normalmente associada a casos de pobreza ou alcoolismo [5]. As necessidades diárias mínimas de vitamina C para evitar os sintomas do escorbuto num adulto são 40 mg/dia. Nos Estados Unidos da América (E.U.A.), a ingestão média diária recomendada para o ácido ascórbico foi revista no ano 2000, e está fixada em 90 e 75 mg para homens e mulheres adultos, respectivamente (Tabela 4) [4, 5]. Este valor é suficiente para atender às necessidades nutricionais em ácido ascórbico. Segundo os relatórios mais recentes da literatura científica, tem sido recomendada a ingestão de 100 - 120mg/dia de ácido ascórbico devido ao stress da vida moderna [8]. No caso dos fumadores, sujeitos a um maior stress oxidativo, a recomendação é > 200 mg/dia (cerca de 40% maior) de modo a manter os níveis no plasma equivalentes ao dos não fumadores [1, 4, 8]. A Tabela 4 apresenta as doses diárias recomendadas da vitamina C para crianças e adultos de ambos os sexos e leva em consideração a idade e o estado fisiológico do indivíduo.

Tabela 4 - Doses diárias recomendadas para a vitamina C (Fontes: [4, 27]).

Dose Diária Recomendada – vitamina C			
Fase da vida	Idade	Homens (mg/dia)	Mulheres (mg/dia)
Bebés	0-6 meses	40	40
Bebés	7-12 meses	50	50
Crianças	1-3 anos	15	15
Crianças	4-8 anos	25	25
Crianças	9-13 anos	45	45
Adolescentes	14-18 anos	75	65
Adultos	≥ 19 anos	90	75
Grávidas	-	-	80-120

2.5.2. Variações do conteúdo de vitamina C entre os alimentos

O conteúdo nutricional dos alimentos está sujeito a variações durante o crescimento e desenvolvimento dos frutos e a quantidade de ácido ascórbico não é excepção. O seu teor varia inter e intra-espécies e é afectado por vários factores pré e pós-colheita: condições climáticas, métodos de cultivo, tipo de solo, grau de amadurecimento, manuseamento na colheita, transporte e armazenamento [3, 8]. Koh et al. [28] demonstraram que os níveis de vitamina C nos brócolos são influenciados pela época de cultivo. No seu estudo encontraram

uma variação sazonal significativa entre os produtos estudados (57 - 131mg/100 g brócolos). A posição do fruto na planta influencia o seu valor nutricional. Quanto maior a exposição e intensidade da luz solar durante o crescimento, maior o conteúdo da vitamina nos frutos e vegetais. Normalmente, os tecidos externos possuem níveis superiores de vitamina C para proteger o fruto do stress abiótico (luz, oxidação, entre outros) [8]. A temperatura média, nomeadamente o calor total disponível, também tem o seu papel na composição química dos alimentos. Por sua vez, o excesso de irrigação ou de fertilizantes contribuem para uma diminuição do teor de ácido ascórbico. O elevado teor de vitamina C pode servir como uma estratégia de protecção ao stress hídrico. As frutas acumulam ácido ascórbico durante o seu amadurecimento na planta ou após a colheita, mas o aumento é superior nos frutos que permanecem nas plantas. Isto acontece com os pêsegos, papaias, citrinos e pimentões. Já no caso das maçãs e mango verifica-se o contrário. Também as ervilhas maiores e mais maduras contêm menos vitamina C que as mais pequenas e verdes [8]. Parece não existir um padrão claro quanto ao efeito da maturação no teor de ácido ascórbico.

Os vegetais frescos têm uma durabilidade curta e estão expostos a condições que destroem a sua qualidade nutricional num curto período de tempo, antes da confecção e consumo [29]. Devem ser tomadas medidas que contribuam para a diminuição das perdas de vitamina C, nomeadamente, colher os produtos no momento ideal, prevenir os danos físicos durante a colheita e dirigir os produtos para o processamento o mais rapidamente possível [3].

2.5.3. Amadurecimento e perdas pós-colheita

O manuseamento pós-colheita, as condições de armazenamento e processamento têm grande influência sobre a taxa de degradação da vitamina C. A maioria das frutas são consumidas cruas e o baixo pH dos frutos estabiliza a vitamina durante o armazenamento [3, 12]. O ácido ascórbico é uma molécula susceptível à oxidação química e enzimática e a sua degradação pode ocorrer por via aeróbica ou anaeróbica. As taxas de degradação dependem da disponibilidade de oxigénio, contacto com a água, condições térmicas do processamento, metais de transição e luz. É considerada a mais instável e reactiva de todas as vitaminas, pois oxida-se facilmente a DHAA em condições desfavoráveis (Figura 5) [8]. Normalmente o DHAA encontra-se presente nos alimentos em pequenas quantidades (menos de 10% da vitamina C total). No entanto, as reacções de degradação do L-AA contribuem para o seu aumento gradual. O DHAA pode representar uma grande proporção da vitamina C total após um longo armazenamento, tratamentos mecânicos e/ou térmicos [30, 31]. Sucessivas oxidações do

DHAA originam o DKG e outros produtos de degradação (Figura 5). A interacção com outras substâncias presentes no alimento (açúcares, enzimas, entre outras) também pode afectar os níveis do L-AA. As enzimas ascorbato peroxidase (1.11.1.11) e ascorbato oxidase (EC 1.10.3.3.) são responsáveis pela degradação enzimática desta vitamina. A diminuição do teor da vitamina C pode ser catalisada pela lumiflavina (produto da degradação da riboflavina – vitamina B2) ou pela interacção com aminoácidos, originando pigmentos escuros (melanoidinas) [2, 4]. O AA participa em reacções de escurecimento não enzimático (reacção Maillard) de forma semelhante às que ocorrem com os açúcares. Através da reacção de Strecker, o DKG sofre ciclização, formando dióxido de carbono e furfural que se polimeriza e origina melanoidinas. Estas reacções são responsáveis pela alteração da cor dos sumos de fruta e dos alimentos, deterioração do sabor e da qualidade, aliada à redução dos prazos de validade e do teor de vitamina C [4, 30, 32]. Ocorrem principalmente em alimentos cozidos ou sujeitos a outros tratamentos térmicos. O 5-metil-3,4-dihidroxiterona (MDT) e o Hidroximetilfurfural (HMF) são alguns dos produtos da reacção de Maillard ocorrida nos alimentos durante o seu processamento (Figura 5). Estas substâncias são originadas devido à exposição dos açúcares a temperaturas altas em meio alcalino. O HMF é usado para avaliar a amplitude do aquecimento aplicada a sumos de frutas durante o processamento e tomados em consideração para o controle de qualidade [2, 30].

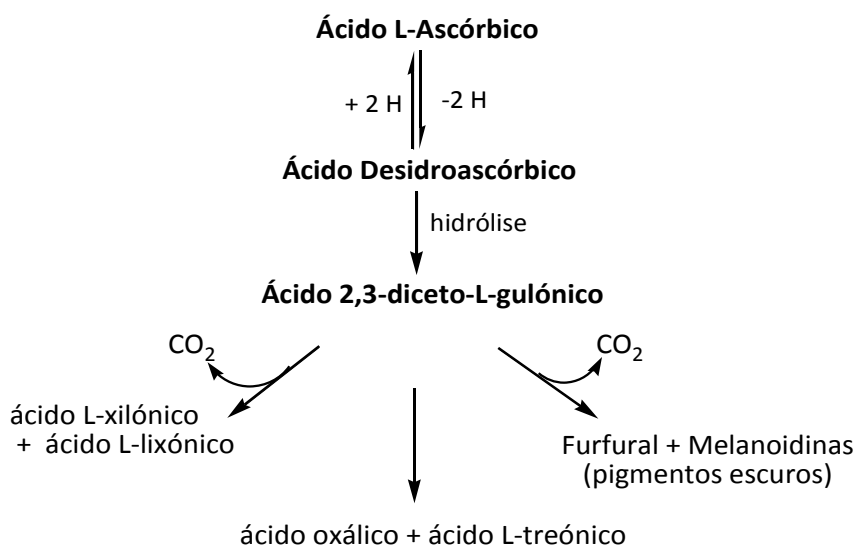


Figura 5 - Produtos da degradação do Ácido L-Ascórbico nos alimentos. Tendo em conta a sua instabilidade, o ácido ascórbico, é frequentemente utilizado como um indicador do valor nutritivo, mas também pode ser usado para estimar o estado de conservação dos alimentos em qualquer ponto da rota de comercialização de um produto até ao seu destino final, o consumidor (Adaptado das fontes: [3, 8]).

No geral, os frutos e vegetais recém-colhidos contêm mais vitamina C do que aqueles armazenados. Os atrasos entre a colheita, distribuição e processamento podem levar a perdas directas do conteúdo nutricional e do sabor. O valor nutricional dos produtos consumidos como “frescos” é muitas vezes bastante diferente daquele quando foram colhidos [3, 28].

2.5.4. Processamento e Armazenamento dos alimentos

A sazonalidade e perecibilidade dos produtos hortofrutícolas justificam a aplicação de métodos de conservação, cujo objectivo é combinar o aumento da vida útil, com manutenção das características sensoriais e nutritivas [29]. O ácido ascórbico é mais sensível à destruição quando o produto é submetido a tratamentos e condições de armazenamento adversos. As perdas são significativas pelo armazenamento prolongado, altas temperaturas, baixa humidade relativa, danos mecânicos e danos causados pelo frio. Com o tempo, verifica-se uma perda gradual do teor em ácido ascórbico dos alimentos armazenados. Os frutos mais ácidos são relativamente mais estáveis que outros frutos, como os morangos ou framboesas [31]. No caso dos vegetais, os espinafres são bastante vulneráveis enquanto as batatas mantêm a qualidade e vitamina C durante meses [8]. Comparando-se as retenções relativas de vitamina C, há dificuldade em produzir um modelo matemático da degradação da vitamina C quando se estuda diversos alimentos, pois a inter-conversão entre AA e DHAA varia enormemente. A temperatura de manuseamento/conservação é um factor determinante. O método de refrigeração/congelamento pós-processamento e flutuações de temperatura determinam a taxa de degradação e qualidade dos vegetais congelados [29]. O armazenamento à temperatura ambiente (20 °C) resulta em perdas maiores do que em temperaturas de refrigeração (4 °C). Por sua vez, este procedimento tem perdas superiores que a congelação (-20 °C). No entanto, mesmo com estas temperaturas negativas, a degradação da vitamina persiste. O congelamento inadequado provoca alterações evidentes nas características sensoriais que podem influenciar a aceitabilidade do consumidor, mas também leva a produtos de baixo valor nutritivo reduzido, principalmente em vitamina C [3, 29]. Um congelamento rápido pode também produzir perdas com a destruição dos tecidos vegetais pelos cristais de gelo. Uma alternativa pode ser conservando ou embalando os alimentos em vácuo ou em atmosfera controlada/modificada [8]. Na ausência de oxigénio não há influência adicional da catálise metálica na degradação da vitamina C. As operações de selecção, sanificação, descasca e fatiamento excessivo provocam o aumento da actividade enzimática e aceleram o processo de deterioração e conseqüentemente a perda da vitamina C. O ácido ascórbico é uma molécula lábil e pode ser destruída também através do processamento e

cozedura dos alimentos frescos. A conservação da vitamina C em alimentos processados necessita de muitos cuidados. A extensão do dano varia consoante os métodos e o tempos utilizados [3, 8, 33].

Os vegetais e frutas, quando processados, sofrem sempre perdas de nutrientes. Os métodos de processamento que envolvem calor e água, como o branqueamento e conservas, produzem grandes perdas da vitamina C por termodecomposição e lixiviação. Durante estes métodos ocorrem reacções químicas e bioquímicas dependentes da temperatura. Estas reacções são responsáveis não só pela destruição de microorganismos, mas também de nutrientes importantes como a vitamina C. Quanto maior a temperatura empregada maior a destruição das vitaminas. A desidratação e liofilização dos vegetais não são recomendadas pois resultam em perdas à volta dos 75% [3, 4]. Nos alimentos processados à base de frutas, as perdas são usualmente associadas com escurecimento não enzimático [30]. Sumos de frutas armazenados em garrafas e/ou latas contém um teor elevado de AA e um baixo nível de DHAA. Após a sua abertura, a exposição ao ar e armazenamento à temperatura ambiente contribuem para o aumento dos níveis do DHAA e DKG [8]. No entanto, a taxa de degradação do L-AA depende da composição da amostra, condições de processamento e diferentes embalagens utilizadas [34]. Um esquema dos produtos de degradação do AA é mostrado na Figura 5.

Durante o cozimento, a degradação da vitamina C é tão grande ou maior quanto aquela que ocorre durante o processamento dos produtos [3]. As perdas durante a cozedura dependem do grau de aquecimento, perdas por lixiviação, área exposta ao oxigénio e água, pH, presença catiões bivalentes e muitos outros factores que contribuam para a oxidação do ácido L-ascórbico em moléculas sem actividade biológica [1, 4]. No cozimento convencional as maiores perdas de vitamina C ocorrem por solubilização, já no caso do cozimento a vapor as perdas são devido à degradação térmica e enzimática [33]. A retenção do L-AA nos alimentos depende do método de confecção. Por exemplo, as perdas verificadas no cozimento pelo microondas são mínimas e maiores pelo sistema convencional [8, 25, 33]. No entanto, verifica-se que durante a confecção dos alimentos as perdas maiores verificam-se mais durante o seu manuseamento do que propriamente ao longo do cozimento [33]. Deve-se empregar o mínimo de água para o cozimento e diminuir o tempo de confecção dos alimentos para evitar grandes perdas nutricionais [3, 8].

O ácido L-ascórbico é amplamente utilizado como um aditivo alimentar, assumindo várias funções, nomeadamente, agente redutor, estabilizador do sabor e cor, melhoria da

textura das massa e farinhas, e principalmente para enriquecimento de vitamina C. Por causa da sua reactividade com os radicais livres, o AA comporta-se como um antioxidante típico, evitando a deterioração (rancificação) dos óleos vegetais, margarinas, etc. O ácido isoascórbico pode substituir o uso do AA, como conservante, em muitos alimentos. É sintetizado e utilizado comercialmente como antioxidante em carnes curadas de modo a prevenir a sua oxidação e descoloração [3, 4]. As formas sintéticas (2-fosfato-ascorbato e 6-palmitato-ascorbato) são também utilizadas na preservação dos alimentos. Os ésteres (derivados dos ácidos gordos) do ácido ascórbico são usados como antioxidantes em alimentos gordurosos (óleos vegetais, margarinas) devido ao seu carácter lipofílico, prevenindo a sua oxidação. O ascorbil palmitato é altamente eficaz em sinergia com outros antioxidantes, incluindo fenóis e tocoferóis, na preservação dos alimentos [4]. A vantagem da utilização das formas sintéticas é a sua maior resistência à oxidação; no entanto são pouco absorvidas pelo organismo [3, 5].

2.6. Métodos de Análise da vitamina C

À medida que se conhece melhor a relação entre a ingestão destes nutrientes e a saúde, torna-se importante uma análise precisa e específica do teor do nutriente nos alimentos [35]. O aumento do conhecimento sobre as potencialidades da vitamina C resultou numa procura enorme por alimentos e suplementos ricos nesta vitamina nos mercados. Consequentemente, surgiu uma grande variedade de métodos para quantificar o L-AA nestes produtos. Existem reportados, em literatura científica, diversos procedimentos que englobam titulações, métodos espectrofotométricos, fluorométricos, quimioluminescentes, electroforéticos, enzimáticos, bem como métodos cromatográficos [4, 34, 36, 37]. Infelizmente, nenhum deles é totalmente satisfatório. Todas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas pelo analista. A detecção do AA nos alimentos é um desafio analítico devido aos baixos níveis encontrados nas matérias-primas, às várias formas químicas e à instabilidade da vitamina C sob várias condições (calor, luz, pH alcalino, oxigénio, enzimas, entre outros) [11, 37]. Por outro lado, a presença de interferentes da matriz estudada podem afectar a detecção e/ou quantificação e inclusive contribuir para a degradação do L-AA [11, 13, 14]. A escolha do método para a análise desta molécula deve ter em conta os diferentes tipos de matrizes a serem analisadas e possíveis interferentes, tendo em conta recursos analíticos disponíveis. Embora a literatura esteja repleta de diferentes tipos de métodos diversificados para a análise da vitamina C, a procura por técnicas mais precisas e exactas continua [3, 11, 36].

2.6.1. Extracção da vitamina C

O primeiro e mais importante passo para a análise da vitamina C é a sua extracção. Para garantir que a análise subsequente é eficaz, é muito importante otimizar o processo de extracção da vitamina C principalmente quando se analisam amostras complexas, como as frutas e vegetais. Devido à sua natureza lábil, o principal objectivo dos procedimentos de extracção é a estabilização da vitamina C. O equilíbrio AA/DHAA é dependente da origem e manuseamento da amostra. O objectivo da análise é medir correctamente o conteúdo original da amostra sem deslocar artificialmente o equilíbrio entre as duas espécies [2, 38]. Devem ser tomadas precauções ao longo da extracção e análise para evitar a degradação e perda da vitamina C [10].

A natureza instável do L-AA e a influência da temperatura e pH na sua degradação devem ser tidos em conta na manipulação da amostra. A refrigeração das amostras aumenta a estabilidade do ácido L-ascórbico, sendo fundamental, conduzir a extracção a baixas temperaturas. No entanto, sem a acidificação do meio, a refrigeração dos extractos é insuficiente para prevenir a degradação da vitamina [2, 11]. O L-AA é facilmente oxidado sob condições alcalinas. Os reagentes mais populares na extracção são os ácidos (elevada força iónica), que suprimem a actividade metabólica após a disrupção celular e a degradação e hidrólise da vitamina C [4, 10]. O uso do pH ácido em torno de 2,1 é útil para a preparação das amostras, assegurando a estabilidade suficiente e recuperação do L-AA [11, 39, 40]. O ácido metafosfórico (MPA), ácido acético, ácido tricloroacético (TCA), ácido trifluoroacético (TFA), ácido oxálico (OA), ácido perclórico (PCA) e ácido sulfúrico são os agentes estabilizantes mais utilizados na extracção da vitamina C. Geralmente o MPA (HPO_3) é utilizado como principal extractor, mas é também comum a sua combinação com outros ácidos ou alguns modificadores orgânicos (metanol, etanol, acetonitrilo) [1, 2, 4, 10]. O uso do MPA, pode causar sérias interacções analíticas com a sílica da coluna (C18 ou fases ligadas $-\text{NH}_2$) resultando na deformação dos picos, desvios na linha de base e no tempo de retenção do analito [41]. Apesar da sua incompatibilidade com alguns procedimentos cromatográficos, continua a ser o extractor mais utilizado no tratamento das amostras antes da análise da vitamina C [1, 4].

O MPA é capaz de inactivar a ascorbato oxidase, prevenir a oxidação catalítica do L-AA pelos iões metálicos, e ajuda a clarificar o extracto ao precipitar as proteínas presentes na amostra [4, 37]. A adição de etanol ou acetona no extracto em MPA, precipita o amido solubilizado [4]. O amido é problemático na medida em que interfere com a titulação colorimétrica e ensaios fluorimétricos. Esta etapa é necessária para a análise de muitos

vegetais, incluindo batata, legumes e milho através de métodos espectroscópicos. A acetona é também útil para remover o dióxido de enxofre e metabissulfito de produtos de frutas desidratadas e sumos de frutas. Estes agentes redutores interferem, por exemplo, nas titulações que utilizam o corante 2,6-dicloroindofenol (DCIP) [4]. O tiosulfato de sódio provou ser um estabilizante mais eficaz que o metabissulfito de sódio e sulfito de sódio na prevenção da oxidação do L-AA [4]. Iwase et al [42, 43] testaram agentes menos comuns como a L-metionina, L-glutamato monossódico (MSG) e guanósina-5-monofosfato (ácido nucleico).

Numa tentativa de melhorar o procedimento de extração e estabilização da vitamina C são empregados, ainda, agentes redutores adicionados à solução extractora (DTT, cisteína ou homocisteína). A redução do L-AA para DHAA pode ser também conseguida através de enzimas ou pelo reagente de Norit [4]. A presença de iões metálicos também tem sido descrita como outro dos factores que contribui para diminuir a estabilidade da vitamina C em soluções. Agentes quelantes de metais, podem ser adicionados à solução extractora, inibindo a oxidação catalisada pelos metais. O ácido etilendiaminotetracético (EDTA) e MSG, melhoram significativamente a estabilidade do L-AA, mesmo na presença do cobre e ferro [43]. No entanto, a acção do EDTA não é tão eficaz quando combinado com o AO [4, 11]. Uma solução extractora de 3% - 6% MPA, contendo ácido acético glacial ou ácido sulfúrico ou 5 mM EDTA limita a oxidação do L-AA para menos de 5% [4].

Todos os procedimentos de extração devem ser realizados com cuidado e de preferência em locais escuros ou com luz reduzida de modo a limitar as reacções oxidativas catalisadas pela luz. Sempre que possível a extração deve ser conduzida em atmosfera inerte, de modo a reduzir a exposição ao oxigénio e evitar uma potencial degradação [1, 4, 10]. Outro aspecto importante é conduzir a extração a baixas temperaturas juntamente com a adição de vários agentes estabilizadores, o que proporciona uma protecção adicional [10, 11]. Em suma, os problemas da estabilidade do L-AA e DHAA em solução são bem resolvidos através da diminuição da temperatura na extração e análise, protecção das amostras da luz, adição de agentes estabilizadores e/ou quelantes e utilização de procedimentos simples e rápidos.

Rizzolo et al [44] mostraram que a manipulação e armazenamento cuidadoso de frutas frescas são fundamentais para a estabilidade do ácido L-ascórbico antes da análise. Estes autores minimizaram a acção da ascorbato oxidase e outras enzimas que catalisam a oxidação de L-AA evitando o corte excessivo das pêras estudadas, congelando as amostras em azoto líquido e preservando-as a -80°C antes da extração. Hernández et al [38] compararam a eficácia de duas soluções extractoras (3% MPA-8%ácido acético e 0,1% OA) na extração do AA

em frutos tropicais. A solução MPA-ácido acético-EDTA revelou ser mais eficaz na estabilização da vitamina C. Apesar de ser mais barato e menos tóxico que o MPA, o AO é menos eficaz na inativação da enzima ascorbato oxidase. Os extractos resultantes são menos estáveis, originando menores percentagens de recuperação da vitamina C total nas amostras.

2.6.2. Métodos Clássicos de Análise da vitamina C

2.6.2.1. Titulações

Os métodos titulométricos para a determinação do L-AA são muito comuns e utilizam vários agentes oxidantes como o iodo, azul de metileno, N-bromosucimida, ferrocianeto de potássio e o DCIP [36-38]. A titulação directa com o corante DCIP na forma de sal sódico foi introduzida por Tilmans em 1930. É um dos métodos mais antigos e baseia-se na oxidação do L-AA pelo DCIP em meio ácido. O ponto final da titulação é determinado pela descoloração do DCIP (redução), que origina uma solução incolor a partir de uma solução rosa (Figura 6). O ponto de viragem desta titulação também pode ser determinado através da análise espectrofotométrica (518 nm) [4, 36]. Este método tem sido aperfeiçoado ao longo do tempo, mas continua a apresentar algumas limitações. A titulação quantifica apenas o L-AA presente na solução. O DHAA não será medido a menos que seja reduzido a L-AA e o método só pode ser aplicado em produtos com baixas concentrações de DHAA [36]. Este método não é aplicável a todas as matrizes, pois sofre de pouca especificidade. Por exemplo, não fará distinção entre L-AA e iso-AA por isso não pode ser usado para análise de vitamina C em alimentos processados e curados pois já contêm artificialmente o último composto [4]. A titulação com DCIP pode ser usada na análise de sumos de frutas frescos [45]. No entanto, extractos bastante coloridos de frutas e vegetais podem mascarar a mudança de cor no ponto de viragem da titulação. Nestes casos, deve ser incluída uma etapa de limpeza da amostra, visando retirar os corantes naturais [4, 36]. Este método pode também fornecer valores erróneos devido à presença de outros compostos redutores além do L-AA. Qualquer outra substância redutora naturalmente presente na amostra pode reduzir o corante. Substâncias naturalmente presentes nos frutos, como taninos, fenóis, iões metálicos (Cu (II), Fe (II), Mn (II) e Co (II)), tiosulfato, cisteína, glutatona e reductonas formadas pelo escurecimento não enzimático são oxidadas pelo corante. É aconselhável que a titulação seja feita de forma rápida para diminuir o efeito de interferência de outras substâncias redutoras (açúcares, entre outros). A alcalinidade da amostra também dificulta a determinação [4, 36, 37].

Apesar das suas desvantagens, este método é rotineiramente aplicado em todo o mundo para várias matrizes de alimentos devido à sua simplicidade e baixo custo. É

considerado um método oficial da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) e é recomendado para a análise de L-AA de bebidas e sumos para fins de rotulagem nutricional (AOAC método oficial 967.21) [4, 44-46].

A iodometria é um dos mais importantes métodos de titulação redox, pois o iodo reage directa, rápida e quantitativamente com muitas substâncias orgânicas e inorgânicas [47]. A titulação iodométrica é aplicada para a determinação do L-AA em alimentos naturais, suplementos alimentares e fármacos, sendo recomendada pelas normas europeias (Autoridade Europeia de Segurança Alimentar - EFSA) e Farmacopeia Brasileira [48-50]. Este método baseia-se reacção oxi-redução do L-AA com iodato de potássio (KIO_3) na presença de iodeto de potássio (KI), utilizando o amido como indicador. O ponto final desta titulação é determinado após a oxidação total do ácido ascórbico presente na solução. O iodeto presente na solução reage com o amido, formando um complexo com uma intensa cor azul-violeta escuro, facilmente observável mesmo em concentrações mínimas do iodo [51, 52]. Este método encontra-se descrito pormenorizadamente nos resultados, uma vez que foi aplicado na análise das amostras. Embora os métodos de titulação sejam simples de usar, do ponto de vista analítico não é um método preciso, porque os erros de titulação são cumulativos. Tal como o método anterior, não é possível medir directamente a concentração do DHAA presente nas amostras. Estas limitações deram origem à procura de métodos alternativos mais específicos e de confiança [36].

2.6.2.2. Métodos Espectrofotométricos

As determinações espectrofotométricas directas baseiam-se na absorção na região do ultra-violeta (UV/vis). Até à década de 80 eram os métodos mais comuns para determinar o teor de L-AA em diversas amostras, tendo em conta o carácter redutor desta molécula [1, 3, 37]. Normalmente utilizam-se dois princípios básicos para a quantificação do L-AA: um indicador tipo redox (metal) ou cromóforo. O L-AA é capaz de reduzir alguns iões metálicos (Fe^{3+} , Cu^{2+}) produzindo soluções coloridas após a complexação. As mudanças de cor observadas facilmente a olho nu são medidas quantitativamente pelos aparelhos [4]. A redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} pelo L-AA é a reacção mais comum, resultando na formação de um complexo cromogénico azul intenso. É adicionado um agente quelante (2,29-dipiridina; 2,4,5-tripiridyl-5-triazina e ferrozina), que forma um complexo com o metal reduzido. A absorvância do complexo formado é então medida aos 700 nm [1, 3, 4]. Além destes, o reagente de Folin e fenol também são utilizados [1].

Os métodos com derivatização incluem os reagentes o-fenilenodiamina (OPDA) e 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) [4, 37]. A reacção de condensação do OPDA com o DHAA representa uma das reacções de derivatização mais úteis na quantificação da vitamina C [4]. Os ácidos ascórbico e desidroascórbico não fluorescem naturalmente. Este método exige a oxidação adicional do L-AA e subsequente derivatização [2, 10]. A reacção total produz um produto altamente fluorescente (fluoróforo) derivado da quinoxalina, o 3-(1,2-dihidroxiethyl)furo[3,4b]quinoxalina-1-ona (DFQ) (Figura 6). Os comprimentos de onda de detecção são fixados nos 355 nm para excitação e 425 nm para emissão ($\lambda_{Ex} = 335$, $\lambda_{Em} = 425$) [2, 4, 10, 53-55]. Este novo procedimento melhorou a sensibilidade e especificidade dos métodos de vitamina C existentes no momento [4]. É um método vantajoso, pois fornece valores da vitamina C total e permite a quantificação do DHAA mesmo em quantidades mínimas [36]. Existem alguns compostos que podem induzir erros nos resultados deste método, nomeadamente, grupos cetónicos que reagem com o OPDA e reductonas formados pela reacção de Maillard. Deste modo, a análise por este método de alimentos sujeitos ao escurecimento não enzimático, pode fornecer resultados equívocos em relação ao teor de vitamina C [4, 37]. Interferências físicas na medição da fluorescência podem surgir na extracção de alimentos ricos em amido (batatas, milho, feijão). Extractos com amido mostram uma opalescência característica. O problema pode ser evitado com a adição de etanol ao extracto para precipitar o amido. A oxidação do L-AA pelo reagente de Norit, embora simples na abordagem, melhora significativamente a precisão do método. Este passo facilita o ensaio da vitamina C total nos produtos alimentares e diminui a interferência de outras substâncias, evitando outras etapas de limpeza morosas [4].

Outro procedimento utilizado é a oxidação da L-AA a DHAA e DKG, seguida da reacção destas moléculas com DNPH em meio fortemente ácido (Figura 6). Com a adição do ácido sulfúrico, forma-se um produto de cor vermelha intensa, o bis-2,4-dinitrofenil hidrazina, que é quantificado pela leitura aos 500 – 550 nm (520 nm é o mais comum). O DNPH é bastante específico para o DHAA e DKG, pois tem a capacidade de reagir mais rapidamente com estas moléculas do que os açúcares e outras substâncias redutoras. Além disso, tem a capacidade de minimizar a formação de ácidos cromogénicos que poderiam interferir na medição [4, 37]. Apesar das vantagens descritas anteriormente, esta metodologia não tem sido aplicada recentemente na análise de alimentos de uma forma tão extensiva como a derivatização com OPDA.

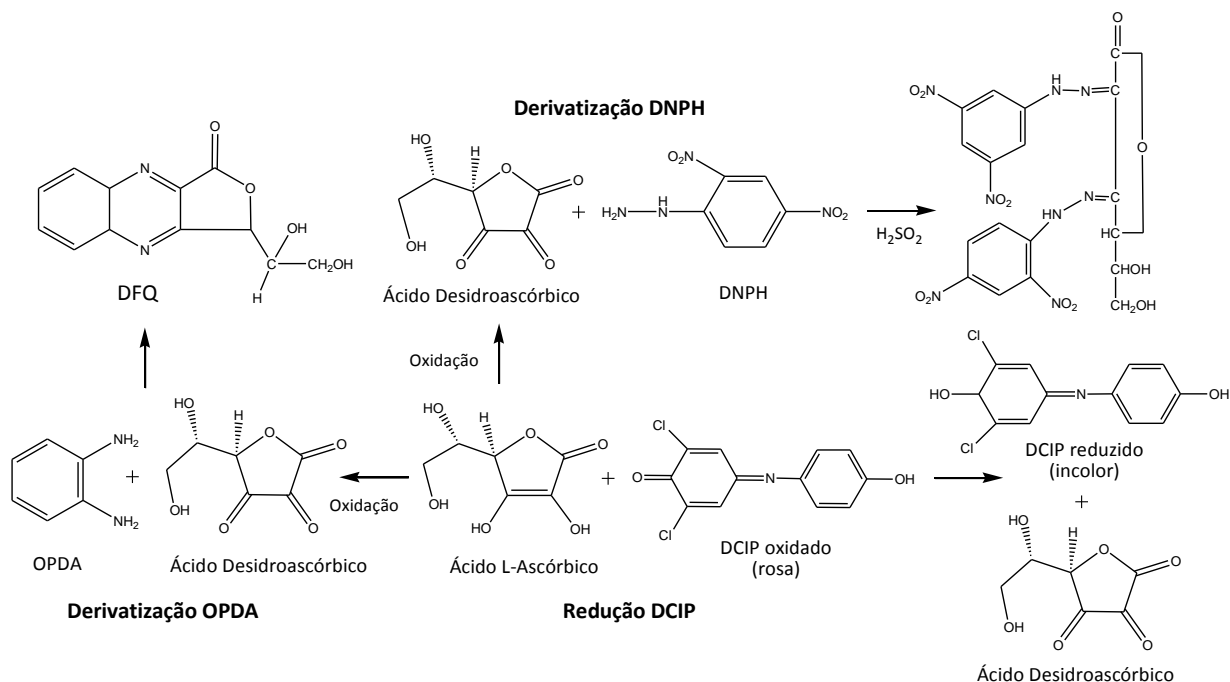


Figura 6 - Principais reacções do ácido L-ascórbico aplicadas na análise da vitamina C (adaptado da Fonte: [4]).

Os métodos descritos anteriormente, são relativamente rápidos, práticos e de baixo custo porque não exigem reagentes nem equipamentos sofisticados. No entanto, em todos os casos, estes procedimentos sofrem de falta de especificidade da reacção. A absorvância das amostras está sujeita à interferência de muitas substâncias que absorvam radiação UV no comprimento de leitura. Isto torna necessário a inclusão de procedimentos de limpeza o que torna o processo moroso [3, 4]. Já foi mencionado anteriormente que a rapidez de análise é importante no rigor da quantificação devido à degradação da vitamina C.

Uma variedade de enzimas tem sido utilizada para a conversão enzimática do L-AA a DHAA. A associação de enzimas a outros métodos como a espectrofotometria directa, OPDA e outras reacções de derivatização é bastante vantajosa pois permite quantificar especificamente o L-AA após a reacção [3, 4]. As enzimas disponíveis comercialmente em forma de kits, tornam o método enzimático simples e rápido. Apesar disso, continua a ser uma técnica com algumas limitações. Por exemplo, estudos comparativos [35, 56] entre o método enzimático e o HPLC concluíram que esta última técnica fornece resultados mais satisfatórios (maior recuperação do L-AA). Adicionalmente, o método HPLC é uma técnica mais simples, com menor consumo de reagentes e material. Com o método enzimático também não é possível determinar o teor de vitamina C total das amostras porque este não é capaz de reduzir o DHAA a L-AA [3, 56].

2.6.3. Abordagens Recentes para a Análise da vitamina C

Uma variedade de métodos (espectrofotometria directa, determinações fluorimétricas, entre outras) para o doseamento de vitamina C em alimentos, produtos farmacêuticos e materiais biológicos foram desenvolvidos no passado. Infelizmente, eles não dispunham de especificidade suficiente, e, portanto, estavam sujeitos às interferências de outros compostos [34, 36]. Por exemplo, açúcares, iões, peróxido de hidrogénio e citrato podem interferir com analitos em métodos espectrofotométricos ou enzimáticos [11]. A falta de sensibilidade suficiente na análise de materiais biológicos era particularmente evidente, pois os métodos não incluíam a separação dos analitos [2, 4].

Deste modo, a escolha preferida para a determinação do L-AA em diversas matrizes recai sobre as técnicas que incluem a separação: eletroforese capilar (CE), cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC) [38].

2.6.3.1. Electroforese Capilar

A electroforese capilar é uma nova técnica de análise, que combina algumas características do tradicional gel de poliacrilamida (PAGE) com a LC [57, 58]. Durante os últimos anos, o número de aplicações da CE para a quantificação do AA e compostos relacionados no soro, urina, produtos hortícolas e farmacêuticos aumentou [2, 4]. Esta técnica baseia-se na mobilidade electroforética dos diferentes analitos no tubo capilar pela aplicação de um campo eléctrico. A separação efectiva dos compostos na CE é a sua maior vantagem, além da versatilidade, sensibilidade, rapidez e eficiência em relação aos métodos tradicionais. Permite também a análise simultânea de vários compostos [4, 58]. O pH dos tampões utilizados varia entre 5 e 9, para alcançar a ionização do L-AA. Para evitar a degradação do composto (em pH alcalino), cisteína e outros agentes estabilizadores são adicionados no tampão de corrida [4]. A falta de reprodutibilidade no tempo de migração e na quantificação das moléculas, devido à instabilidade do fluxo, e uma menor robustez que a LC são algumas desvantagens que a CE apresenta e pode tornar a sua aplicação desvantajosa [2-4].

2.6.3.2. Métodos de Separação Cromatográfica

Os procedimentos cromatográficos são os preferidos na determinação do L-AA nas mais diversas matrizes [1, 11]. As vantagens da técnica resumem-se principalmente na elevada capacidade de separação do L-AA dos outros analitos da amostra, aliada à rapidez de obtenção dos resultados. Adicionalmente, são métodos simples, utilizam pequenas quantidades de

amostra e reagentes e não exigem grandes etapas de preparação da amostra que exponham a vitamina C a maiores probabilidades de degradação. Na maioria dos casos a amostra não necessita de derivatização e a técnica pode ser acoplada a vários tipos de detectores para auxiliarem na identificação e quantificação dos constituintes da amostra [2, 4, 34, 59]. Isto permite uma determinação com elevada sensibilidade e exactidão, comparada com os métodos clássicos. Outra grande vantagem é a sua capacidade em diferenciar a vitamina C de outras vitaminas e possibilitar a determinação simultânea das várias formas da vitamina C. Tanto o L-AA como o DHAA são compostos importantes da dieta e, conseqüentemente, existe um interesse crescente na análise simultânea de ambas as moléculas [11, 54].

A cromatografia gasosa é raramente utilizada para a determinação do AA [2]. Esta técnica apresenta algumas desvantagens, como a instabilidade térmica da vitamina C e a necessidade de derivatização com um agente silanizante (éster de trimetilsilano) [55, 60].

2.6.3.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A natureza hidrossolúvel da vitamina C torna-a uma excelente candidata para a análise por cromatografia líquida de alta eficiência [1, 10]. Nesta técnica, o mecanismo de separação consiste na interacção dos componentes da mistura com a fase móvel e a fase estacionária. Actualmente, o HPLC é a técnica de análise preferida pelos investigadores para a determinação da vitamina C e as muitas combinações de colunas, fases móveis, fases estacionárias e detectores possíveis permitiram o aparecimento de inúmeros procedimentos para a quantificação do L-AA e compostos relacionados [2, 4, 11, 34, 36]. Ainda existem alguns problemas a superar durante a análise simultânea do L-AA e DHAA, daí que muitos autores não têm em conta a medição do DHAA. Nestes casos, o teor de vitamina C não é determinado na sua totalidade. A escolha do método de análise, especialmente o mecanismo de separação, e a selecção das técnicas de detecção, cuja selectividade e sensibilidade deve ser adequada para os analitos em questão. O analista deve ter também em conta a compatibilidade dos reagentes utilizados com todos os componentes do sistema cromatográfico [4, 11].

As principais abordagens HPLC para a determinação da vitamina C incluem a cromatografia de fase reversa (RP), troca iónica, par iónico e exclusão iónica. A abordagem da cromatografia líquida de interacção hidrofílica (HILIC) é uma abordagem recente [1, 11]. Os procedimentos mais antigos baseavam-se principalmente em cromatografia de troca iónica. Com os avanços na tecnologia dos suportes para RP e exclusão iónica, o recurso a estes

métodos tem diminuído. Actualmente, a separação em RP e par iónico utilizando suportes à base de sílica apolares, é o método mais comum de separação utilizado para a determinação do L-AA e seus derivados [4, 11]. Normalmente, nos sistemas de fase reversa, o L-AA é eluído entre os 2 a 10 minutos [2] (Tabela 5). No entanto, são aplicadas fases móveis com vários reagentes ou modificadores orgânicos de modo a obter tempos de retenção e resoluções adequadas. Os métodos mais recentes, por exclusão iónica, baseiam-se em suportes poliméricos (poliestireno e/ou divinilbenzeno – PS/DVB) [4, 14]. A selecção da fase estacionária é passo crucial para a obtenção de uma resolução adequada [34]. As fases móveis para a análise da vitamina C são tão variadas quanto as composições dos suportes cromatográficos e podem conter vários reagentes ou modificadores orgânicos e/ou inorgânicos. A escolha dos reagentes deve ter em conta a estabilização do L-AA e DHAA durante o processo cromatográfico, evitando a sua ionização [55]. O tipo e a concentração de reagentes e modificador orgânico, a força iónica e pH do eluente são variáveis da fase móvel que podem ser utilizados para controlar a retenção do analito e a selectividade da separação [4, 11]. Tampão fosfato (sódio, potássio, amónia), hidróxido de tetrabutylamónio (TBAOH), metanol, ácido acético, entre outros, são alguns exemplos da diversidade de reagentes utilizados nas fases móveis (Tabela 5).

Apesar de serem amplamente utilizados, os métodos que envolvem o uso de colunas de fase reversa [12, 13, 40-42, 55, 61, 62] apresentam muitas vezes baixa resolução do L-AA. Geralmente manipulam-se as fases móveis de modo a aumentar a retenção e resolução do L-AA na separação cromatográfica. O L-AA e DHAA são pequenas moléculas polares e portanto difíceis de reter em sistemas RP convencionais e separá-las dos outros constituintes da amostra. Normalmente, os compostos de interesse das matrizes biológicas são eluídos juntamente com o volume morto ou no início do cromatograma, o que torna a sua detecção difícil. Este contratempo é ultrapassado com a escolha adequada dos reagentes, pH e força iónica da fase móvel [11, 36]. Para melhorar a retenção do L-AA, geralmente são utilizadas fases móveis com uma elevada percentagem de água (próximo dos 100%), combinadas com ácidos inorgânicos/ orgânicos ou tampões inorgânicos. O pH dessas fases móveis deve ser muito baixo, pois as formas neutras dos ácidos, que surgem em pH ácido, são mais bem retidas numa fase estacionária tipo ODS (octadecilsilano) [11]. Uma fase móvel com pKa abaixo do L-AA (4,17) é aplicada para a supressão de iões durante a separação em RP [4, 11].

Na análise do L-AA e DHAA, o ácido sulfúrico, PCA, TFA, ou ácido fosfórico são utilizados nas fases móveis como agentes supressores de iões. Os valores de pH utilizados são muito baixos, normalmente por volta de 2 [40, 53, 63-65]. Apesar de melhorar

significativamente o desempenho da separação, este método apresenta algumas desvantagens. A natureza 100% aquosa da fase móvel pode comprometer a viabilidade da coluna. As fases móveis aquosas que contêm pouco ou nenhum modificador orgânico podem influenciar negativamente a eficiência da separação nas fases estacionárias C18 e diminuem o seu tempo de vida [11]. A utilização de baixo pH também acelera a degradação das colunas analíticas à base de sílica, devido à dissolução do material de revestimento. Este problema pode ser resolvido usando uma pré-coluna ou trocando para uma coluna híbrida, zircónia ou suporte polimérico (PS/DVB) que ofereça uma maior estabilidade química [2, 11, 14, 24, 66, 67]. Os suportes poliméricos são muito estáveis mesmo em pH extremos, que podem degradar outros suportes como ODS convencionais [2, 4].

A abordagem por iónica é também muito comum na análise do L-AA e DHAA [28, 35, 41, 53, 54, 68-73]. Apesar disso, não é a abordagem ideal para a análise da vitamina C devido à complexidade dos eluentes e pobre selectividade e reprodutibilidade dos resultados. A fase móvel é composta, geralmente, por cinco ou mais reagentes em conjunto com tampões inorgânicos [2, 11]. Uma fase móvel composta por brometo miristiltrimetil amónio, hidróxido de sódio, ácido acético, acetonitrilo (ACN), EDTA e homocisteína é um exemplo claro da complexidade de uma fase móvel utilizada para separar o L-AA da matriz. O uso destas fases móveis causa alguns problemas: contribui para a diminuição do tempo de vida da coluna, com aumento da instabilidade da separação cromatográfica e aumento gradual da pressão [11]. A escolha dos reagentes de par iónico é importante. Estes devem ser solúveis na fase móvel e no diluente da amostra [2]. Caso contrário, pode ocorrer a precipitação dos constituintes da fase móvel no sistema. Por exemplo, a octilamina precipita com amostras estabilizadas com MPA. Além disso, os reagentes utilizados na abordagem por iónica não são voláteis e como tal incompatíveis para aplicações de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS). Todas estas razões tornam uma análise, que deveria ser relativamente simples, num procedimento complexo e caro [2, 11].

A cromatografia de troca iónica [13, 64] era frequentemente aplicada nos primeiros métodos cromatográficos para a determinação do L-AA [11]. O L-AA é um ácido orgânico fraco, que pode ser bem retido numa fase estacionária aniónica (por exemplo, fase ligada $-NH_2$) através de um processo de troca iónica fraca. As fases móveis mais comuns nesta abordagem eram tipicamente tampões inorgânicos ou ácidos com valores de pH baixos [64]. Em alguns casos, o L-AA era parcialmente oxidado pela matriz da coluna, resultando no aparecimento de picos deformados. Por outro lado, a homocisteína pode ser usada como agente redutor numa

coluna aniónica, que não perturba o pico do L-AA, ao contrário do que às vezes acontece numa coluna ODS [2]. Esta abordagem não se tornou muito popular para a análise da vitamina C, sendo utilizada ocasionalmente [4, 10].

A abordagem de cromatografia por exclusão iónica parece adequada para a análise da vitamina C [11, 14, 38, 61]. A fase estacionária em cromatografia de exclusão iónica é muitas vezes baseada em resinas PS/DVB com diferentes formas iónicas. A fase móvel é tipicamente um ácido inorgânico (ácido sulfúrico, ácido fosfórico, entre outros), sem qualquer modificador orgânico. A estabilidade da coluna em pH muito baixos é assegurada pelo revestimento polimérico da fase estacionária [11]. A escolha dos suportes poliméricos possibilita a utilização de fases móveis simples que são capazes de resolver efectivamente o L-AA, DHAA, iso-AA e iso-DHAA [4]. Deste modo, tem provado ser um suporte vantajoso para os ensaios HPLC da vitamina C [14, 24, 66].

Outra alternativa aos sistemas convencionais é a abordagem HILIC. Esta técnica é um caso especial da separação em fase normal. Sendo a fase estacionária mais polar que a fase móvel constitui um método privilegiado para aplicações na análise de pequenas moléculas polares (com ou sem carga), que são pouco retidas ou eluídas com o volume morto em modo RP [11]. O aparecimento de novas fases estacionárias polares (grupos amino, diol, zwitteriónicas) e a possibilidade de reter e separar compostos polares nessas fases, fez com que esta modalidade conquistasse cada vez mais adeptos. Outra grande vantagem das condições HILIC é a utilização de uma elevada percentagem de solvente orgânico, o que permite a possibilidade de combinar o LC com detecção por espectrometria de massa (MS) aliado à grande sensibilidade [11, 74-76]. Até agora, a abordagem HILIC foi aplicada apenas em dois métodos de determinação do L-AA, mas já demonstrou ser um método muito conveniente para a análise deste composto. O L-AA foi determinado juntamente com os seus derivados mais estáveis em alimentos e bebidas [76] e em fármacos [75].

O UHPLC é o avanço mais recente das técnicas de separação cromatográfica e baseia-se nos mesmos princípios do HPLC. No entanto, apresenta algumas características que a distinguem do HPLC e tornam a sua aplicação mais vantajosa. Esta nova técnica permite a utilização de fases estacionárias com partículas de tamanho reduzido (< 2 µm) aliadas a altas pressões (>15 000 psi) graças ao desenvolvimento de sistemas adequados. Uma vantagem do uso de partículas menores é que a eficiência da coluna pode ser mantida com a diminuição do seu comprimento. Uma coluna menor permite análises mais rápidas (ordem dos poucos minutos), uma vez que o tempo de separação é proporcional ao comprimento da coluna, e

menor consumo de reagentes e amostras. O aumento da resolução (graças ao aumento do número de pratos teóricos) pode também gerar mais informações sobre a composição das amostras. Deste modo, fornece resoluções e eficácia superiores, aumento da sensibilidade (limites de detecção mais baixos) e tempos de corrida mais curtos, quando comparadas às análises utilizando-se o HPLC. Graças às vantagens apresentadas, a difusão do UHPLC pelos laboratórios de todo o mundo tem sido muito rápida [77, 78].

2.6.3.2.2. Detecção da vitamina C

A mudança mais drástica na análise do L-AA foi a combinação dos métodos clássicos de análise com os métodos cromatográficos de separação. Esta associação proporcionou o desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis, rigorosos e selectivos para quantificar o L-AA e compostos relacionados em diversas matrizes complexas [3, 4, 11]. As técnicas de detecção mais comuns na quantificação da vitamina C, após a sua separação cromatográfica, são: Ultra-violeta (UVD), fluorescência (FD) e electroquímica (ECD) [4, 11, 19, 38].

Apesar das muitas técnicas de detecção disponíveis acopladas ao HPLC, a detecção conjunta do L-AA e DHAA ainda é um problema analítico complicado. Estes compostos possuem propriedades muito diferentes na absorção UV, FD e ECD. A FD só é possível, quando o DHAA é submetido a derivatização. Com excepção da MS e mais recentemente a detecção por aerossol carregado (CAD), existe sempre a necessidade da reacção redox. Geralmente, é necessário transformar uma molécula na outra para tornar-se possível a identificação de ambas usando apenas uma técnica de detecção. Uma alternativa é a utilização de duas técnicas de detecção em paralelo [1, 11].

O L-AA tem uma forte absorção na zona do UV daí que a espectrofotometria UV acoplada ao HPLC é sem dúvida a técnica mais simples e utilizada na maioria dos ensaios da vitamina C [1]. Os comprimentos de onda aplicados na maioria dos casos, para a detecção UV do L-AA, têm sido 254 nm, em seguida 245 nm ou 265 nm (Tabela 5). A absorção máxima é dependente da composição e do pH das soluções e/ou fases móveis. O L-AA tem o seu máximo de absorção na faixa dos 244 - 265 nm (pH 2 – 6) [1, 2, 11]. O comprimento de onda de baixa frequência do DHAA (185 - 210 nm) [2, 9, 10] torna a sua detecção directa particularmente difícil e susceptível a interferências de uma série de componentes naturais dos alimentos e limita a escolha de solventes, tampões e reagentes utilizados [4, 11, 55]. Além disso, o DHAA encontra-se presente em quantidades mínimas nos produtos alimentares, o que dificulta ainda

mais a sua detecção. Adicionalmente, os produtos de degradação do DHAA podem também interferir com a resolução dando origem a interpretações erradas dos cromatogramas obtidos [2, 4]. A maioria dos métodos utiliza a UVD para identificar o L-AA sem o DHAA, devido à fraca absorção UV da forma oxidada [9, 11]. Esta técnica de detecção é pouco sensível para a análise simultânea do L-AA e DHAA em matrizes complexas, onde os valores da sua concentração são muito baixos. Adicionalmente, não é suficientemente específica para outras moléculas orgânicas não relacionadas que apresentam um espectro de absorção UV semelhante ao do L-AA e seus derivados que podem estar presentes nas matrizes e interferir na análise destas moléculas [4, 11, 14].

Se o objectivo da análise é a quantificação da vitamina C total, então, o sistema deve ser capaz de separar e detectar as duas formas. Uma alternativa é empregar outra técnica de detecção em paralelo (FD, por exemplo). Deste modo, obtém-se uma quantificação mais sensível e rigorosa do DHAA [4, 11, 54]. A redução do DHAA antes da separação cromatográfica e consequente medição da vitamina C total é uma forma de ultrapassar as desvantagens anteriores [2, 9, 38]. Isto exige dois ensaios cromatográficos: inicialmente, o conteúdo do L-AA na amostra é medido para se obter a concentração inicial desta molécula. Posteriormente, a redução do DHAA é realizada com recurso a um agente redutor. Após a conversão do DHAA a L-AA, a amostra é analisada novamente para calcular o conteúdo total do L-AA (ou vitamina C total). A mesma amostra é então injectada duas vezes: a amostra original para a concentração do L-AA inicial; e a amostra reduzida para concentração total da vitamina C. O conteúdo do DHAA é então calculado pela diferença entre a vitamina C total após a conversão e o conteúdo do L-AA da amostra original. Este método é convencionalmente chamado de “método da subtração” [11, 38, 55, 69]. Vários agentes redutores, tais como a homocisteína, DTT [28, 35, 40, 56, 79, 80], BAL [13], bromina e L-cisteína [81] foram estudados. A L-cisteína já era utilizada como agente redutor nos métodos clássicos. O DTT é o agente mais comum utilizado para reduzir o DHAA antes da corrida cromatográfica [11]. Uma das vantagens deste método é a sua simplicidade, rapidez e a ausência de artefactos no cromatograma. Os picos do L-AA reduzido não apresentam deformações nem o DTT é detectável no cromatograma [35, 82]. A eficácia do BAL e DTT foram estudadas num estudo comparativo [13], no qual foi observada uma redução incompleta do DHAA para L-AA dependendo do agente redutor utilizado. Neste caso, o DTT revelou ser o agente mais eficiente capaz de reduzir completamente o DHAA (recuperações próximas dos 100%) de forma reprodutível. A eficácia da redução depende em muito da concentração do reagente utilizada, pH e o tempo de reacção utilizado. O tempo para completar a redução

pode variar entre 2,5 - 150 minutos, dependendo da concentração de reagente utilizada [35, 38, 69].

No entanto, o uso deste agente redutor tem algumas desvantagens. Espécies com grupos tiol (como o DTT e BAL) funcionam apenas em pH levemente ácido e/ou neutro. O pH óptimo para a redução varia entre 6,5 e 8. Logo, as amostras acidificadas, contendo o DHAA são neutralizadas antes da reacção redox. Muitos autores ajustam o pH das amostras para valores próximos de 7 antes de adicionar o agente redutor [55, 56, 69]. Este passo complica a análise de DHAA e pode levar a erros experimentais, uma vez que tanto o L-AA como o DHAA são instáveis em pH neutro. A hidrólise do DHAA depende em muito do pH da solução, sendo necessário um controlo rigoroso [83]. O TCEP surge como uma alternativa que garante também a conversão do DHAA, sendo mais eficiente que o DTT ou BAL na redução deste composto em meios ácidos [12, 28, 69, 72, 83]. O TCEP é funcional numa faixa de pH muito mais ampla e tem sido aplicado com sucesso na redução do DHAA a pH 4,3 [69], 2 [83] e 1,5 [12]. Este último valor de pH é o mais baixo reportado na literatura para a redução do DHAA. Esta molécula totalmente reduzida com TCEP em pH baixos e os rendimentos do L-AA são os mesmos do que em valores de pH mais altos. Além disso, o L-AA formado pela redução com TCEP é significativamente mais estável na presença de iões redox ativos (Fe^{3+} , Cu^{2+}) em comparação com os tióis [83]. A menção da utilização do TCEP é ainda rara na literatura científica, devido muito provavelmente ao custo do reagente, comparado ao DTT e outros. A escolha do método a utilizar deve ser feita tendo em conta a relação custo/efectividade dos resultados obtidos.

A vantagem do método de subtracção é sobretudo o aumento da sensibilidade e selectividade para o DHAA em comparação com a UVD directa aplicando baixos comprimentos de onda (abaixo dos 220 nm) [11]. Uma análise aos métodos HPLC mais recentes (Tabela 5) revela que a detecção UV continua a ser a mais aplicada e apresenta bons resultados apesar de algumas limitações.

Por outro lado, a FD [53, 54] é aplicada em menor escala na análise concreta da vitamina C, principalmente devido à necessidade de derivatização e oxidação adicional do L-AA para formar um composto fluorescente. Este é um processo um pouco complicado, que envolve várias etapas e por isso moroso. Contudo, permite determinar directamente o DHAA. A derivatização química é feita com o objectivo de melhorar a sensibilidade da detecção e eliminar interferências da matriz [4, 10, 11, 38]. A conversão do L-AA a DHAA pode ser feita com recurso às enzimas ascorbato oxidase e ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11) [4, 84]. A incorporação dos métodos enzimáticos tem a vantagem de aumentar a especificidade na

determinação do L-AA, e permitem confirmar a presença deste composto no cromatograma [1, 72]. O OPDA é o agente de derivatização utilizado e reage com o DHAA formando um produto fluorescente denominado DFQ ($\lambda_{\text{Ex}} = 335 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 425 \text{ nm}$) [11, 53, 54]. O 4,5 dimetil-1,2-fenilenodiamina é outro agente fluorogénico altamente específico para o DHAA também utilizado para a sua quantificação [11]. A aplicação de um sistema de detecção duplo é frequentemente utilizada, para identificar em conjunto o L-AA e DHAA, por UVD e FD, respectivamente [11, 54]. Caso o sistema de detecção paralela não esteja disponível, o método da subtração pode ser aplicado para se obter a quantidade da vitamina C total [2, 11, 53, 54].

A ECD [40, 42] tem-se tornado cada vez mais popular e foi introduzida como uma alternativa para a análise do L-AA e seus derivados [2, 10]. Muitos investigadores estão agora a aderir a este novo detector disponível, que oferece elevada sensibilidade e selectividade para a análise da vitamina C [1, 4]. Esta técnica baseia-se nas propriedades redox do L-AA e do iso-AA. O L-AA é relativamente reactivo e fácil de detectar em sistemas coulométricos e amperométricos [4, 9, 11]. O DHAA deve ser determinado usando o método da subtração, pois é electroquimicamente inactivo [2, 11]. Deste modo, não é possível medir directamente o DHAA, sendo necessário reduzi-lo a L-AA e proceder depois à sua análise. São então necessários dois ensaios independentes para medir o DHAA [4, 10]. Os detectores electroquímicos são os mais sensíveis e rigorosos e oferecem a vantagem de baixos limites de detecção. Além disso, evitam potenciais problemas de especificidade e sensibilidade inerentes à detecção UV pois eliminam a interferência de substâncias não relacionadas presentes na amostra [2, 10]. No entanto, a estabilização do sistema demora mais tempo (17 - 48h) e a reprodutibilidade dos resultados é menor quando comparada com a UVD [2, 4].

Em relação ao LC-MS, muitos poucos estudos têm sido reportados na literatura científica. Apesar da sua elevada sensibilidade e selectividade um sistema MS é muito caro e tem elevados custos operativos, o que torna inacessível para muitos laboratórios. Além disso, a maiorias das fases móveis utilizadas (reagente par iónico e/ou tampões inorgânicos não voláteis) são incompatíveis com a detecção por MS [4, 11]. A informação sobre a detecção do L-AA por MS durante uma corrida analítica é bastante escassa. Os poucos métodos documentados, na sua maioria utilizam a espectrometria de massa como uma ferramenta para a identificação de vários componentes da amostra (multivitaminas, carotenóides, fenóis, entre outros), além do L-AA. Como tal, esses métodos são muito complexos e não estão focados em como obter os melhores resultados em termos de sensibilidade e selectividade para a determinação quantitativa do L-AA [4, 11, 65, 85]. Frenich et al [85] aplicaram a

espectrometria de massa hifenada à LC, na identificação, confirmação e quantificação do L-AA, em várias amostras (kiwis, mangos e tomates). A determinação do L-AA juntamente com carotenóides foi realizada por “ionização spray electrónico” em modo negativo (ESI-MS⁻). O espectro de massa do L-AA é mostrado na Figura 7. Neste caso, apenas o L-AA foi monitorizado ([M-H]⁻ = 175). Apesar dos estudos mais recentes, a informação disponível sobre abordagens para a detecção simultânea do L-AA e seus derivados numa corrida analítica continua a ser rara. Os métodos publicados descrevem algumas dificuldades com a determinação do DHAA por MS. Normalmente ocorre a formação de um hemiacetal hidratado durante a solubilização e, dependendo do pH, pode ocorrer também a sua hidrólise. Isto torna a sua identificação, com recurso ao MS, complicada [11, 86]. Apesar das dificuldades, Fenoll et al [19] desenvolveram um método sensível e selectivo (HPLC-MS/MS) para a análise simultânea destes dois analitos. O método ESI-MS⁻ foi aplicado para a determinação do L-AA e DHAA em pimentos, tomates, laranjas e limões.

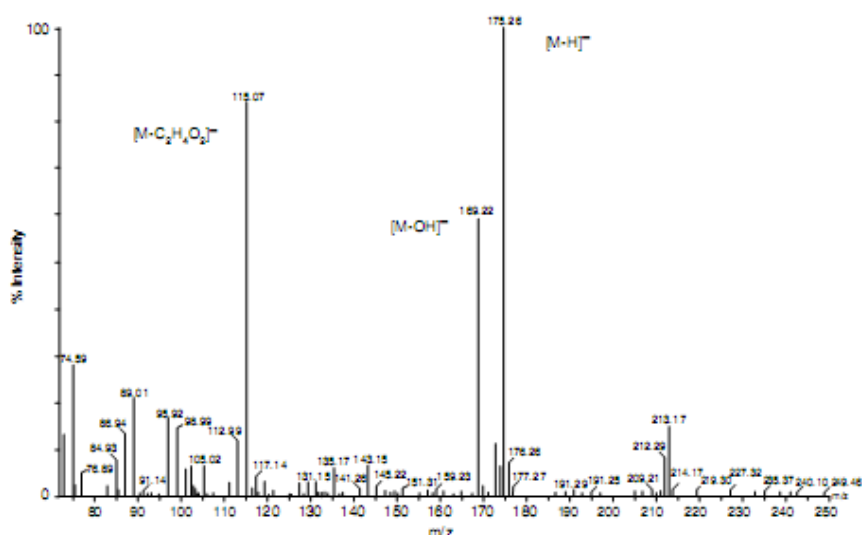


Figura 7 - Espectro de massa do ácido L-ascórbico. [M-H]⁻ ião molecular do L-AA desprotonado; [M-C₂H₄O₂]⁻ = fragmento do L-AA (Fonte: [85]).

A detecção por aerossol carregado foi recentemente apresentada como um sistema de detecção alternativo em HPLC. Esta nova técnica revelou-se extremamente conveniente pois permite a análise simultânea do L-AA e DHAA sem recorrer ao método da subtração [39].

A Tabela 5 apresenta uma visão geral dos métodos HPLC para a determinação da vitamina C (L-AA, DHAA, entre outros) na área dos produtos alimentares. Esses métodos foram seleccionados de um conjunto muito grande de trabalhos publicados (período 1999 - 2011) e não pretende ser conclusiva. Os métodos seleccionados são apresentados em ordem cronológica e foram agrupados por analito de interesse, tipo de coluna, e método de detecção, que são os principais critérios que regem a selecção dos métodos.

Tabela 5 - Visão geral dos métodos cromatográficos para a determinação de ácido ascórbico e ácido desidroascórbico em alimentos por ordem cronológica (Tr: tempo de retenção; TBAOH: hidróxido de tetrabutilamónio; DTMACl: cloreto de dodeciltrimetilamónio; Na₂EDTA: sal dissódico do ácido etilenodiaminotetraacético)(adaptado da fonte: [4, 11]).

Matriz	Moléculas determinadas	Tipo separação/ Coluna analítica	Fase móvel	Deteção	Tr L-AA (min)	Ref., Ano
Alimentos multivitaminados	L-AA, iso-AA, DHA, iso-DHAA	Par iónico/ Jupiter C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	2,3 mM DTMACl + 2,5 mM Na ₂ EDTA + 66 mM tampão fosfato + 20 mM tampão acetato (pH 4.5)	UVD 254 nm FD 350 nm/430 nm (derivatização OPDA)	7,7	[54], 1999
Alimentos	L-AA	RP/ Inertsil ODS-3 (150 x 4,6 mm; 5 µm)	20 mM L-glutamato monosódico (MSG) (pH 2.1 – ajustado com ácido fosfórico)	ECD (Ag/AgCl - 400 mV)	4,6	[40], 2000
Feijão verde (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	L-AA, DHAA	RP/ Spheroclon ODS 2 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	1,8 mM ácido sulfúrico	UVD 245 nm	4,8	[55], 2000
Frutos e vegetais	L-AA, DHAA	Par iónico/ HiChrom C18 (250 x 4,0 mm; 5 µm)	0,2 mM tampão fosfato (pH 2,4 – ajustado com ácido fosfórico)	UVD 254 nm, 210 nm (redução DTT)	9	[35], 2000
Suplementos multivitamínicos	L-AA	Par iónico/ Hypersil BDS C18 (250 x 4.0 mm; 5 µm)	ACN (98:2) + 10 mM sal sódio ácido hexanosulfónico + ácido acético + trietilamina	DAD 275 nm	2,2	[87], 2001
Bebidas	L-AA	Troca iónica/ Kromasil NH ₂ 5 µm-100 ^a (250 x 4,6 mm; 5 µm)	0,1 M ácido acético em água	UVD 250 nm	9,3	[64], 2002
Alimentos	L-AA	RP/ Inertsil ODS-3 (150 x 3,0 mm; 5 µm)	0,2% ácido fosfórico (pH 2.1)	ECD (Ag/AgCl – 400mV)	4	[42], 2003
Frutas	L-AA	Par iónico/ Hydrobond AQ C8 (100 x 3,0 mm; 5 µm)	1 mM Tampão fosfato de potássio + 1 mM Na ₂ EDTA	ED (250 mV) UVD 245 nm	4,2	[41], 2004
Frutas	L-AA, DHAA	Par iónico/ Lichrosphere 100RP (250 x 4,0 mm; 5 µm)	0,5 M TBAOH + Metanol + 0,01 M tampão fosfato de potássio (pH=4.0) (eluição isocrática)	UVD 254 nm (redução com TCEP)	6	[72], 2004
Frutos e vegetais	L-AA	RP/ Coupled Symmetry C18 (75 x 4,06 mm; 3.5 µm)	70% Metanol + 30% ácido acético (em 0,05% Metanol)	LC-MS- ESI ⁻	3,9	[85], 2005
Vinhos	L-AA	PLRP-S 100A (150 x 4,6 mm; 5 µm)	A: água + ácido trifluoracético (99:1) B: ACN + A (80:20)	UVD 243 nm	2,3	[66], 2006
Suplementos multivitamínicos	L-AA, outras vitaminas	RP/ Johnson Spherigel C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	A: Metanol + B: 5 mM ácido heptafluorobutírico (eluição gradiente)	LC-MS-ESI ⁻	3,6	[65], 2006

Frutas	L-AA	PLRP-S (250 x 2,1 mm; 5 µm)	0,2 M tampão fosfato de sódio (pH 2,14)	DAD 245 nm	2,3	[24], 2006
Frutos tropicais	L-AA, DHAA	Exclusão iônica/ Shodex RSpak KC-811 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	0,2% ácido o-fosfórico	UVD 245 nm (redução DTT)	6	[38], 2006
Alimentos forficados	L-AA, iso-AA	Par iônico/ LiChrospher RP-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	ACN + Acetato de sódio (pH 5,4) + decilamina + TCEP	UVD 265 nm	12,8	[68], 2006
Frutos e vegetais	L-AA, DHAA	1- RP/ C18 Spherisorb ODS2 (250 x 4,6 mm; 5 µm) 2- NH2-Spherisorb S5 (2504,6 mm; 5 µm)	A- 0,01% ácido sulfúrico (pH 2,6) B- 10 mM tampão fosfato (pH 3,5) + ACN (60:40)	UVD 245 nm (Redução DTT ou BAL)	-	[13], 2007
Bebidas	L-AA, iso-AA	HILIC Interstil Diol (250 x 4,6 mm; 5 µm)	ACN + 66,7 mM acetato de amônia (88:15)	UVD 260 nm	8	[76], 2007
Alimentos	L-AA, DHAA	Par iônico/ NovaPak C18 (150 x 3,9 mm; 4 µm)	80 mM tampão fosfato (pH 7,8) + Metanol (84:16)	FD 355 nm/ 425 nm (derivatização OPDA)	1,9	[53], 2007
Mango (<i>Mangifera indica L.</i>)	L-AA, DHAA	RP/ Microsorb RP18 (250 x 4,0 mm; 5 µm)	1% (w/v) MPA (pH 2,2)	UVD 238 nm	-	[62], 2007
Leite materno	L-AA, DHAA	RP/ Spherisorb ODS2 C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	0,1% ácido acético + metanol (95:5)	UVD 254 nm (redução DTT)	3,7	[56], 2006 [79], 2008 [80], 2008
Suplementos vitamínicos	L-AA	ZIC-HILIC (150 x 2,1 mm; 3,5 µm)	ACN + 50 mM tampão acetato de amônia (pH 6,8) (78:22)	UVD 268 nm	4,6	[75], 2008
Bróculos (<i>Brassica oleracea</i>)	L-AA, DHAA	Par iônico/ Agilent Zorbax (250 x 4,6 mm; 5 µm)	0,05 M tampão fosfato (pH 2,6)	DAD 245 nm (redução DTT)	-	[28], 2009
Frutos e vegetais	L-AA, DHAA	RP/ C18 Synergi Hydro-RP (250 x 4,6 mm; 4 µm)	0,005 % ácido formico (em água)	DAD (255 nm) (redução TCEP)	5,3	[31], 2010
Frutas e vegetais	L-AA, DHAA	RP/ Prontosil C18 (250 x 3,0 mm; 3 µm)	0,2 % ácido fórmico	LC-MS-MS-ESI ⁻	4	[19], 2011
Frutos tropicais	L-AA	Par iônico/ Synergi™ Hydro-RP (150 x 4,6 mm; 4 µm)	20 mM tampão fosfato de amônia (pH 3,5, ajustado com ácido ortofosfórico) + 0,015 % (w/v) MPA	PDA 254 nm	4	[73], 2011

2.7. Determinação *in vitro* da capacidade antioxidante

Um “antioxidante” é uma substância que inibe a acção dos radicais livres e impede ou previne a oxidação de outras substâncias químicas. A acção dos antioxidantes é bastante ampla e vai desde a protecção dos alimentos contra a oxidação lipídica (rancificação) até ao seu uso na dieta para proteger as células contra os efeitos negativos do stress oxidativo que estão associadas a doenças degenerativas [88, 89]. Na maioria dos alimentos os antioxidantes estão presentes naturalmente e incluem algumas vitaminas (A, C, E), minerais (potássio, zinco, selénio), carotenóides e principalmente os compostos fenólicos (flavonóides) que são os antioxidantes mais abundantes na dieta humana [90]. Existem várias técnicas que têm sido aplicadas na determinação da actividade antioxidante *in vitro*. Estas incluem o ORAC que mede a capacidade do antioxidante em sequestrar radicais peróxido; a auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico, que actua como gerador de radicais livres, os quais interagem com o β -caroteno provocando o decaimento da sua absorvância; o teste de redução do radical DPPH, que se baseia na capacidade deste radical em reagir com doadores de hidrogénio; o FRAP, que baseia-se na capacidade dos fenóis em reduzir o ferro; o ABTS que consiste na capacidade do antioxidante em capturar o radical catião ABTS (ABTS^{•+}), entre outros [88-91].

As metodologias para a determinação da actividade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências, por isso, normalmente são aplicadas duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio usado isoladamente tem a capacidade de reflectir exactamente a actividade antioxidante total de uma amostra. No entanto, os testes *in vitro* são muito limitados e os resultados obtidos não podem ser tomados como uma evidência directa dos efeitos *in vivo*. Apenas servem para uma avaliação inicial da interacção entre os compostos presentes nas amostras com os radicais livres e na procura de possíveis fontes de antioxidantes com aplicações em produtos alimentares ou farmacêuticos [89, 91].

2.7.1. Ensaio da descoloração do ABTS^{•+}

O método indirecto da captura do ABTS^{•+} é uma das metodologias mais populares na determinação da actividade antioxidante de alimentos e produtos naturais devido à sua simplicidade, rapidez, estabilidade e reprodutibilidade dos resultados [88, 89]. Normalmente é associado a outros testes como o FRAP ou DPPH. Este método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis, lipossolúveis, compostos puros, tais como carotenóides e produtos fenólicos, presentes em alimentos e extractos vegetais [90, 91]. O método baseia-se

na formação do $ABTS^{\bullet+}$, através da reacção do ABTS com um agente oxidante, normalmente persulfato de potássio (K_2SO_5) (Figura 8). Com a adição de um antioxidante ocorre a redução do $ABTS^{\bullet+}$ a ABTS, provocando a descoloração da mistura, que passa de azul esverdeado a incolor. O decaimento da absorção do $ABTS^{\bullet+}$, após a mistura com o antioxidante, é monitorizado através de análise espectrofotométrica (734 nm). Em termos de quantificação, a percentagem de inibição do $ABTS^{\bullet+}$ é determinada em função do antioxidante sintético Trolox, que é submetido às mesmas condições de análise [92].

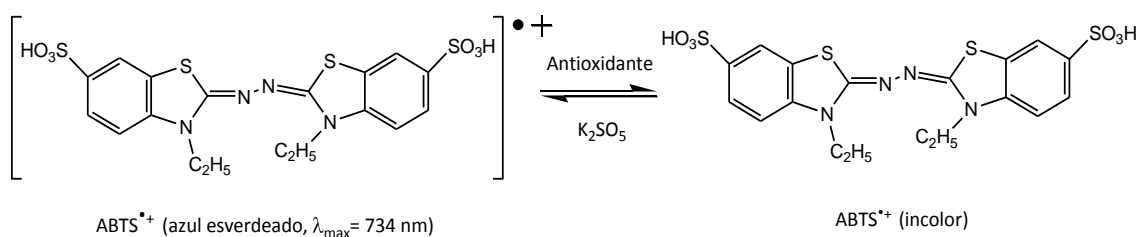


Figura 8 - Reacção utilizada no teste do ABTS ou ensaio TEAC (actividade antioxidante equivalente ao Trolox). A redução do $ABTS^{\bullet+}$ pela acção de um antioxidante e a sua formação pelo persulfato de sódio (K_2SO_5) (adaptado da Fonte: [88])

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Métodos

O principal objectivo da presente tese de mestrado foi realizar um estudo comparativo da variabilidade do teor de vitamina C de diferentes produtos hortofrutícolas cultivados na Região Autónoma da Madeira (RAM), com produtos de origem externa (importados). Para tal, desenvolveu-se e validou-se um método analítico para determinar o conteúdo de vitamina C total em frutas e vegetais e avaliar a degradação deste nutriente com o tempo de armazenamento (4 °C) dos produtos hortofrutícolas. A técnica utilizada foi a cromatografia líquida de ultra-eficiência com abordagem de fase reversa. Os resultados obtidos foram comparados com o método titulométrico. Adicionalmente, a capacidade antioxidante total dos mesmos produtos hortofrutícolas foi medida pelo método ABTS.

3.1.1. Desenvolvimento e Validação do método analítico

Os parâmetros analíticos avaliados na validação do método UHPLC-PDA foram: a selectividade, linearidade e faixa de aplicação, sensibilidade (limites de detecção e limites de quantificação), precisão e recuperação.

3.1.1.1. Selectividade

A selectividade do método foi estudada pela identificação dos picos do ácido L-ascórbico nas amostras de polpa de limão e laranja através da comparação dos tempos de retenção e espectro de absorção UV-vis de uma solução padrão de ácido L-ascórbico (50 µg/mL)

3.1.1.2. Linearidade e Faixa de aplicação

A linearidade foi testada, pelo método da padronização externa, em duas faixas de concentração do ácido L-ascórbico: 0,05 µg/mL - 2 µg/mL e 2 µg/mL - 100 µg/mL. Para cada faixa, foram realizadas três curvas de calibração com seis níveis de concentração cada. Diariamente, era preparada uma solução padrão *stock* de ácido L-ascórbico (200 µg/mL) em solução de extracção (3% MPA - 8% ácido acético – 1mM EDTA), que era conservada ao escuro e aos 4°C. Os padrões de cada ponto das rectas eram preparados a partir de diluições da

solução *stock* com a fase móvel e injectados em triplicata ($n = 3$) (Tabela 6). Cada ponto da curva corresponde à média das áreas dos picos das três determinações. A linearidade foi avaliada em dias diferentes e foi estimada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

Tabela 6 - Pontos das curvas de calibração preparados a partir de diluições da solução padrão *stock* (200 µg/mL) de ácido L-ascórbico.

Faixa de linearidade (µg/mL)	Pontos da Curva (µg/mL)
0,05 - 2	0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2
2 - 100	2; 5; 10; 25; 50; 100

3.1.1.2.1. Limites de Detecção (LODs)

Os limites de detecção foram calculados a partir da fórmula seguinte:

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{m} \text{ (Equação 3)}$$

onde, σ é o desvio padrão da intersecção com eixo das ordenadas (yy) e m é o declive da curva de calibração.

3.1.1.2.2. Limites de Quantificação (LOQs)

Os limites de Quantificação foram calculados a partir da fórmula seguinte:

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{m} \text{ (Equação 4)}$$

onde, σ é o desvio padrão da intersecção com eixo das ordenadas (yy) e m é o declive da curva de calibração.

3.1.1.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada através do cálculo do coeficiente de variação percentual das soluções padrão, submetidas a ensaios de precisão intra-dias (repetibilidade) e precisão inter-dias (intermediária).

3.1.1.3.1. Precisão intra-dias

Para determinar a repetibilidade analítica da metodologia, preparou-se quatro soluções padrão com concentrações diferentes (100; 10; 5; 0,2 µg/mL), que foram injectadas em sextuplicata ($n = 6$) nas mesmas condições experimentais e analisadas no mesmo dia.

3.1.1.3.2. Precisão inter-dias

A precisão intermediária foi estudada pela análise de quatro soluções padrão com concentrações diferentes (100; 10; 5; 0,2 µg/mL), em três dias não consecutivos, sob as mesmas condições cromatográficas. Foram realizadas seis determinações para cada nível ($n = 6$).

3.1.1.4. Recuperação

A taxa de recuperação da vitamina C foi determinada pelo método de adição padrão, com o objectivo de avaliar a eficácia do processo de extracção do método. Quantidades conhecidas de ácido L-ascórbico foram adicionadas à polpa diluída com solução extracção em dois níveis de concentração (50 e 10 µg/mL). Em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de extracção da amostra e analisadas. As amostras diluídas sem fortificação e cada uma das amostras fortificadas foram injectadas em sextuplicata ($n = 6$). A redução com o DTT foi aplicada para medir a recuperação da vitamina C total. A percentagem (%) de recuperação foi calculada em cada amostra pela fórmula seguinte:

$$R (\%) = \frac{C_{AF} - C_{AD}}{C_{st}} \quad (\text{Equação 5})$$

onde, C_{AF} corresponde à concentração de L-AA obtida na amostra fortificada; C_{AD} é a concentração de L-AA na amostra sem fortificação e C_{st} é a concentração da solução padrão adicionada à amostra fortificada. Os testes de recuperação foram efectuados em todas as matrizes vegetais analisadas.

3.1.2. Colheita das amostras/ matéria-prima

No total, foram estudados nove produtos hortofrutícolas cultivados na RAM e sete de origem importada. Na Tabela 7 estão descritos os produtos hortofrutícolas utilizados no estudo comparativo. Ao contrário dos outros produtos analisados, as anonas e os agriões eram apenas de origem local (regional). A escolha dos frutos e vegetais baseou-se nos seus níveis de vitamina C já documentados e disponibilidade no mercado. Os produtos cultivados na RAM foram colhidos em vários pontos da ilha (Figura 9) no período de Fevereiro a Maio de 2011. Em seguida, eram entregues no armazém do supermercado Continente, um dia após a sua colheita. Não foi possível saber a data de colheita dos produtos importados. Todos os produtos, à excepção das anonas e limões importados, foram fornecidos pelo supermercado Continente. Além dos produtos no estado *in natura*, analisou-se também polpa de maracujá congelada, adquirida num supermercado local.

Tabela 7 - Informações sobre as espécies, variedade/cultivar, data de colheita e proveniência para cada um nove produtos hortofrutícolas analisados.

Nome vulgar	Nome científico	Variedade/ Cultivar	Data da colheita	Proveniência
Maracujás	<i>Passiflora edulis Sims</i>	---	27-02-2011	Câmara de Lobos (Madeira)
		---	---	Zimbabué
Agriões	<i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i>	---	22-03-2011	Santana (Madeira)
Pimentos Verdes	<i>Capsicum annuum L.</i>	---	22-03-2011	Santa Cruz (Madeira)
		California, categoria II	---	Espanha
Anonas	<i>Annona cherimola Mill.</i>	---	11-04-2011	Machico (Madeira)
Morangos	<i>Fragaria X ananassa</i>	---	26-04-2011	Câmara de Lobos (Madeira)
		---	---	Espanha
		---	26-04-2011	Santa Cruz (Madeira)
Papaias	<i>Carica papaya L.</i>	Golden, categoria I	---	Brasil
Limões	<i>Citrus limon (L.) Burm.F.</i>	---	26-04-2011	Santana (Madeira)
		---	---	Espanha
Brócolos	<i>Brassica oleraceae L. var. Italica plenk</i>	---	10-05-2011	Santa Cruz (Madeira)
		---	---	Portugal Continental
Pimentos Vermelhos	<i>Capsicum annuum L.</i>	---	10-05-2011	Santa Cruz (Madeira)
		---	---	Portugal Continental

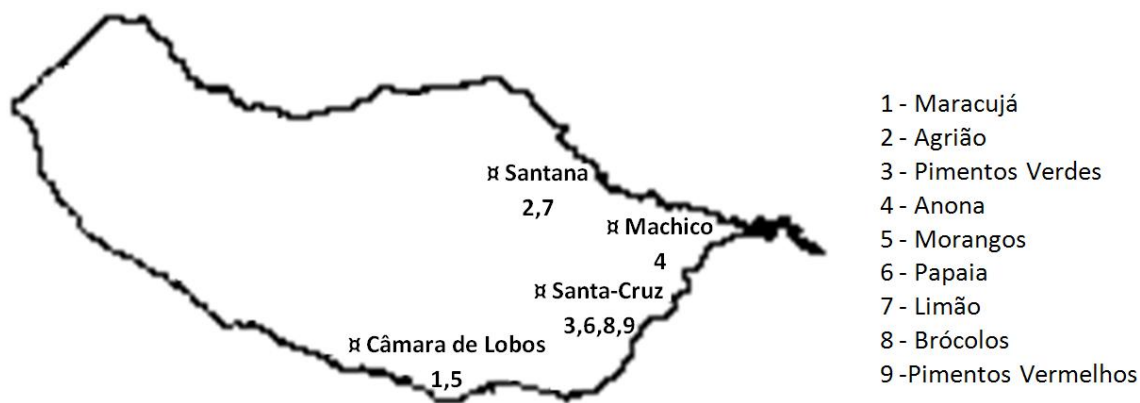


Figura 9 - Distribuição geográfica das áreas de produção dos produtos hortofrutícolas na Ilha da Madeira.

3.1.3. Conservação e preparação das amostras para análise.

O material recolhido devia ser analisado, preferencialmente, logo após a colheita de modo a garantir os valores mais próximos e exactos do conteúdo real de vitamina C presente nos produtos. No entanto, as condições experimentais exigidas não permitiam que as amostras fossem analisadas no local da colheita. Após a sua entrega no Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais (Centro de Química da Madeira), os produtos eram imediatamente conservados no frigorífico ($\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$). As frutas e vegetais permaneciam nestas condições durante o período de estudo. Ao contrário dos outros produtos, as anonas foram mantidas à temperatura ambiente durante o estudo. As extrações foram realizadas no dia da entrega e no prazo de 5 dias consecutivos, de modo a avaliar a estabilidade do L-AA com o tempo de armazenamento dos produtos hortofrutícolas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os maracujás, os primeiros a serem estudados, foram submetidos à extracção periodicamente durante 15 dias. Após sua análise, decidiu-se mudar a metodologia por causa do curto prazo de validade dos outros alimentos. Portanto, em vez de extrações periódicas durante os 15 dias de armazenamento mudou-se para extrações consecutivas durante um período de 5 dias.

Em cada dia de análise, eram cortadas pequenas porções da parte comestível de vários exemplares do mesmo produto de modo a obter uma amostra representativa (entre 100 – 200 g, dependendo da espécie), que depois eram colocados no liquidificador, pré-refrigerado, de modo a obter uma correcta homogeneização da amostra. No caso dos maracujás, morangos e brócolos (flores) utilizou-se cerca de 10 exemplares inteiros para cada análise. A polpa resultante era utilizada para a análise UHPLC, titulação iodométrica e determinação da capacidade antioxidante dos frutos.

3.1.4. Determinação do teor de vitamina C total por UHPLC-PDA

A extracção das amostras foi baseada na metodologia descrita por Fenoll [19] e Phillips [12], com algumas modificações. Inicialmente foram retirados 3 mL da polpa preparada na secção 3.1.3. e adicionados a 10 mL da solução de extracção (3% MPA-8% ácido acético- 1 mM EDTA) fria. A mistura foi agitada num agitador *vortex* e, em seguida, centrifugada a 10 000 rpm durante 15 minutos (2 - 4°C). O sobrenadante foi recolhido, filtrado (0,22 µm) e armazenado em *ependorfs* revestidos com alumínio, à temperatura de -80 °C. As amostras eram conservadas sob estas condições até ao momento da análise, e por um período não superior a uma semana. No dia da análise, os extractos foram colocados em água fria a descongelar. Finalmente, as amostras foram diluídas na faixa de 1/10 - 1/20, dependendo da matriz, com a fase móvel. Depois eram colocados em *vials* escuros e conservados à temperatura de 4 °C até ao momento da análise. Apenas a análise da polpa de maracujá foi feita no mesmo dia e imediatamente após a extracção. Várias precauções foram tomadas a fim de executar todas as operações sob luz reduzida (uso de frascos âmbar e papel de alumínio) e a baixas temperaturas. Todas as soluções utilizadas para a análise UHPLC-PDA da vitamina C total foram preparadas em água ultra-pura. As soluções padrão *stock* do ácido L-ascórbico foram preparadas em solução extractora e depois diluídas com fase móvel. Na Figura 10 encontram-se resumidas as principais etapas de preparação e análise das amostras.

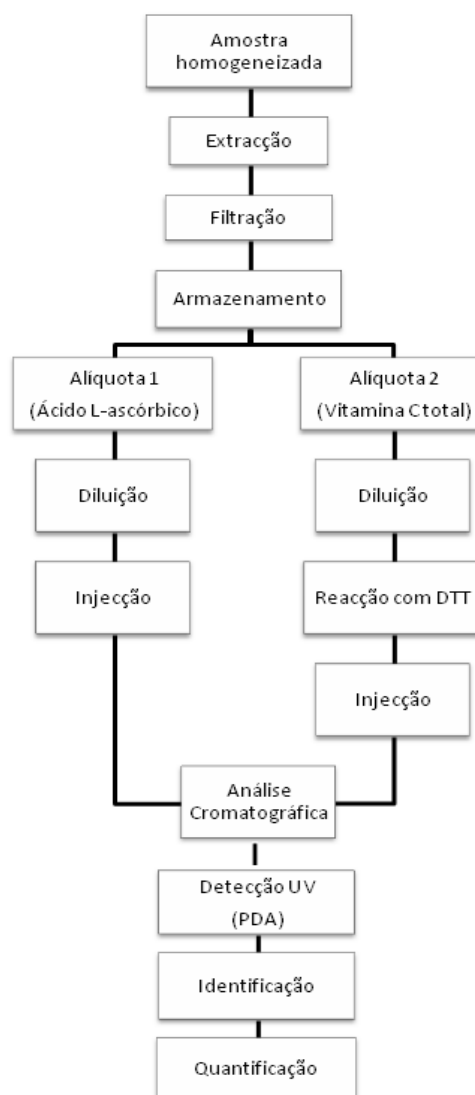


Figura 10 - Metodologia aplicada na determinação da Vitamina C total (L-AA + DHAA) nos produtos hortofrutícolas.

A análise dos produtos por cromatografia de ultra-eficiência foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Quirós [34]. Todas as soluções, fase móvel e padrões eram filtrados (0,22 µm) antes da sua injeção no sistema cromatográfico. As condições aplicadas na análise cromatográfica estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8 - Condições cromatográficas utilizadas na determinação da vitamina C total nos produtos hortofrutícolas.

Coluna Analítica	C18 Acquity HSS T3 (100 × 2,1 mm (d.i.); 1,8 μm)
Volume injeção	2 μL
Temperatura Análise	Temperatura ambiente
Fase móvel	0,1 % (v/v) ácido fórmico
Fluxo	250 μL/ minuto
Detecção	PDA (245 nm)
Tempo de Análise	3 minutos

A identificação dos picos do ácido L-ascórbico nas amostras foi baseada na comparação com os tempos de retenção e espectro de absorção UV das soluções padrão. Foram também registados os comprimentos de onda de detecção na faixa 200 - 400 nm. As amostras foram injectadas em triplicata ($n = 3$) e a quantificação foi realizada segundo o método de padronização externa, utilizando a área do pico. Diariamente foi injectada uma solução padrão (50 μg/mL) para servir de padrão na quantificação do analito. A integração das áreas dos picos, calibração, processamento e armazenamento dos dados cromatográficos foram feitos através do software Empower™ (Waters Corp.). A quantificação foi feita através de curvas de calibração (área *versus* concentração) utilizando o software Excel® (Microsoft Office). O conteúdo de ácido L-ascórbico nos frutos e vegetais foi expresso em mg/100g de amostra.

Os teores do L-AA nas amostras foram calculados pela seguinte expressão:

$$C_A = \frac{A_o \times D \times FR \times 100}{m} \quad (\text{Equação 6})$$

onde, C_A corresponde à concentração do L-AA na amostra (mg/100 g produto); A_o corresponde à área do pico obtida para a amostra; D é o factor de diluição da amostra; FR é o Factor de Resposta e m a massa da amostra (g). O Factor de Resposta (FR) é uma forma de ajustar a proporcionalidade da resposta do detector à concentração de vitamina C. O seu cálculo é dado pela Equação 2:

$$FR = \frac{C_{st}}{A_{st}} \quad (\text{Equação 7})$$

onde, C_{st} corresponde à concentração da solução padrão do ácido L-ascórbico (50 μg/mL) e A_{st} é a área do pico da solução padrão.

A determinação do ácido desidroascórbico foi realizada de acordo com Campos [93], com ligeiras alterações. O DHAA foi quantificado indirectamente, através do método da subtracção, utilizando o DTT como agente redutor. Segundo esta metodologia a quantidade de DHAA na amostra é determinada pela diferença entre o conteúdo de vitamina C total (após a redução do DHAA a L-AA) e o conteúdo do L-AA antes da reacção. O procedimento utilizado foi o seguinte: 1 mL de tampão Tris-HCl contendo 40 mM DTT foi adicionado a 1 mL da amostra diluída. A reacção decorreu durante 30 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz. O processo foi interrompido com a adição de 0,5 mL de uma solução 0,4M de ácido sulfúrico. A análise das amostras foi feita imediatamente após o fim da reacção.

3.1.4. Estudo de degradação do Ácido L-Ascórbico

A degradação do L-AA nos extractos de maracujá e agrião, preparados na secção 3.1.3., foi avaliada durante o período de 2 meses. Os extractos de maracujás foram conservados no escuro à temperatura de 4 °C e -20 °C e os extractos de agrião a -80 °C. As perdas do ácido L-ascórbico verificadas nos extractos ao longo do tempo foram comparadas com as perdas nas soluções padrão do L-AA (50 µg/mL), conservadas nas mesmas condições. A estabilidade do L-AA à temperatura ambiente também foi avaliada no dia da injeção.

3.1.5. Estudo da degradação de vitamina C nos brócolos

O efeito do cozimento convencional dos vegetais na vitamina C foi investigado, baseando-se na metodologia aplicada por Zhang [25]. Foram pesados 60 - 80 g de brócolos (folhas e caules) e cozidos num goblet com 200 mL de água a ferver. O goblet foi tapado com um vidro de relógio, evitando perdas de água por evaporação. Após 5 minutos de cozedura as amostras foram extraídas de acordo com a secção 3.1.3. A retenção da vitamina C total nos extractos e na água da cozedura foi analisada por UHPLC-PDA.

3.1.6. Titulação Iodométrica

Os resultados obtidos pela análise UHPLC foram comparados com os obtidos pela titulação iodométrica. O doseamento da vitamina C foi realizado através de uma titulação iodométrica, segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz [48]. Este método foi aplicado apenas aos extractos preparados no primeiro dia de análise e à polpa de maracujá congelada.

Pesou-se uma quantidade de polpa (dependendo da espécie) e adicionou-se a 10 mL de solução (20% v/v) de ácido sulfúrico e 50 mL água destilada. A solução foi centrifugada (10 000 rpm, 2 – 4 °C, 15 minutos) e depois adicionou-se ao extracto 1 mL de solução 1% (p/v) amido e 1 mL de solução 10% (p/v) iodeto de potássio. Titulou-se a amostra com uma solução 0,002 M de iodato de potássio, até a solução tornar-se azul. Foram feitas três determinações para cada amostra ($n = 3$) e uma prova em branco.

3.1.7. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*

3.1.7.1. Obtenção dos extractos de fruta

Pesou-se cerca de 2 g de polpa e extraiu-se duas vezes à temperatura ambiente sob agitação contínua. Primeiro utilizou-se 20 mL de uma solução de 50% (v/v) etanol e depois com 20 mL de solução 70% (v/v) acetona, com centrifugação intermitente (4000 rpm, 15 minutos). Os sobrenadantes foram em seguida transferidos para um recipiente onde se completou o volume da mistura para 50 mL com água destilada. Este procedimento foi adaptado de Vasco [26]. Os extractos foram conservados no frigorífico (± 4 °C) por um período não superior a uma semana. Procedeu-se à medição da actividade antioxidante dos extractos obtidos no primeiro e último dia de análise dos produtos, dias 1 e 5, respectivamente. No caso dos maracujás, o último dia de análise corresponde ao 15º dia de armazenamento.

3.1.7.2. Preparação do radical ABTS^{•+}

O método utilizado para a preparação do catião radical ABTS foi uma modificação do procedimento descrito por Re [92]. O ensaio com ABTS^{•+} foi obtido pela mistura de 50 mL de solução *stock* ABTS (2 mM) com 200 μ L de solução persulfato de potássio (70 mM). A mistura reaccional foi conservada ao escuro e à temperatura ambiente durante 12 - 16 horas. A solução resultante é estável durante dois dias [92]. Uma vez formado o radical, diluíu-se a solução com tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,4) até se obter uma absorvância de $0,700 \pm 0,021$ aos 734 nm. Esta solução foi preparada *de novo* para cada análise.

3.1.7.3. Determinação da actividade antioxidante pelo Método ABTS ou TEAC (Actividade Antioxidante equivalente em Trolox).

A metodologia aplicada para o estudo da capacidade antioxidante dos frutos e vegetais pelo método ABTS, foi baseada na descrita por Re [92], com algumas alterações. Uma alíquota

de 20 µL dos extractos foi adicionada a 2 mL de solução ABTS^{•+} diluída. O decréscimo da absorvância (734 nm) foi registado em cada 10 segundos, durante 6 minutos. Todas as análises foram feitas em triplicata ($n = 3$) e utilizou-se a solução PBS como branco para calibrar o espectrofotómetro. A absorvância da mistura reaccional do ABTS^{•+} com o extracto foi comparada com a actividade do antioxidante sintético Trolox e os resultados obtidos foram expressos em µM eq. Trolox/ g polpa (actividade antioxidante equivalente ao Trolox por grama de polpa – TEAC/g polpa). A calibração, processamento, armazenamento dos dados foram feitas através do software Lambda 2[®] (Perkin Elmer). Na Tabela 9 estão resumidas as condições experimentais empregues na determinação da actividade antioxidante.

Tabela 9 - Condições experimentais do Método ABTS.

Método	Mistura reaccional	Volume final	Tempo reacção	λ	Padrão
ABTS ^{•+} [92]	20 µL extracto + 2 mL solução ABTS ^{•+} diluída	2,020 mL	6 minutos	734 nm	Trolox

3.2. Material e Reagentes utilizados

3.2.1. Material Utilizado

Os principais materiais utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Material Utilizado

Material	Marca
Membrana filtrante 0,22 µm para solventes aquosos	Millipore
Unidades filtrantes descartáveis tipo Teflon hidrofílico (PTFE 0,22 µm)	Millipore Millex-LG
<i>Eppendorfs</i> (1,5 mL)	Eppendorf International
<i>Eppendorfs</i> (20 mL)	Eppendorf International
<i>Vials</i> (1,5 mL)	VWR International

3.2.2. Equipamentos Utilizados

Os principais equipamentos e materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho encontram-se resumidos na Tabela 11.

Tabela 11 - Equipamentos utilizados.

Equipamento	Marca
Balança Analítica	Mettler Toledo AB204
Liquidificador	Moulinex
Placa de aquecimento com agitação	Heidolph MR-Hei-Standard
Agitador <i>Vortex</i>	J. P. Selecta S.A.
Centrifugadora refrigerada	Sigma 3K30 Bioblock Scientific
Espectrofotômetro	Perkin Elmer UV-vis Spectrofotometer Lambda 2
Equipamento Cromatográfico UHPLC	Acquity UPLC (Waters)
Medidor de pH	Metrohm 7444
Detector UV-vis (PDA)	Acquity UHPLC PDA (Waters)
Sistema de Ultrapurificação de água	Milli-Q Sistema Purificação Direct 8 Millipore
Kit de filtração a vácuo	Millipore

3.2.3. Reagentes utilizados

Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12 - Reagentes e Solventes utilizados.

Reagente	Marca
Ácido L- Ascórbico, 99,0%	Panreac Química S.A.
Ácido Metafosfórico, 33,5%-36,5%	Panreac Química S.A.
Ácido Acético glacial p,a,, 99,8%	Merck
EDTA-Na ₂ , 99,0-101%	Merck
Ácido Fórmico PA-ACS, 98,0%	Panreac Química S.A.
DL-Ditiotreitól (DTT), 99,0%	Acros-Organics
Tampão Tris, 99,7%	Merck
Ácido Sulfúrico, 98,0%	Riedel-de Haen
Iodato de Potássio PA-ACS, 99,4 – 100,4%	Panreac Química S.A.
Iodeto de Potássio, 99,5%	Riedel-de Haen
Amido	Merck
Cloreto de Sódio PA-ACS, 99,5%	Panreac Química S.A.
Cloreto de Potássio PA-ACS, 99,5% -100,5%	Panreac Química S.A.
Dihidrogenofosfato de Potássio, 99,5%	Merck
Hidrogenofosfato de sódio, 99%	Riedel-de Haen
ABTS (2,2-azino-bis(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato), 99,0%	Fluka
Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), 98%	Fluka
Persulfato de Potássio, 99,0%	Sigma-Aldrich
Etanol HPLC grade, 99%	Panreac Química S.A.
Acetona HPLC grade, 99,8%	Lab-Scan
Água Ultra-Pura	Milli-Q

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento e Validação do Método

Existem inúmeros métodos descritos na literatura científica cujo principal objectivo é a separação e identificação da vitamina C em várias matrizes. Com o objectivo de determinar o teor de ácido L-ascórbico nos produtos hortofrutícolas procedeu-se ao desenvolvimento de uma metodologia analítica por cromatografia líquida de ultra-eficiência, baseando-se em metodologias já reportadas.

A vitamina C é um dos antioxidantes mais importantes fornecidos por frutas e legumes, sendo importante a sua determinação nestes produtos através de um método simples e de confiança. A cromatografia líquida de ultra-eficácia foi escolhida para a análise da vitamina C pois apresenta a possibilidade de expandir o alcance das separações cromatográficas em comparação com aquelas obtidas por HPLC, devido à sua alta velocidade e melhor resolução e sensibilidade. Além disso, é um método de fácil operação que não exige grandes etapas de preparação das amostras, aliado à rapidez de obtenção de resultados e ao baixo consumo de reagentes e amostras. O equipamento ACQUITY UPLC (Waters) foi o primeiro equipamento comercial capaz de operar em pressões acima dos 15 000 psi [77].

A fase estacionária desempenha um papel importante na selectividade e eficácia do método. As partículas de sílica de alta resistência (High Strength Silica – HSS) de tamanho 1,8 μm , são as primeiras partículas de sílica pura projectadas e utilizadas em aplicações UHPLC. As colunas ACQUITY UHPLC HSS T3, com fase estacionária C18, apresentam uma inovadora fase ligada alquilo trifuncional (T3), que promove a separação via fase reversa de compostos orgânicos polares e é compatível com fases móveis aquosas. Dado que o L-AA é uma molécula polar de baixa massa molecular, o tempo de análise não é uma questão muito difícil de superar, pois o tempo de retenção numa coluna de fase reversa é geralmente muito curto levando a baixa resolução. Na verdade, a maioria dos métodos HPLC descritos na literatura fazem uso de fases móveis complexas com mais de dois componentes e contendo vários modificadores, a fim de alcançar tempos de retenção ideais. Outro inconveniente encontrado geralmente é a necessidade da supressão iónica, ou seja, trabalhar com um pH mais baixo do que o pKa do L-AA (4,7) que muitas vezes leva à degradação das colunas. Esta coluna permite também aplicações numa ampla gama de pH (2 – 8) uma vez que as partículas de sílica resistem à hidrólise ácida [94]. Deste modo, esta nova fase estacionária constitui uma

excelente alternativa às tradicionais colunas de fase reversa C18 para a determinação do L-AA em várias frutas e vegetais.

A selecção da fase móvel é outro passo determinante para controlar a retenção do analito e obter uma resolução adequada. A separação de substâncias por cromatografia em fase reversa é bastante complexa, pois exige um controlo rígido do pH para que não haja equilíbrio entre a forma iónica e a forma molecular. Normalmente utilizam-se fases móveis com pK_a inferior ao do ácido L-ascórbico ($pK_{a1} = 4,17$), para que ocorra a supressão iónica durante a separação, já que uma molécula com carga possuirá pouca ou nenhuma interacção com a fase estacionária apolar. A forma neutra do L-AA é mais facilmente retida na coluna. Neste caso, a diminuição do pH visa evitar a ionização do L-AA ao manter esta molécula na forma protonada, devido ao aumento da concentração de iões de hidrogénio na solução. A separação foi desenvolvida pelo método de fase reversa, utilizando uma fase móvel aquosa composta por 0,1% ácido fórmico (pH 2,3). A utilização desta fase móvel faz parte do mecanismo de separação da coluna, uma vez que são necessárias fases móveis com pH baixos para manter a estabilidade da vitamina durante a análise. Além disso, fases móveis constituídas por uma elevada percentagem de água combinadas com ácidos orgânicos melhoram significativamente a retenção da vitamina C. A utilização de água ultra-pura para a preparação da fase móvel e solução extractora é uma necessidade inerente à técnica UHPLC. A água é o solvente mais problemático para ser usado como fase móvel, pois traz impurezas (minerais, gases dissolvidos, microorganismos) que podem provocar danos nos vários componentes do sistema cromatográfico (selos, pistões, válvulas, filtros). A fase móvel era preparada diariamente (com água recolhida no mesmo dia) e era filtrada (0,22 μm) antes da sua utilização no aparelho.

Adicionalmente todas as outras soluções utilizadas foram filtradas de modo a evitar contaminações no meio extractivo que contribuíssem para a degradação da vitamina C e o entupimento do aparelho cromatográfico. Além disso, os reagentes utilizados eram de elevada pureza (Tabela 12). A filtração das amostras era igualmente necessária para a protecção da coluna e do sistema de injeção.

Algumas variáveis físico-químicas foram optimizadas para reduzir o tempo de análise, mantendo uma boa resolução entre os picos de L-AA e outros compostos co-extraídos nas amostras. Para a selecção do comprimento de onda de detecção, o espectro do ácido L-ascórbico de uma solução padrão (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi traçado na faixa dos 200 a 400 nm, utilizando um detector de arranjo de fotodiodos (PDA). O comprimento de onda neste estudo foi fixado

aos 245 nm, registando-se o pico máximo de absorção aos 243,3 nm conforme se pode observar na Figura 11. A fase móvel escolhida (0,1 % ácido fórmico) além de ser barata, simples e fácil de preparar, proporcionou bons resultados. Os cromatogramas obtidos apresentaram uma boa resolução, os picos eram simétricos e a linha de base estável (Figura 12). O fluxo da fase móvel influenciou os tempos de retenção do ácido L-ascórbico. Fluxos mais baixos (200 $\mu\text{L}/\text{min}$) resultavam em tempos de retenção maiores. Os melhores resultados foram obtidos aos 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ com níveis de pressões aceitáveis (aproximadamente 5600 psi). Nestas condições a eluição do ácido L-ascórbico ocorreu por volta dos 1,90 – 2,0 minutos. A temperatura de análise aplicada foi a temperatura ambiente (23 – 25 $^{\circ}\text{C}$) pois o sistema UHPLC não possuía sistema de refrigeração. A Figura 11 mostra um cromatograma e espectro de absorção UV-vis típico de uma solução padrão, obtido sob as condições estabelecidas.

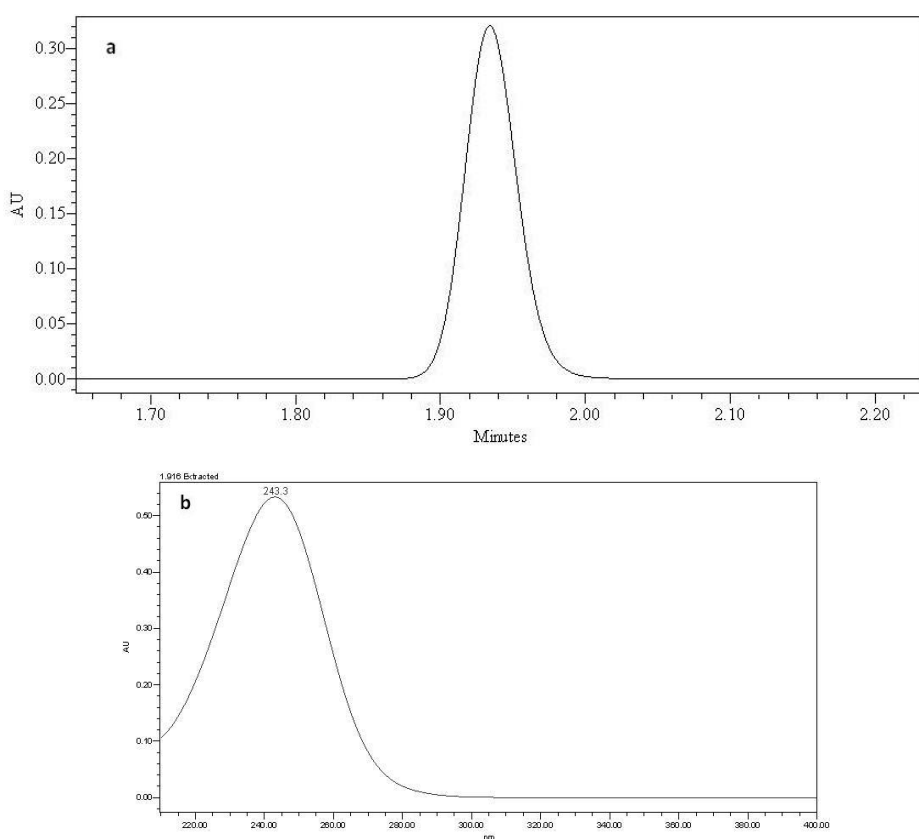


Figura 11 - Cromatograma (a) e espectro de absorção UV (b) obtido da solução padrão de ácido L-ascórbico (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na faixa dos 200 - 400 nm. O tempo de retenção do analito é 1,94 minutos e o seu máximo de absorção ocorre aos 243,3 nm.

Após a otimização das condições experimentais, procedeu-se à validação do método desenvolvido UHPLC-PDA, em termos de selectividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e recuperação. A selectividade e/ou especificidade de um método é um importante parâmetro a ser avaliado para garantir que a quantificação do analito de

interesse não seja afectada pela presença de interferências (metabolitos ou produtos de degradação) presentes na matriz estudada. Para o estudo da selectividade comparou-se os cromatogramas da solução padrão (50 µg/mL) com os cromatogramas de polpa de limão e laranja (diluição 1:10 com a fase móvel). Pela sobreposição dos cromatogramas (Figura 12) obtidos da solução padrão e da matriz estudada, podemos concluir que o método apresenta uma elevada selectividade para o ácido L-ascórbico. Os picos obtidos nas matrizes estudadas não apresentam interferências co-eluentes com o ácido L-ascórbico. Além disso, os picos obtidos para as polpas tal como para a solução padrão são bem resolvidos e simétricos. Os cromatogramas e os espectros de absorção do L-AA obtidos a partir das amostras (Figuras 12 e 13) são idênticos ao da solução padrão (Figura 11). O método é assim capaz de separar o composto de interesse dos outros componentes da amostra.

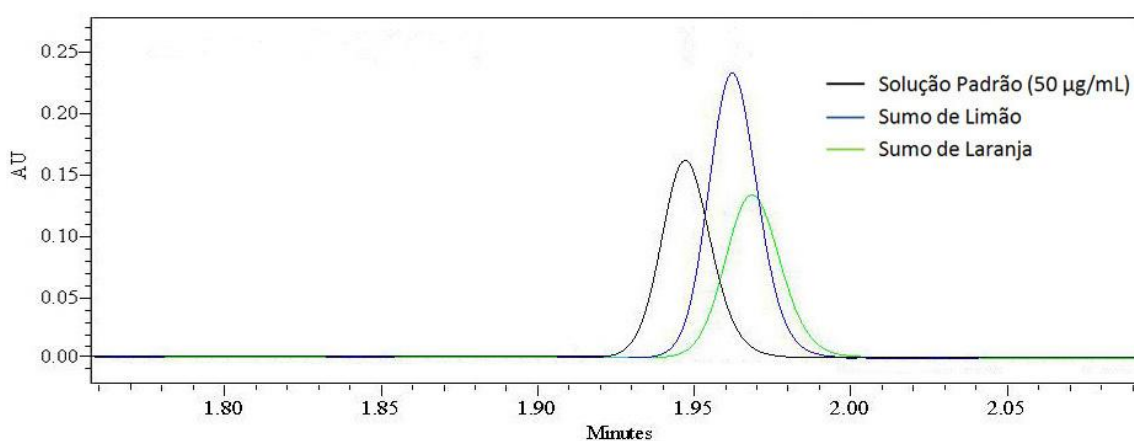


Figura 12 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos da solução padrão de ácido L-ascórbico (50 µg/mL), sumo de limão e sumo de laranja ($\lambda = 245$ nm). O ácido L-ascórbico apresenta um tempo de retenção próximo dos 2 minutos em todas as amostras.

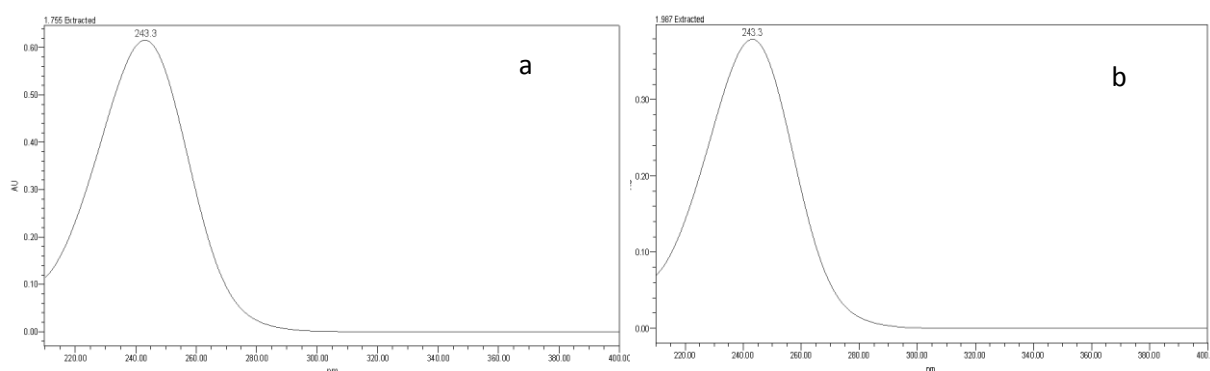


Figura 13 -Espectros de absorção UV obtidos do ácido L-ascórbico do sumo de limão (a) e sumo de laranja (b) na faixa dos 200 - 400 nm. Não se verificam diferenças com o espectro obtido pela solução padrão (Figura 11).

A linearidade do método analítico foi testada através do método de padronização externa. A aplicação do método de padronização interna é bastante adequado quando se pretende determinar analitos instáveis em matrizes complexas, como os alimentos. Tendo em conta a instabilidade da molécula de ácido L-ascórbico esta seria a técnica preferencial. No entanto, quando se pretende a redução do ácido L-ascórbico pelo método da subtracção não é possível aplicar padrões internos [11]. Já a padronização por adição de padrão exigia que fosse testada a linearidade do método em todas as amostras analisadas, pois não há nenhum material de referência adequado que possa ser utilizado como “matriz padrão”. A utilização desta metodologia resultaria num procedimento longo e moroso. Como tal, a padronização externa revelou ser o método mais adequado e simples além de que é rotineiramente aplicado na literatura científica para a quantificação do ácido L-ascórbico [34, 38].

As rectas de calibração foram construídas com soluções padrão de ácido L-ascórbico divididas em duas faixas de linearidade: 0,05 – 2 µg/mL e 2 – 100 µg/mL (Tabela 13). O ácido L-ascórbico é facilmente oxidado em solução aquosa, especialmente quando é exposto à luz e ar. Tendo em conta a instabilidade desta molécula, as soluções padrão eram preparadas diariamente em solução extractora num período curto de tempo e conservadas num frasco escuro (âmbar) a baixas temperaturas (4°C) e pH 1,4.

A recta obtida na gama de concentração mais baixa (0,05 – 2 µg/mL) foi utilizada para avaliar a sensibilidade do método através do cálculo dos limites de detecção e quantificação. Esta recta apresentava um erro padrão da intersecção menor o que se traduziu numa maior sensibilidade, isto é, valores de LODs e LOQs menores. A recta da faixa 2 - 100 µg/mL foi aplicada para a quantificação do ácido L-ascórbico e vitamina C total presente nas amostras. Comparou-se a área do pico do analito a ser quantificado com as áreas obtidas a partir dos padrões de calibração (através do gráfico área obtida *versus* concentração). O método provou ser linear em ambas as faixas de concentração estudadas, com valores de correlação significativos ($r^2 > 0,999$) (Tabela 13). Além disso, o método proposto demonstrou uma boa sensibilidade com limites de detecção e quantificação de **0,022 µg/mL** e **0,067 µg/mL**, respectivamente (Tabela 13). O LOD obtidos por este método é ligeiramente superiores ao obtido por Quirós [34] e Fenoll [19], 10 e 13 ng/mL, respectivamente, e inferior ao limites obtido por Valente [73] (35 ng/mL) Hernández [38] (100 ng/mL). O LOQ é superior ao obtido por Frenich [85] (50 ng/mL) e Odriozola-Serrano [13](57 ng/mL) e inferiores ao obtido por Burini [53] (830 ng/mL).

Tabela 13 - Linearidade e sensibilidade do método UPLC-PDA para a determinação do ácido L-ascórbico.

Faixa de Linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	Equação da recta de calibração ^a (y)	r^{2b}	S_b^c	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
0,05 - 2	$27179x - 146,88$	0,9998	181,4	22	67
2 - 100	$27735x - 4569,3$	0,9999	7642,5	---	---

^ay= declive \pm ponto de intersecção com o eixo dos yy ($n = 3$).

^bcoeficiente de correlação.

^cdesvio padrão do ponto de intersecção com eixo dos yy da recta de calibração.

O desenvolvimento de um método analítico está sujeito a variações aleatórias, que podem ser estimadas pela precisão. Essas estimativas são expressas através da precisão intra-dias (repetibilidade) e precisão intermediária do método. O método demonstrou uma excelente precisão: a variabilidade foi sempre inferior a 2%, tanto na repetibilidade (Tabela 14) como na precisão intermediária (Tabela 15). Os valores obtidos foram semelhantes aos obtidos por Quirós [34] (0,5 – 2%) e Odriozola-Serrano [13] (0,7 – 1,9%) e inferiores aos obtidos por Burini [53] (0,8 – 4,7%) e Romeu-Nadal [56] (3,09%). Os valores do coeficiente de variação demonstrados nas Tabelas 14 e 15 confirmam que os resultados estão dentro dos critérios aceitáveis ($CV \leq 5\%$). Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) [95], o valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, concentração do analito na amostra, tipo da matriz, não se admitindo valores superiores a 5%.

Tabela 14 - Precisão intra-dias (Repetibilidade) do método UHPLC-PDA para a determinação do ácido L-ascórbico.

Analito	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$) ^a	RSD (%) ^b
Ácido L-Ascórbico	100	$99,63 \pm 0,57$	0,57
	10	$10,03 \pm 0,06$	0,60
	5	$4,94 \pm 0,04$	0,81
	0,2	$0,20 \pm 0,002$	1,00

^amédia das replicatas ($n = 6$) \pm desvio-padrão.

^bcoeficiente de variação percentual de seis replicatas ($n = 6$) para cada concentração, injectadas no mesmo dia.

Tabela 15 - Precisão inter-dias do método UHPLC-PDA para a determinação do ácido L-ascórbico.

Analito	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração obtida (µg/mL) ^a	RSD (%) ^b
Ácido L-Ascórbico	100	99,34 ± 1,25	1,26
	10	9,91 ± 0,16	1,61
	5	4,98 ± 0,08	1,81
	0,2	0,20 ± 0,004	2

^amédia das replicatas ($n = 6$) ± desvio-padrão.

^bcoeficiente de variação percentual de seis replicatas ($n = 6$) para cada concentração, injectadas em 3 dias não consecutivos.

A recuperação do método foi testada para avaliar a eficácia de extracção do método proposto e o efeito da matriz sobre a precisão das análises. Obtiveram-se valores de recuperação média bastante satisfatórios (Tabela 16), 88,9% - 102,5% e 96,7% - 121,1% para o ácido L-ascórbico e vitamina C total, respectivamente. Estes valores estão dentro das especificações esperadas para matrizes complexas (80 - 120%) [95].

Tabela 16 - Recuperação do método UHPLC-PDA para a determinação do ácido L-ascórbico e vitamina C total nas diversas amostras.

Produto	Recuperação (%) do ácido L-ascórbico ^a			Recuperação (%) da vitamina C total ^a		
	Nível I	Nível II	Recuperação Média (%) ^b	Nível I	Nível II	Recuperação Média (%) ^b
	10 (µg/mL)	50 (µg/mL)		10 (µg/mL)	50 (µg/mL)	
Maracujás	101,3 ± 1,9	103,7 ± 2,3	102,5 ± 1,7	112,7 ± 2,9	109,8 ± 1,9	111,3 ± 4,3
Agriões	98,33 ± 2,5	87,53 ± 3,11	92,93 ± 7,63	104,5 ± 2,8	106,0 ± 2,2	105,2 ± 2,8
Pimentos Verdes	102,2 ± 1,0	87,0 ± 2,2	94,6 ± 7,4	106,4 ± 4,1	103,1 ± 2,4	104,7 ± 3,7
Anonas	95,7 ± 2,9	96,3 ± 3,4	96,0 ± 0,5	123,1 ± 3,6	119,0 ± 3,0	121,1 ± 3,1
Morangos	103,7 ± 1,6	92,6 ± 2,8	98,2 ± 4,0	107,1 ± 1,6	97,4 ± 3,1	102,2 ± 5,4
Papaias	96,0 ± 3,7	95,5 ± 4,7	95,7 ± 0,5	95,1 ± 1,3	101,5 ± 2,8	98,3 ± 4,0
Limões	93,4 ± 2,4	84,5 ± 2,9	88,9 ± 2,9	106,0 ± 1,6	87,4 ± 3,2	96,7 ± 2,4
Brócolos	96,3 ± 3,2	95,4 ± 2,8	95,9 ± 0,7	104,0 ± 2,3	102,6 ± 2,4	103,3 ± 2,6
Pimentos Vermelhos	101,0 ± 3,6	99,1 ± 3,8	100,1 ± 1,6	105,8 ± 1,8	104,1 ± 3,5	104,9 ± 1,1

^arecuperação do padrão adicionado às polpas, expresso em média das recuperações ($n = 3$) ± desvio-padrão.

^brecuperação média do padrão adicionado às polpas, expresso em média das recuperações ($n = 2$) ± desvio-padrão.

O método proposto mostrou-se adequado, com selectividade, linearidade, precisão e recuperação de acordo com os requisitos recomendados pela literatura. Deste modo, pode ser empregue na análise de produtos alimentares.

4.2. Análise da vitamina C total nos produtos hortofrutícolas

Os produtos hortofrutícolas devem ser analisados, preferencialmente, logo após a colheita de modo a garantir os valores mais próximos e exactos do seu conteúdo real de vitamina C. No entanto, as condições experimentais exigidas não permitiam que as amostras fossem analisadas no local da colheita. Atrasos entre a colheita e a refrigeração podem resultar em perdas directas devido à perda de água e deterioração e perdas indirectas relacionadas com o sabor e qualidade nutricional [8]. A entrega dos produtos regionais no laboratório um a dois dias após a sua colheita foi de extrema importância pois permitiu atenuar as perdas da vitamina C.

A refrigeração e/ou congelamento dos alimentos são os métodos de conservação mais aplicados com o objectivo de prolongar a durabilidade dos alimentos frescos e preservar o seu conteúdo nutricional. A gestão da temperatura é um factor muito importante para alargar o prazo de validade e manter a qualidade das frutas e legumes frescos. Sabe-se que o armazenamento à temperatura ambiente resulta em perdas maiores do que em temperaturas de refrigeração [3]. As reacções químicas, bioquímicas e fisiológicas não cessam completamente durante o arrefecimento. As taxas dessas reacções variam de acordo com a temperatura de armazenamento. Como a vitamina C é muito sensível às elevadas temperaturas o armazenamento dos produtos hortofrutícolas a 4 °C foi a primeira das várias etapas deste estudo. No caso da anona, a sua refrigeração a baixas temperaturas causa lesões nos tecidos e acelera as perdas da vitamina C [8]. Como tal, a anona foi mantida à temperatura ambiente durante os cinco dias consecutivos de análise.

A homogeneização das amostras é importante para garantir a maior superfície de contacto possível da solução extractora com a matriz vegetal. A extracção de fracções da amostra com tamanhos irregulares torna a extracção menos eficiente. O uso de liquidificadores ou processadores permitem também romper as células vegetais e libertar a vitamina C da matriz.

O principal objectivo deste estudo foi desenvolver um método rápido e simples para a análise da vitamina C que possibilitasse bons resultados na separação cromatográfica e recuperação. A extracção da vitamina C é a etapa mais importante do processo de análise. Devido à sua natureza lábil, os procedimentos de extracção e análise têm como principal objectivo evitar as perdas da vitamina C. Factores como a luz, pH, temperatura, exposição ao oxigénio, a presença de metais e enzimas oxidantes devem ser controlados durante a preparação das amostras para análise, especialmente se os procedimentos envolvem disrupção das células vegetais. Caso contrário, os resultados analíticos obtidos podem conter erros significativos. A solução extractora tem de garantir que a grande maioria da vitamina C é extraída da matriz e também minimizar a sua oxidação. A solução de extracção escolhida foi baseada na solução utilizada por Wall [24] e era composta por 3% MPA – 8% ácido acético- 1 mM EDTA. Os testes de recuperação demonstraram que esta solução extractora utilizada é bastante eficaz, tal como relatado por Hernández [38] e Nováková [11]. O MPA é o reagente utilizado pela grande maioria dos trabalhos revistos pois é bastante eficaz na extracção e estabilização da vitamina C [83]. A principal função deste reagente é manter um ambiente ácido juntamente com o ácido acético [4, 38, 53]. O baixo pH da solução extractora (1,4) previne a ionização do ácido L-ascórbico. Outras vantagens da utilização do MPA incluem a inibição da catálise enzimática e metálica, além de ajudar a clarificar o extracto e precipitar proteínas presentes na amostra. Já o EDTA auxilia na quelação de iões metálicos inibindo a oxidação da vitamina C provocada pelos metais [4]. O manuseamento das amostras foi sempre conduzido a baixas temperaturas, através do uso de aparelhos ou soluções refrigeradas. Além disso, a preparação das amostras foi realizada o mais rapidamente possível minimizando a exposição ao oxigénio e luz, utilizando apenas material âmbar ou revestido por folha de alumínio. A preparação da amostra num curto espaço de tempo e utilizando uma metodologia simples foi fundamental para prevenir a degradação da vitamina C.

Após o processo de extracção os extractos foram conservados a -80°C até ao dia da análise. Segundo Phillips [12] a refrigeração dos extractos a -60°C ou temperaturas inferiores durante pelo menos 4 semanas é adequada para muitas aplicações, pois as perdas verificadas são mínimas (inferiores a 1%). Deste modo, os extractos foram conservados nestas condições (por um período inferior a uma semana) e analisados quando o aparelho cromatográfico estivesse disponível. Apenas no caso dos maracujás, os extractos foram imediatamente analisados após a extracção. Só após o estudo dos maracujás se decidiu mudar a metodologia de modo a reduzir o tempo de estudo de cada fruto para cinco dias em vez dos quinze, devido ao prazo de validade dos produtos e à disponibilidade do equipamento cromatográfico.

Após a validação dos parâmetros analíticos, o método foi aplicado à análise dos produtos hortofrutícolas. Inicialmente os cromatogramas obtidos, no caso do maracujá, mostraram o pico do L-AA associado com outro pico mais pequeno (“ombro”) não identificado. Esta interferência foi eliminada de forma eficaz com uma diluição 1/20 em vez da diluição 1/10 inicial. Todas as diluições foram feitas com a fase móvel, e no caso dos outros frutos e vegetais na concentração 1/10 para manter as concentrações do ácido L-ascórbico dentro da faixa de linearidade. Nas condições utilizadas a eluição do ácido L-ascórbico ocorreu por volta dos 2 minutos, o que permitiu que a análise das amostras fosse um processo bastante rápido (Figura 15). O tempo de retenção obtido por este método foi relativamente baixo (aproximadamente 2 minutos), especialmente se comparado com outros métodos descritos na literatura (Tabela 5). A utilização de tempos de corrida cromatográficos curtos (3 minutos) permitiu uma rápida análise das amostras aliado a um reduzido consumo de fase móvel, contribuindo para a excelente relação custo/benefício do método desenvolvido. Ao contrário do que relataram Franke [41] e Kall [54] não se verificou qualquer incompatibilidade do uso do MPA com o método aplicado. O método UHPLC-PDA demonstrou uma separação completa para o ácido L-ascórbico em todas as matrizes testadas. Os picos obtidos, independentemente da matriz, eram simétricos e não apresentavam deformações nem desvios na linha de base ou no tempo de retenção do analito (Figura 15).

A vitamina C total nos alimentos é assumida como sendo a soma do conteúdo de ácido L-ascórbico com o ácido desidroascórbico. A quantificação do DHAA foi feita indirectamente pelo método da subtracção, utilizando o DTT como agente redutor. Devido à dificuldade em detectar directamente o DHAA, decidiu-se adoptar esta metodologia. O DTT é muito conhecido pelo seu carácter redutor, resultante da forte tendência em formar a estrutura oxidada em forma de anel, pela formação de uma ponte dissulfito interna (Figura 14). A redução do DHAA para AA pela acção do DTT é dependente do pH, temperatura e tempo de reacção [55]. Apesar do DTT ser já aplicado com sucesso por vários autores na conversão do DHAA a L-AA, alguns parâmetros como a quantidade de reagente e tempo de reacção necessitavam de optimização. Segundo Sánchez-Mata [55], a acção redutora deste reagente é limitada a valores de pH próximos da neutralidade (6,5 – 8), pois nestas condições ocorre a oxidação do grupo tiol (-SH), originando a forma tiolato (-S⁻) que é reactiva (Figura 14) [96].

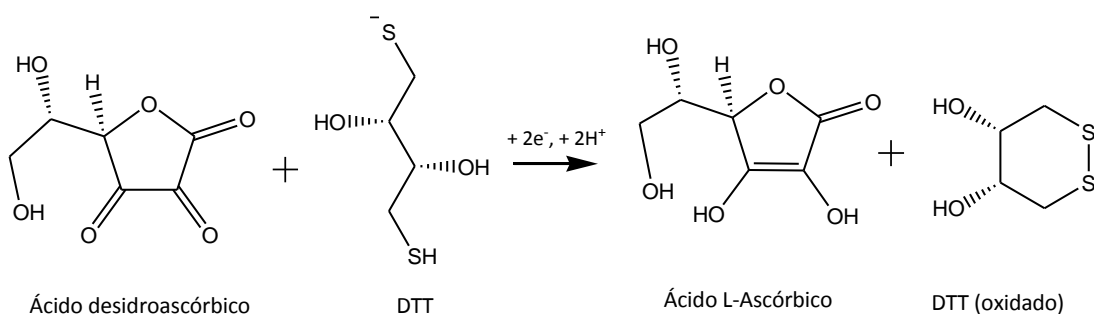


Figura 14 - Redução do ácido desidroascórbico pelo DTT. Em pH próximos da neutralidade o grupo tiol da molécula de DTT oxida-se, promovendo a reacção de conversão do ácido desidroascórbico a ácido L-ascórbico. A forma protonada do DTT não é reactiva (adaptado da fonte: [96]).

Como o DTT não é eficaz em soluções ácidas [83], foi necessário aumentar o pH dos extractos utilizando uma solução de DTT preparada em tampão Tris-HCl (pH 9,0), de acordo com Campos [93]. Deste modo, garantiu-se que a redução do DHAA ocorria na máxima eficácia. Segundo este mesmo autor, a reacção estaria completa dentro de 10 minutos, utilizando uma concentração de 40 mM DTT. Furusawa et al [82] também relataram que uma solução de 50 mM DTT era eficaz na conversão do DHAA em apenas 10 minutos. No entanto, decidiu-se aumentar o tempo de reacção de modo a garantir que a conversão era total. A reacção decorreu ao escuro e à temperatura ambiente. Enquanto a reacção decorria, outras amostras eram analisadas no sistema cromatográfico. Após 30 minutos, a reacção foi interrompida com a adição da solução 0,4 M ácido sulfúrico para reduzir o pH da solução (pH 2 - 3) antes da injeção no equipamento cromatográfico. O baixo pH da solução torna o DTT inactivo. Este passo é importante pois permite estabilização da vitamina C reduzida pelo DTT até ao momento da sua análise. O efeito do DTT na análise da vitamina C total nos frutos e vegetais é ilustrado na Figura 15. Nota-se um aumento da absorvância do pico do ácido L-ascórbico após a redução com o DTT, o que significa que a redução foi eficaz. Não foram observados picos relativos ao DTT após a injeção da amostra, tal como descrito por Furusawa [82] e Sánchez-Mata [55]. Pela observação do espectro de absorção (Figura 15) podemos comprovar que o composto obtido após a redução é apenas ácido L-ascórbico. Além disso, o DTT não causou nenhuma interferência com os picos obtidos, nem se verificaram variações nos tempos de retenção. Isto está de acordo com o obtido por Sánchez-Mata [55] e Gökmen [35].

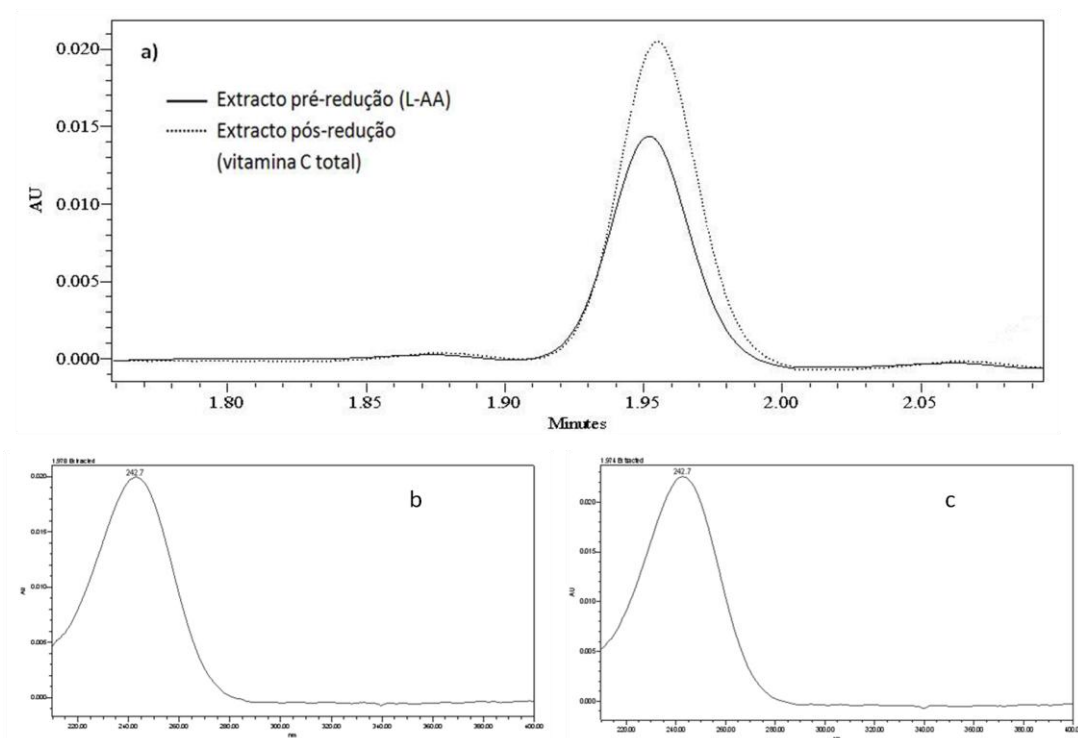


Figura 15 - Cromatograma (a) e espectros de absorção da polpa de maracujá regional pré (b) e pós-redução (c) com DTT (245 nm).

4.2.1. Aplicação do método a matrizes vegetais

A retenção da vitamina C total (ácido L-ascórbico e ácido desidroascórbico) nos alimentos mantidos à temperatura de refrigeração (4 °C) foi avaliada. Note-se que durante este estudo não houve controlo sobre alguns factores importantes para os teores de vitamina C em frutas e vegetais como estado de amadurecimento, condições de cultivo e variedades das frutas estudadas. Pelo meu conhecimento, este é o primeiro estudo analítico com dados sobre o conteúdo de L-AA e vitamina C total nos produtos cultivados na ilha da Madeira. Os resultados obtidos foram comparados com outros previamente descritos na literatura.

4.2.1.1. Maracujás

O maracujá (*Passiflora edulis Sims*) é uma fruta tropical, cujas propriedades antioxidantes são bastante conhecidas devido à presença natural de polifenóis, flavonóides, alcalóides e vitamina C [97]. É também considerado uma fonte de vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina, cálcio e fósforo. A sua polpa possui um aroma exótico característico, sendo utilizada para preparar sumos, refrigerantes ou sobremesas [26, 98]. Devido ao seu clima ameno, a ilha da Madeira possui condições excelentes para a produção de algumas frutas tropicais, como o maracujá, anona e papaia [73]. Neste estudo foram analisados maracujás

regionais e importados, originários do Zimbabué. Foram feitas análises periódicas durante 15 dias para avaliar a retenção da vitamina C nos produtos ao longo do tempo de armazenamento. Ao contrário dos outros produtos, os maracujás foram sujeitos a extracção periodicamente durante os 15 dias de armazenamento, nomeadamente nos dias 1, 4, 8, 11 e 15. As Figuras 16 e 17 demonstram a variação dos teores de vitamina C total encontrados nestes frutos ao longo dos quinze dias de estudo.

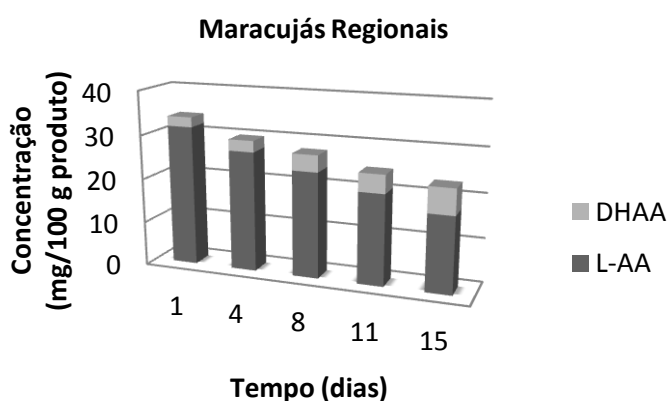


Figura 16 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras de maracujá regional, armazenadas a 4 °C, durante 15 dias.

Os teores máximos encontrados, inicialmente, do L-AA e vitamina C total no maracujá regional foram, respectivamente, $31,76 \pm 1,71$ e $33,97 \pm 1,63$ mg /100 produto (Figura 16). O valor de DHAA inicial encontrado correspondia a $2,21 \pm 1,70$ mg/100g produto (6,51% da vitamina C total). As concentrações do ácido L-ascórbico e vitamina C total foram diminuindo ao longo do tempo. Já o conteúdo de DHAA foi aumentando com o período de armazenamento (Figura 16). O decréscimo do L-AA no final da análise foi de 45,62% (3,04%/dia) e 32,03% (2,14%/dia) no caso da vitamina C total. No final dos quinze dias de análise o nível de DHAA encontrado foi $5,82 \pm 1,40$ mg/100g produto (25,21% da vitamina C total). Os valores médios encontrados para o L-AA, vitamina C total e DHAA foram, respectivamente, $24,12 \pm 5,64$; $27,82 \pm 4,29$ e $3,70 \pm 1,44$ mg/100 g produto (14,14% da vitamina C total).



Figura 17 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras de maracujá importado, armazenadas a 4 °C, durante 15 dias.

No caso dos maracujás importados a concentração máxima de vitamina C também foi encontrada no primeiro dia de análise (Figura 17). Os valores encontrados foram $27,78 \pm 1,3$ e $30,53 \pm 1,21$ mg/100 g produto para o L-AA e vitamina C total, respectivamente. A concentração de DHAA encontrada foi $2,75 \pm 1,96$ mg/100g produto (9,01% da vitamina C total). Tal como o verificado nos maracujás regionais, o conteúdo da vitamina C foi diminuindo com o passar do tempo e o DHAA aumentando. No final da análise, obteve-se um decréscimo de 44,24% (2,95%/dia) para o L-AA e 29,97% (2,0%/dia) para a vitamina C total. O DHAA obtido no final foi 5,89 mg/100 g produto (27,59% da vitamina C total). Os valores médios encontrados para o L-AA, vitamina C total e DHAA foram, respectivamente, $22,02 \pm 4,65$; $26,15 \pm 3,36$ e $4,13 \pm 1,34$ mg/100 g produto (16,54% da vitamina C total).

Os teores do L-AA e vitamina C total encontrados em todos os dias de análise foram inferiores aos dos maracujás regionais. As concentrações do L-AA encontradas nos maracujás regionais foram, em média, 8,71 % superiores às dos maracujás importados. As perdas da vitamina C também foram superiores no caso dos maracujás regionais. O pH das polpas pode justificar estes resultados uma vez que a polpa de maracujá importada era mais ácida (pH 2,68) que a do maracujá regional (pH 3,01). Apesar da acidez, os teores de DHAA eram superiores nos maracujás importados. Isto deve-se possivelmente ao facto dos maracujás regionais serem mais “frescos” e não terem tanto tempo de armazenamento como os maracujás importados, o que contribuí para o decréscimo dos valores de vitamina C e consequentemente aumento dos valores do DHAA. É de notar que o DHAA obtido nos frutos é também resultante do processo de preparação das amostras. Os resultados obtidos tanto nos maracujás regionais como importados são ligeiramente inferiores aos obtidos por Valente et al [73] que encontraram em maracujás originários da Colômbia $36,3 \pm 0,62$ mg L-AA/ 100 g produto. No entanto, são

semelhantes aos valores indicados por Zeraik [98] (30,00 mg/100g) e Vasco [26] (30,00 – 40,00 mg/100g). Nestes trabalhos não foram tidos em conta os valores da vitamina C total e consequentemente do DHAA. Apesar disso, os valores encontrados neste estudo são superiores aos relatados na Tabela 3 (30 mg/100 g produto).

O congelamento da polpa de maracujá é um hábito comum, tanto a nível industrial como a nível doméstico, visto que a refrigeração não é suficiente para retardar as alterações biológicas e químicas que ocorrem durante o armazenamento. O método desenvolvido neste estudo também foi aplicado à análise de polpa de maracujá regional congelada (-18 °C), adquirida num supermercado local. A Figura 18 apresenta os resultados dessa análise.

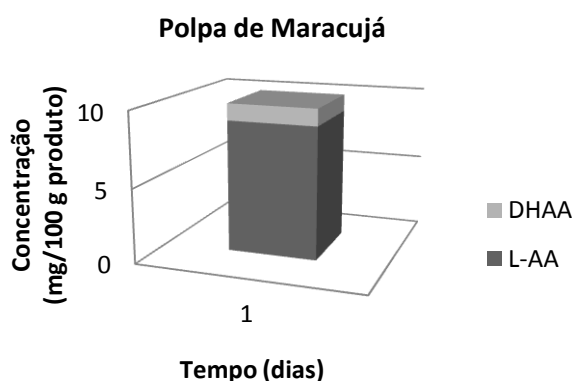


Figura 18 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) na polpa de maracujá regional conservada a -18 °C.

O conteúdo de ácido L-ascórbico da polpa de maracujá foi $8,87 \pm 1,61$ mg/100 g produto e $10,27 \pm 1,16$ mg/100 g produto de vitamina C total. O DHAA obtido foi $1,39 \pm 0,58$ mg/100g produto que correspondia a 13,59% da vitamina C total (Figura 18). Apesar de não terem sido medidos os valores antes do processamento da polpa e baseando-se nos resultados obtidos, podemos concluir que mesmo à temperatura de -18 °C ocorreu a degradação do conteúdo de L-AA e vitamina C total. Essa perda pode ter ocorrido durante o processamento ou armazenamento da polpa. Segundo Davey [3], mesmo a temperaturas negativas ocorrem reacções químicas apesar de serem retardadas pelas baixas temperaturas. A condição da embalagem é outro factor que pode influenciar a estabilidade da vitamina C. A embalagem de plástico transparente não é adequada pois não mantém o produto protegido da luz nem da humidade. Outra hipótese é a presença de oxigénio dissolvido no produto ou no espaço livre da embalagem, favorecendo reacções aeróbicas de degradação. Além disso, o pH da polpa congelada (3,50) era superior ao da polpa *in natura* (2,68). A adição de água à polpa pode ter contribuído para o aumento do pH e consequente oxidação do L-AA. Os teores de DHAA

encontrados são inferiores aos observados durante a análise dos frutos *in natura* (6,51 - 25,21% da vitamina C total), mostrando que o congelamento retardou as reacções de oxidação do L-AA. Outra hipótese é que o DHAA tenha sofrido degradação tendo em conta a instabilidade desta molécula durante o processamento e longos períodos de armazenamento (aproximadamente 1 ano).

4.2.1.2. Agriões

O agrião (*Nasturtium officinale R. Br.*) é um vegetal folhoso que cresce em ambientes aquáticos, sendo um vegetal com grande aplicação na culinária portuguesa. O agrião é uma fonte natural de vitaminas (A, C), minerais (ferro, iodo, cálcio) e fitoquímicos benéficos (luteína e carotenóides). Normalmente tem uma vida útil curta (aproximadamente 7 dias) que pode ser estendida através do congelamento permitindo um período mais longo para distribuição e armazenamento [99, 100]. Não foi possível a análise de agrião importado neste estudo pois todo o agrião consumido na RAM é produzido localmente e não se encontra nos mercados agrião proveniente de fora da ilha. A variação da vitamina C no agrião, ao longo de 5 dias consecutivos, foi avaliada e os resultados encontram-se descritos na Figura 19.

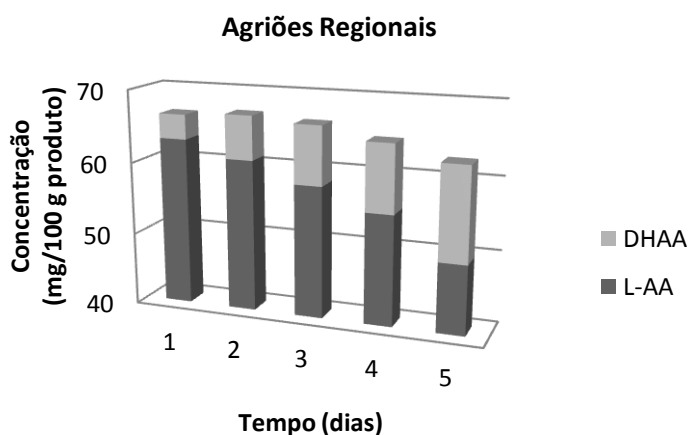


Figura 19 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras agrião, armazenadas à temperatura de 4°C, durante 5 dias.

Ao contrário dos maracujás, os agriões e os produtos estudados posteriormente, não foram analisados no dia da preparação das amostras. Devido a problemas de disponibilidade do aparelho cromatográfico decidiu-se conservar os extractos na arca frigorífica (-80 °C) até ao dia da análise. Este novo método permitiu estudar a variação da vitamina C nos produtos hortofrutícolas durante a sua vida útil, tornando assim o período de estudo de cada produto mais curto.

Os extractos correspondentes ao primeiro dia apresentavam $63,16 \pm 1,63$ mg L-AA/100 g produto de L-AA; $66,56 \pm 1,96$ mg vitamina C total/100g produto e $3,40 \pm 1,84$ mg DHAA/100g produto (Figura 19). A concentração máxima obtida de L-AA foi no dia 1, enquanto para a vitamina C total foi no dia 2 ($67,0 \pm 2,31$ mg/100g produto). Após 5 dias, as perdas totais de vitamina C total foram de 5,98% e o DHAA obtido no final correspondia a 20,75% da vitamina C total ($12,99 \pm 0,75$ mg/100 g produto). O decréscimo da vitamina C (5,98%) ao longo dos 5 dias foi pouco significativo, pois a concentração do DHAA aumentava praticamente na mesma proporção que o decréscimo do L-AA. Já as concentrações do L-AA diminuíram bastante (21,48%) com perdas médias diárias de 4,30%. Os valores médios obtidos foram $57,43 \pm 5,29$ mg L-AA/100g produto, $65,42 \pm 1,82$ mg vitamina C total/ 100 g produto e $7,99 \pm 3,59$ mg DHAA/100 g produto (12,33% da vitamina C total). Os valores de L-AA encontrados neste estudo foram superiores aos encontrados por Franke [41] (12,3 – 18,4 mg/100g produto) e Gonçalves [100](36,75 mg/100 g produto) e inferiores aos indicados por Martinez-Sánchez [101] (81 mg/100 g produto). Já as concentrações da vitamina C total estão de acordo com os descritos por Gonçalves [100] (64,83 mg/100g produto) e inferiores aos de Martinez-Sánchez [101](104 mg/100g). Os teores de DHAA relatados por Gonçalves [100] (43,31% da vitamina C total) são o dobro dos descritos no presente estudo. Martinez-Sánchez et al [101] encontraram 23 mg DHAA/100 g produto, que correspondem a 22,12% da vitamina C total dos agriões. Estes valores são semelhantes aos obtidos no último dia de análise do presente estudo.

As perdas verificadas e elevados níveis de DHAA podem estar relacionados com o curto prazo de validade do agrião. Devido à sua fragilidade e fácil deterioração as taxas de degradação do L-AA no agrião são elevadas, mas os níveis de vitamina C mantiveram-se praticamente constantes. Além disso, a sua elevada área superficial, elevada quantidade de ferro e actividade enzimática (peroxidase) podem ter um papel decisivo na oxidação do L-AA a DHAA.

4.2.1.3. Pimentos Verdes

O pimento (*Capsicum annuum L.*), frequentemente designado por pimentão, é uma cultura agrícola muito popular, devido à sua cor, sabor e valor nutricional. Os vários cultivares produzem vegetais com diferentes cores sendo as mais conhecidas o verde, o amarelo e o vermelho. Os pimentos são uma boa fonte de antioxidantes importantes para a dieta humana, como a vitamina A, vitamina C, compostos fenólicos e carotenóides que, são responsáveis pela sua coloração [102]. Os pimentos frescos são dos vegetais que têm maior teor de vitamina C [103].

A análise da degradação da vitamina C foi testada ao longo de cinco dias consecutivos em pimentos verdes regionais e importados. Os resultados obtidos encontram-se descritos nas Figuras 20 e 21.

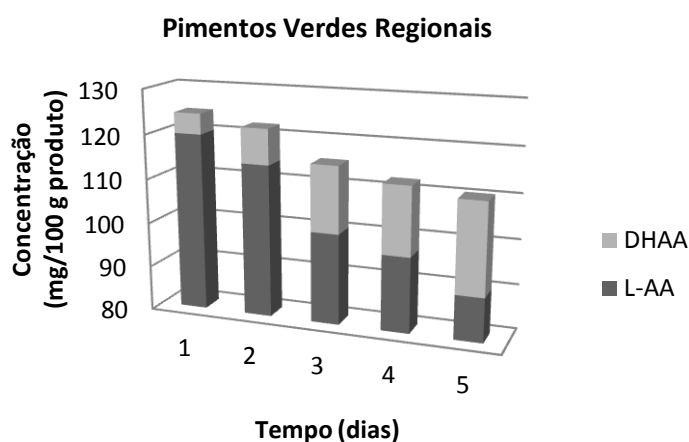


Figura 20 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras de pimento verde regional, armazenadas à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.

Pela análise da Figura 20, podemos verificar que os pimentos verdes são uma excelente fonte de vitamina C (L-AA e DHAA). No início do estudo foram encontrados $119,91 \pm 13,13$ mg/100 g produto de L-AA e $124,52 \pm 13,10$ mg/100 g produto de vitamina C total. Os níveis de DHAA iniciais ($4,61 \pm 0,83$ mg/100 produto) correspondiam a 3,70% da vitamina C total. Ao longo do tempo as concentrações de L-AA e vitamina C total foram diminuindo. O decréscimo foi notável sobretudo a partir do dia 3. No final do estudo, a redução foi de 25,02% (5%/dia) para o L-AA e 11,28% para a vitamina C total (2,27%/dia). O aumento do DHAA também tornou-se mais significativo após o terceiro dia, resultando numa concentração final de $20,57 \pm 0,82$ mg/100 g produto (18,62% da vitamina C total). Os valores médios encontrados nos pimentos verdes regionais foram $104,26 \pm 12,44$ mg/100g produto de L-AA, $116,97 \pm 6,13$ mg/ 100 g produto de vitamina C total e $12,71 \pm 6,37$ mg/100 g produto de DHAA (11,11% da vitamina C total).

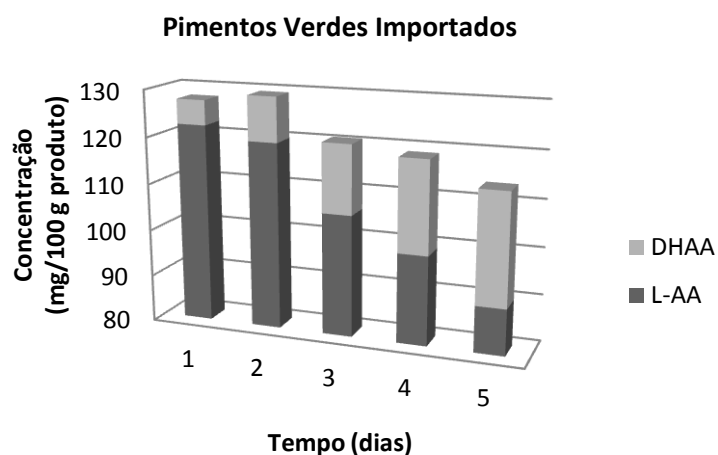


Figura 21 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras de pimento verde importado, armazenadas à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.

Os pimentos verdes importados também apresentavam valores de vitamina C elevados (Figura 21), ultrapassando os verificados nos cultivares regionais. Inicialmente obteve-se, respectivamente, para o L-AA, vitamina C total e DHAA 122,43 ± 12,81 mg/100 g produto, 127,71 ± 12,9 mg/100 g produto e 5,28 ± 0,76 mg/100 g produto. O valor de DHAA correspondia 4,13% da vitamina C total inicial. A concentração máxima de vitamina C total (129,28 ± 10,1 mg/100 g produto) foi obtida no segundo dia de análise. No caso dos pimentos verdes importados, o padrão da degradação da vitamina C foi semelhante ao dos pimentos verdes regionais. A degradação do L-AA e aumento do DHAA foram notáveis principalmente a partir do terceiro dia. As perdas de L-AA totais foram de 26,61% (5,32%/dia) e 10,99% (2,20%/dia) para a vitamina C total. O DHAA obtido na última análise (dia 5) correspondia a 20,96% da vitamina C total (23,83 ± 0,94 mg/100 g produto). Os valores médios obtidos nos cinco dias de análise para o L-AA, vitamina C total e DHAA nos pimentos regionais foram, respectivamente, 107,40 ± 13,77; 122,01 ± 6,47 e 14,61 ± 7,48 mg/100g produto (12,25% da vitamina C total).

Em termos de comparação, os pimentos importados eram mais ricos em L-AA e vitamina C total que os regionais. Em média, o teor de L-AA e vitamina C total nos pimentos importados eram 2,93% e 4,13% superiores aos pimentos regionais, respectivamente. Isto pode estar relacionado com as condições de crescimento de cada um dos produtos. Os valores de DHAA iniciais também eram maiores nos pimentos importados provavelmente devido ao maior tempo de armazenamento. As maiores perdas também se verificaram nos pimentos verdes importados, o que pode estar associado com o seu grau de amadurecimento visto que foram colhidos há mais tempo que os pimentos regionais. Os pimentos são sensíveis a danos

causados pelo frio, quando armazenado a temperaturas inferiores a 7 °C, originando descoloração dos tecidos e depressões no pericarpo [104]. O corte das amostras aliado ao tempo de armazenamento pode ser a principal causa das grandes perdas e valores de DHAA verificados em ambos os cultivares. A partir do terceiro dia, o estado de conservação dos produtos foi piorando muito provavelmente devido ao corte dos pimentos que contribuiu para a deterioração dos tecidos. A ruptura das paredes celulares causada pelo corte ou fatiamento aumenta a actividade enzimática e o stress oxidativo, promovendo maiores perdas da vitamina C. Os cultivares estudados neste trabalho continham um conteúdo superior de L-AA que outros relatados na literatura: 109,4 – 115,5 mg/100 g [103]; 108,66 mg/100g produto [105]; 77,96 - 100,13 mg/100g produto [102] e 51,3 mg/100 g produto [106]. Já no caso do DHAA as concentrações obtidas neste estudo, em ambos os cultivares, são semelhantes às indicadas por Marín [106] (5,85% da vitamina C total) e Gökmen [35] (8% da vitamina C total). Martínez et al [105] relataram também que os pimentos verdes armazenados a 4°C durante 20 dias sofreram perdas de cerca de 11% do conteúdo de vitamina C. Estas perdas foram inferiores às verificadas no presente estudo pois os produtos eram mantidos inteiros durante o armazenamento. Além disso, a medição da vitamina C foi feita através de um método espectrofotométrico, que está sujeito a várias interferências e é pouco preciso.

4.2.1.4. Pimentos Vermelhos

Os pimentos vermelhos são conhecidos por serem uma excelente fonte de vitamina C, apresentando níveis superiores aos dos pimentos verdes, laranjas e morangos [3]. Os resultados obtidos da análise dos pimentos vermelhos regionais e importados encontram-se descritos, respectivamente, nas Figuras 22 e 23.

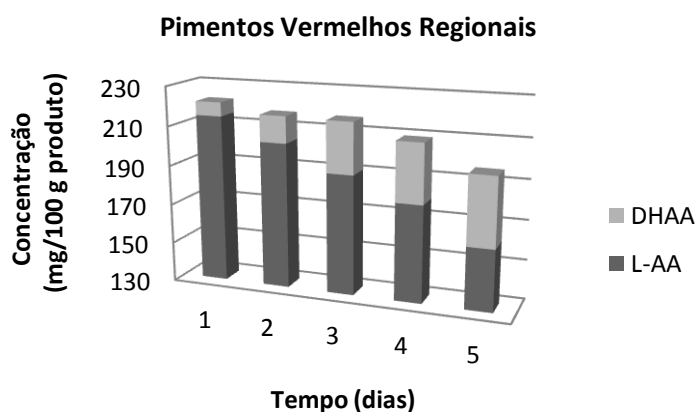


Figura 22 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras de pimentos vermelhos regionais, armazenadas à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.

Os conteúdos iniciais de L-AA, vitamina C total e DHAA dos pimentos vermelhos regionais foram bastante elevados (Figura 22). No primeiro dia de análise, as concentrações dos analitos eram as seguintes: $214,79 \pm 13,24$ mg L-AA/100g produto; $221,76 \pm 12,30$ mg vitamina C total/100 g produto e $6,97 \pm 1,76$ mg DHAA/100 g produto. O DHAA obtido correspondia a 3,14% da vitamina C total. O decréscimo do L-AA e vitamina C foi proporcional ao tempo de armazenamento, verificando-se perdas totais de 24,97% (4,99%/dia) e 11,57% (2,31%/dia), respectivamente, no final do estudo. Já o DHAA aumentou substancialmente, correspondendo a 17,82% da vitamina C total ($34,95 \pm 5,26$ mg/100g produto). Os valores médios obtidos durante o estudo foram $189,80 \pm 20,91$; $212,06 \pm 10,03$ e $22,26 \pm 11,65$ mg/100 g produto de L-AA, vitamina C total e DHAA, respectivamente. O conteúdo médio de DHAA correspondia a 10,70% da vitamina C total.

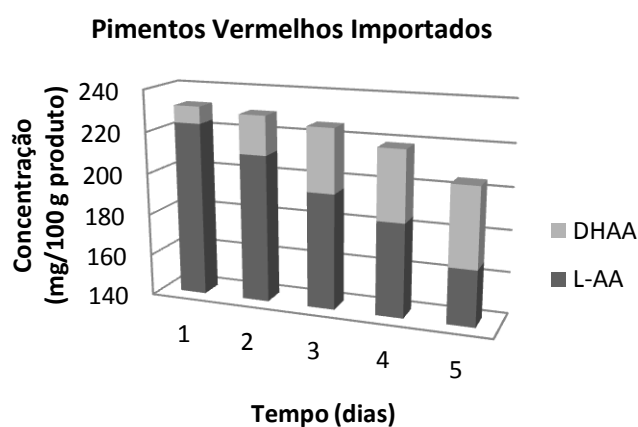


Figura 23 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nos pimentos vermelhos importados, armazenados à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.

Pela análise da Figura 23 podemos verificar que, tal como o cultivar regional, os pimentos importados são ricos em vitamina C, apresentando a concentração máxima deste nutriente às 24 horas: $223,65 \pm 16,51$ mg L-AA/100 g produto e $231,80 \pm 11,23$ mg vitamina C total /100 g. A concentração inicial de DHAA ($8,15 \pm 1,25$ mg/100g produto) correspondia a 3,52% da vitamina C total inicial. A degradação da vitamina C nos pimentos vermelhos seguiu o mesmo padrão que nos produtos anteriores. As perdas totais verificadas foram de 25,40% (5,08%/dia) para o L-AA e 11,60% (2,32%/dia) no caso da vitamina C total. Já o DHAA final correspondia a 18,57% da vitamina C total ($38,07 \pm 6,88$ mg/100 g produto). As concentrações médias verificadas no período do estudo para o L-AA, vitamina C total e DHAA foram, respectivamente, $196,31 \pm 22,11$; $222,13 \pm 10,85$ e $25,83 \pm 12,21$ mg/100 g produto (11,83% da vitamina C total).

Os valores obtidos neste cultivar foram sempre superiores aos verificados no cultivar regional, com a exceção do DHAA. As concentrações de L-AA e vitamina C total dos pimentos importados eram, em média, 3,32% e 4,75% superiores aos verificados nos pimentos regionais, respectivamente. Isto pode estar relacionado com as condições ambientais e de cultivo de cada um dos cultivares. As maiores perdas também se verificaram nos pimentos vermelhos importados, o que pode estar associado com o seu grau de amadurecimento visto que foram colhidos há mais tempo que os pimentos regionais. Com o amadurecimento dos frutos o pH das polpas decresceu (6,23 – 5,08), sendo as polpas regionais mais ácidas que as importadas. Tal como verificado nos pimentos verdes, a partir das 72 horas a deterioração dos vegetais era mais acentuada com alterações na firmeza e textura dos vegetais. A ruptura das células liberta enzimas que promovem a deterioração dos produtos, nomeadamente ascorbato oxidase, peroxidase e citocromo oxidase. Segundo Martínez [105] a refrigeração dos pimentos vermelhos durante 20 dias resultou em perdas de 15% no teor de vitamina C, sendo inferior às perdas verificadas neste trabalho. O corte dos pimentos vermelhos pode ser a causa das elevadas taxas de degradação da vitamina C e teores de DHAA encontrados.

Os dados disponíveis na literatura sobre o teor do ácido L-ascórbico nos pimentos vermelhos apresentam uma grande variação, sendo mais frequentemente descritos valores entre 100 - 200 mg/100 g pimentos. Os valores obtidos nos pimentos regionais e pimentos importados para o L-AA são muito superiores aos descritos por Fenoll [19] (129,21 mg/100 g), Zhang [103] (187,1 - 191,2 mg/100 g), Pérez-López [102] (120,65 – 148,85 mg/100 g) e Martínez [105] (159,63 mg/100g produto). Apesar disso, as concentrações relatadas no presente estudo encontram-se dentro dos limites da Tabela 3 (128 - 240 mg/100g). Já no caso do DHAA as concentrações obtidas neste estudo, em ambos os cultivares, são metade das verificadas por Fenoll [19](43% da vitamina C total).

4.2.1.5. Anonas

A anona (*Annona cherimola mill*) é um fruto cultivado em diferentes áreas tropicais em todo o mundo, principalmente no Peru e Equador. Esta fruta é conhecida sua polpa cremosa, muito doce e de sabor agradável, sendo utilizada na produção de bebidas e sobremesas [107, 108]. É uma fruta rica em cálcio, fósforo, açúcares, e fitoquímicos benéficos para a saúde como aminoácidos e polifenóis [108, 109]. Tem também aplicações na medicina tradicional, principalmente no tratamento de úlceras digestivas [107]. A anona é um fruto com um período de validade muito curto, pois amadurece rapidamente (3 - 6 dias mantidos a 18 °C – 20 °C)

devido às altas taxas de respiração e produção de etileno. É um fruto que sofre facilmente escurecimento enzimático, devido à presença da enzima polifenoloxidase (PPO, E.C. 1.14.18.1) que provoca a oxidação dos fenóis originando melanoidinas (pigmentos escuros). Além disso, o seu armazenamento a baixas temperaturas por longos períodos é impossível, pois são frutos sensíveis ao frio. A temperatura mínima de armazenamento da anona varia entre 7 – 12 °C. A aplicação de temperaturas mais baixas provoca alterações na cor, textura e sabor do fruto resultando na diminuição do valor nutricional e modificação das propriedades organolépticas e sensoriais [109]. Como tal, a anona foi mantida à temperatura ambiente durante o estudo. A Figura 24 mostra os resultados obtidos no estudo da variação da vitamina C ao longo de cinco dias consecutivos.

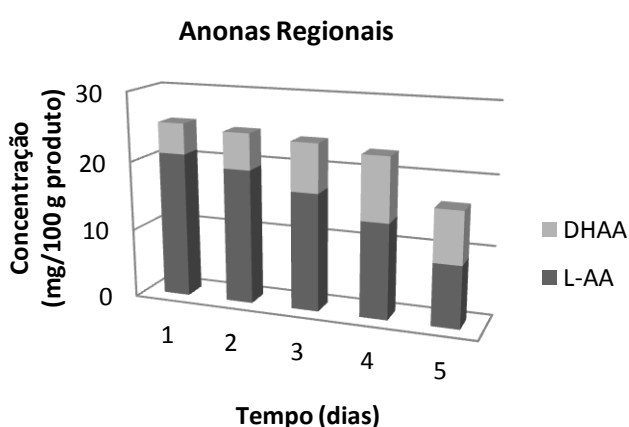


Figura 24 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras de anona, armazenadas à temperatura ambiente, durante 5 dias.

No início da análise, as concentrações obtidas foram $21,00 \pm 0,98$ mg L-AA/100 g produto, $25,43 \pm 2,34$ mg vitamina C total/100 g produto e $4,34 \pm 1,76$ mg DHAA/100 g produto (17,42 % da vitamina C total). As perdas totais de L-AA e vitamina C total foram elevadas estando relacionadas com o facto das anonas permanecerem à temperatura ambiente. Estudos relataram que as perdas da vitamina C ocorrem ao longo do amadurecimento deste fruto [109]. Além disso, o corte dos frutos e a sua fácil predisposição para o escurecimento enzimático favoreceram o seu amadurecimento e deterioração. Estas condições são muito propícias também para a degradação da vitamina C resultando em perdas de 57,43% (11,49%/dia) do L-AA e 35,31% (7,06%/dia) para a vitamina C total, no final do estudo. Os valores de DHAA obtidos na última análise também foram elevados, correspondendo a 45,65% da vitamina C total ($7,51 \pm 1,07$ mg/100g produto). Os teores médios encontrados para o L-AA, vitamina C total e DHAA foram, respectivamente, $16,01 \pm 4,82$; $22,69 \pm 3,61$ e $6,67 \pm 1,89$ mg/100 g produto (29,40% da vitamina C total). A concentração de L-AA obtida no primeiro dia foi quase o dobro da concentração relatada na Tabela 3 (10 – 13

mg/100 g produto). Os valores médios verificados neste estudo são superiores aos relatados na literatura que variam entre 4 – 6 mg/100 g produto [26] e 4 - 17 mg/100g produto [109]. Recentemente, Amoo et al [110] indicaram no seu estudo anonas com 42,38 mg vitamina C/ 100 g produto. Este valor é praticamente o dobro do verificado neste trabalho. Não foram encontrados trabalhos que tenham em conta o conteúdo do DHAA em anonas.

4.2.1.6. Morangos

O morango (*Fragaria x ananassa*) é dos frutos com maior interesse e consumo a nível mundial. Além da cor atraente e sabor agradável, é também uma boa fonte de vitamina C, flavonóides e antocianinas. Além disso, apresenta uma actividade antioxidante bastante elevada [13]. A variação da vitamina C ao longo de 5 dias de armazenamento (4 °C) foi estudada em morangos regionais e importados. Os resultados do estudo encontram-se descritos nas Figuras 25 e 26.

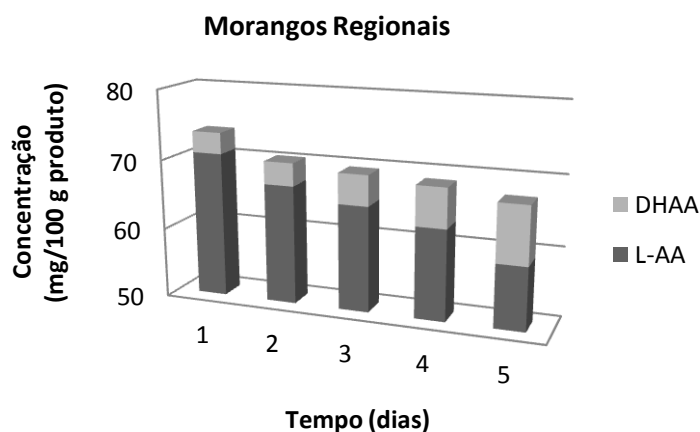


Figura 25 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras de morango regional, armazenadas à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.

Pela análise da Figura 25, as concentrações máximas de L-AA ($70,80 \pm 1,7$ mg/100 g produto) e vitamina C total ($73,84 \pm 1,8$ mg/100 g produto) foram obtidas no primeiro dia de análise. No mesmo dia, a concentração de DHAA ($3,04 \pm 1,7$ mg/100 g produto) correspondia a 4,12% da vitamina C total. Tal como verificados nos outros produtos, as concentrações de L-AA e vitamina C decresceram e o DHAA aumentou com o tempo de armazenamento. As perdas verificadas nos morangos regionais após 5 dias de conservação foram 16,61% para o L-AA (3,32%/dia) e 8,80% para a vitamina C total (1,76%/dia). A concentração de DHAA final foi de $8,3 \pm 0,9$ mg/100 g produto (12,33% da vitamina C total). Os valores de concentração médios obtidos ao longo deste estudo foram $65,0 \pm 4,39$; $69,94 \pm 2,44$ e $4,94 \pm 2,15$ mg/100 g produto

para o L-AA, vitamina C total e DHAA, respectivamente. O DHAA correspondia em média a 7,15% da vitamina C total. Estas concentrações estão de acordo com os valores apresentados na Tabela 3, que variam de 44 - 109 mg L-AA/100 g morangos. Os teores encontrados são inferiores aos descritos por Franke [41] (80,1 mg L-AA/100g) e superiores aos relatados por outros autores: 30,74 – 42,45 mg L-AA/100 g produto e 55,07 – 64,65 mg vitamina C total/100 g [111]; 52,7 - 57,2 mg L-AA/100g e 59,1 – 63,4 mg vitamina C total/100 g [13]; 53,9 mg L-AA/100 g [112]. Os valores obtidos no presente estudo são até duas vezes superiores aos encontrados por Gökmen [35] (29,0 mg L-AA/100 g). Os níveis de DHAA são semelhantes aos indicados por Odriozola-Serrano [13] (3,7% - 16,25% da vitamina C total) e ligeiramente inferiores aos encontrados por Gökmen [35] (18,6% da vitamina C total). No estudo realizado por Cardoso [111], o DHAA constituía entre 34 - 44% da vitamina C total encontrada nos morangos. Vasco et al [26] relataram valores muito semelhantes aos obtidos nos morangos regionais (50 – 66 mg L-AA/100 g produto).

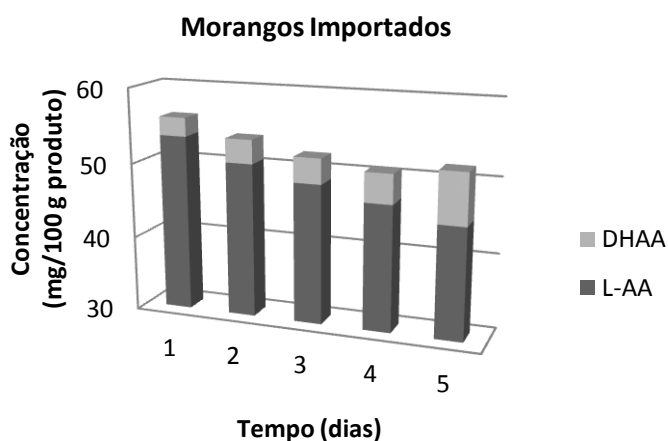


Figura 26 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas amostras de morango importado, armazenadas à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.

Os morangos importados apresentaram inicialmente as seguintes concentrações: $53,54 \pm 1,53$ mg L-AA/100 g produto, $56,02 \pm 1,59$ mg vitamina C total/ 100 g produto e 2,48 mg DHAA/ 100 g produto (Figura 26). Os teores de L-AA e vitamina C total encontrados inicialmente nos morangos importados são inferiores aos teores dos morangos regionais. Já no caso do DHAA verifica-se o contrário, o valor inicial corresponde a 4,43% da vitamina C total. Ao longo do estudo a degradação da vitamina C foi aumentando. As perdas totais verificadas foram de 16,15% (3,23%/dia) para o L-AA e 7,69% (1,54%/ dia) no caso da vitamina C total. Já o DHAA final correspondia a 13,19% da vitamina C total ($6,82 \pm 1,42$ mg/100 g produto). As concentrações médias verificadas no período do estudo para o L-AA, vitamina C total e DHAA foram, respectivamente, $48,88 \pm 3,34$; $52,84 \pm 2,07$ e $3,96 \pm 1,68$ mg/100 g produto (7,56% da

vitamina C total). Os conteúdos obtidos neste cultivar foram sempre inferiores aos verificados no cultivar regional, com a exceção do DHAA. Os teores de L-AA dos morangos regionais foram, em média, 24,8% superiores aos verificados nos morangos importados. Isto pode estar relacionado com o facto de estes morangos terem sido colhidos mais cedo que os morangos regionais e também com as diferenças de cultivo e ambientais. Os morangos regionais foram colhidos mais maduros e tiveram mais tempo para se desenvolver e produzir vitamina C na planta. Nos morangos, o conteúdo de L-AA atinge um nível máximo quando o fruto está completamente maduro. Depois o seu teor começa a diminuir, em simultâneo com a deterioração dos tecidos [8]. Os teores de DHAA obtidos resultam provavelmente de um maior período de armazenamento e condições de manuseamento pós-colheita uma vez que os morangos são produtos bastante susceptíveis à degradação [3]. Além disso, as perdas verificadas foram superiores no caso dos morangos regionais, que apresentavam um pH mais elevado.

Os teores dos analitos de interesse, encontrados nos morangos importados, foram inferiores aos relatados por Franke [41] e Odriozola-Serrano [13], com exceção do DHAA, e muito superiores aos descritos por Gökmen [35]. Já Leong et al [112] indicaram valores muito semelhantes ao dos morangos importados. Cardoso et al [111] relataram nos morangos estudados conteúdos de DHAA muito superiores aos encontrados nos dois cultivares. Os valores de L-AA obtidos nos morangos importados estão dentro da faixa obtida por Odriozola-Serrano [113] (50,1 – 54,6 mg/100g produto). Este autor desenvolveu um estudo para avaliar a retenção da vitamina C em morangos armazenados em atmosferas modificadas (4 °C) durante 21 dias. Após 5 dias de análise, as perdas resultantes foram superiores às verificadas no presente estudo, principalmente nos morangos conservados em atmosferas ricas em oxigénio. Isto revela o papel do oxigénio na oxidação do ácido L-ascórbico. Além disso, os morangos eram cortados antes do armazenamento, o que promoveu ainda mais a degradação da vitamina C devido à maior exposição ao oxigénio.

4.2.1.7. Papaias

A papaia (*Carica papaya L.*) é um fruto tropical que apresenta elevados níveis de vitamina C e A e carotenóides, como o β -caroteno e licopeno. Estes compostos são os responsáveis pelo poder antioxidante das papaias. A sua polpa laranja, doce e sumarenta pode ser consumida *in natura*, em saladas ou sumos [24]. As Figuras 27 e 28 descrevem os

resultados obtidos no estudo da estabilidade da vitamina C na papaia regional e importada armazenada durante 5 dias à temperatura de 4 °C.

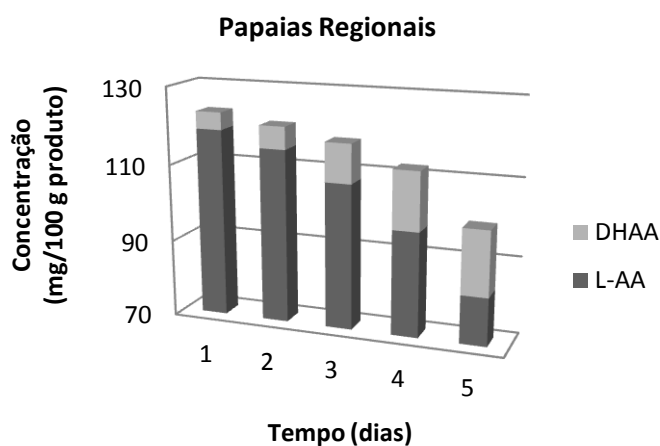


Figura 27 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas papias regionais, armazenadas à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.

O conteúdo de vitamina C apresentado pelas papias regionais foi elevado. O extracto correspondente às 24 horas continha $118,86 \pm 13,47$ mg L-AA/100 g produto, $123,35 \pm 10,52$ mg vitamina C total/ 100g produto e $4,49 \pm 1,43$ mg DHAA/ 100g produto (3,64% da vitamina C total). Pela observação da Figura 27 é possível notar o decréscimo do L-AA e vitamina C ao longo do tempo. A redução destes analitos foi mais acentuada a partir do terceiro dia de análise, pois o estado de conservação das amostras foi piorando. No final das análises as amostras encontravam-se bastante deterioradas provavelmente devido ao corte dos frutos. Isto resultou em perdas totais de 30,63% (6,13%/dia) para o L-AA e 19,46% (3,89%/dia) para a vitamina C total. No final da análise a concentração de DHAA ($16,89 \pm 4,12$ mg/100 g produto) correspondia a 17% da vitamina C total. Isto está em concordância com o facto que a quantidade de DHAA nos produtos aumenta com o período de armazenamento e o corte dos produtos promove a oxidação adicional do L-AA. Os valores médios obtidos para a L-AA, vitamina C total e DHAA foram, respectivamente, $104,19 \pm 14,71$ mg/100g produto; $114,69 \pm 9,53$ mg/100 g produto e $10,50 \pm 5,49$ mg/100 g produto (9,51% da vitamina C total).

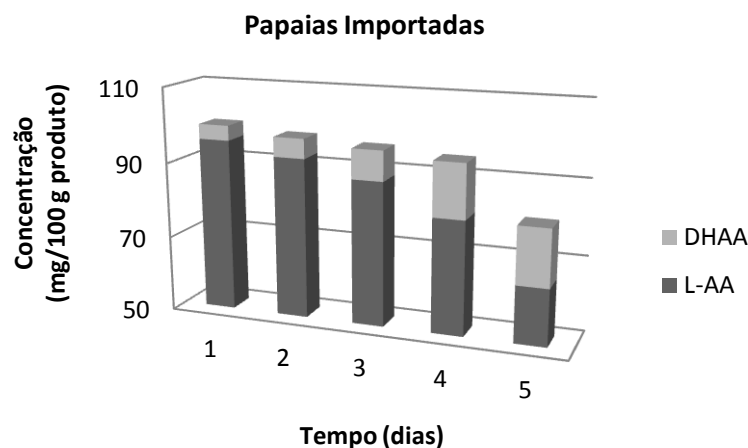


Figura 28 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nas papaías importadas, armazenadas à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.

Pela análise da Figura 28, os teores de L-AA, vitamina C total e DHAA obtidos nas papaías importadas (dia 1) são os seguintes: 95,87 ± 5,45 mg/100g produto; 99,82 ± 7,00 mg/100g produto e 3,95 ± 1,43 mg/100g produto (3,96% da vitamina C total). O padrão de degradação da vitamina C foi semelhante ao verificado nas papaías regionais, no entanto, as perdas totais resultantes foram maiores no caso do L-AA (32,07%) e vitamina C total (19,52%). Isto traduziu-se em perdas médias diárias de 6,41% para o L-AA e 3,90% para a vitamina C total. O conteúdo final de DHAA (15,21 ± 2,90 mg/100 g produto) correspondia a 18,93% da vitamina C total. As concentrações médias obtidas para as papaías importadas neste estudo foram 84,42 ± 12,27 mg L-AA/100g produto; 93,77 ± 7,75 mg vitamina C total/100 g produto e 9,35 ± 5,19 mg DHAA/100 g produto (10,35 % da vitamina C total).

Tendo em conta os resultados, as papaías regionais contêm maior quantidade de L-AA e vitamina C total que as papaías importadas. No caso do DHAA acontece o inverso, verificando-se que tanto o conteúdo inicial como final deste analito é superior nas papaías importadas. As variações encontradas podem ser explicadas pelo tipo de solo, condições ambientais e estado de amadurecimento dos frutos. Tanto no cultivar regional como no cultivar importado é notável o decréscimo da vitamina C e aumento do DHAA após o terceiro dia de armazenamento (Figuras 27 e 28), resultante da deterioração provocada pelo corte das amostras. Observou-se que as papaías sofreram mudanças na firmeza, o que está relacionado com a actividade de duas enzimas: poligalacturonase e pectilmetileterase e com o aumento da respiração e da produção de etileno [114]. Os resultados obtidos para o L-AA e vitamina C total nos dois cultivares coincidem com os valores obtidos por Hernández [38] (80 -151 mg L-AA/100 g produto e 86 – 154 mg vitamina C total/100 g produto). Os níveis de DHAA indicados por este autor (3,45 – 7,77% da vitamina C total) são semelhantes aos encontrados no

presente estudo. Oliveira et al [115] relataram valores inferiores para o L-AA (79,1 mg/100 g produto), vitamina C total (80,2 mg/100 g produto) e DHAA (1,6% da vitamina C total). Os valores descritos no presente estudo para o L-AA foram superiores aos documentados por outros autores: 62,7 - 80,7 mg/100 g produto [41] e 25,1 – 58,6 mg/100 g produto [116]. Os valores reportados por Wall [24] (45,3 – 55,6 mg/100 g) e Valente [73] (64,2 – 77,1 mg/100g produto) são também inferiores aos resultados encontrados no presente estudo. Estes últimos trabalhos não tiveram em conta a análise do DHAA.

4.2.1.8. Limões

O Limão (*Citrus limon (L.) Burm. f*) é a terceira espécie de citrinos com maior produção a nível mundial, após a laranja e tangerina [117]. O limão é uma fonte rica em nutrientes e fitoquímicos, nomeadamente, vitamina C, minerais, fibras alimentares, flavonóides, óleos essenciais e carotenóides. Os benefícios do limão na saúde humana estão relacionados com a presença natural de compostos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-virais, entre outras [117, 118]. As Figuras 29 e 30 demonstram a variação dos teores de vitamina C total encontrados nestes frutos ao longo dos 5 dias do estudo.

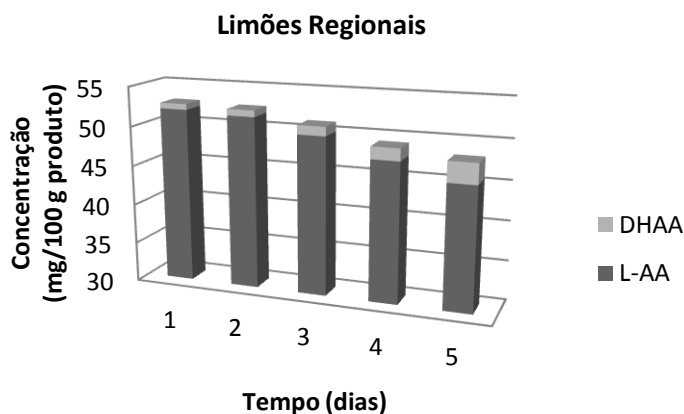


Figura 29 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nos limões regionais, armazenados à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.

Os limões regionais apresentaram um bom conteúdo de vitamina C (Figura 29). Inicialmente os valores de L-AA, vitamina C total e DHAA obtidos foram, respectivamente, $52,07 \pm 2,39$; $52,77 \pm 2,11$ e $0,7 \pm 0,16$ mg/100g produto (1,33% da vitamina C total). O decréscimo do L-AA (12,46%) e vitamina C (8,74%) verificado ao longo dos cinco dias não foi muito significativo. As perdas médias diárias foram 2,49% e 1,75% para o L-AA e vitamina C total. Os níveis de DHAA obtidos no último dia, correspondiam apenas 5,36% da vitamina C

total ($2,58 \pm 0,86$ mg/100 g produto). Os valores médios obtidos nos limões regionais para os analitos de interesse foram: $49,38 \pm 2,76$ mg L-AA/100 g produto; $50,74 \pm 2,03$ mg vitamina C total/100g produto e $1,35 \pm 0,76$ mg/100 g produto (DHAA). O conteúdo médio de DHAA correspondia a 2,71% da vitamina C total.

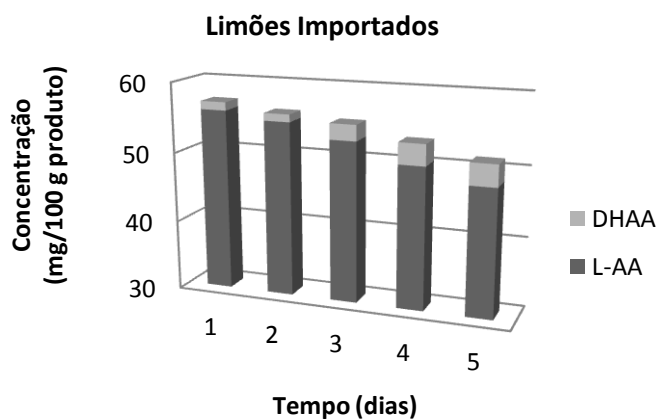


Figura 30 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nos limões importados, armazenados à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.

Pela análise da Figura 30, os limões importados também constituem uma boa fonte de vitamina C. No primeiro dia de análise obteve-se as seguintes concentrações: $55,97 \pm 2,22$ mg L-AA /100 g produto, $57,14 \pm 3,55$ mg vitamina C total/100g produto e $1,17 \pm 0,88$ mg DHAA/100g. O ácido desidroascórbico inicial correspondia a 2,05% do conteúdo de vitamina C total. Após 5 dias de armazenamento, o decréscimo dos níveis de vitamina C nos limões importados também foi baixo: 13,90% para o L-AA (2,78%/dia) e 10,22% para a vitamina C total (2,04%/dia). No final do estudo, obteve-se $3,11 \pm 1,45$ mg/100 g produto de DHAA, o que correspondia a 6,06 % da vitamina C total. Os teores médios obtidos para o L-AA, vitamina C total e DHAA obtidos no estudo foram, respectivamente, $52,45 \pm 3,23$; $54,58 \pm 2,32$ e $2,13 \pm 0,97$ mg/100 g produto (3,90% da vitamina C total). As variações verificadas entre o cultivar regional e importado não foram significativas.

Os limões importados tinham em média 5,85% mais L-AA e 7,04% mais vitamina C total que os limões regionais. As maiores perdas verificaram-se nos limões importados e os conteúdos de DHAA foram também sempre superiores neste cultivar. Os limões importados encontravam-se visivelmente mais maduros que os regionais e sabe-se que, nos citrinos o conteúdo de vitamina C total tende a aumentar com o amadurecimento dos frutos [8]. Os resultados obtidos podem ser justificados pelo estado de amadurecimentos dos limões importados e também pelos seus valores mais altos de pH (2,41). Os baixos níveis de DHAA

encontrados nos dois cultivares podem estar relacionados com a acidez natural dos frutos (2,37 – 2,41), que é eficaz na estabilização do L-AA.

Os teores encontrados nos limões (regionais e importados) estavam dentro dos limites documentados na Tabela 3, que variam entre 35 – 62 mg/100 g amostra. Em ambos os casos, as concentrações médias obtidas neste estudo foram quase o dobro das relatadas por González-Molina [118] (17,06 – 31,17 mg L-AA/100 g e 19,53 – 34,96 mg vitamina C/100g produto) e também superiores às descritas por Fenoll [19] (36,9 - 49,3 mg L-AA/100 g produto). Leong [112] (49,6 mg/100 g produto) e Gökmen [35] (53,8 mg/100 g produto) relataram conteúdos de L-AA muito semelhantes aos obtidos neste estudo. Quanto aos teores de DHAA, os valores obtidos inicialmente, em ambos os cultivares, foram bastante semelhantes aos descritos por Fenoll [19] (2% da vitamina C total). No final da análise as concentrações de DHAA aproximaram-se dos resultados obtidos por González-Molina [118] (6,5 – 10,8% da vitamina C total).

4.2.1.9. Brócolos

Os brócolos são dos vegetais verdes mais populares e consumidos a nível mundial. Como outras espécies da família *Brassicaceae*, os brócolos são ricos em fitoquímicos como vitaminas (C e E), quercetina, flavonóides, carotenóides, luteína, entre outros, que são benéficos para a saúde humana [28]. A estabilidade da vitamina C foi estudada nos brócolos regionais e importados refrigerados, e os resultados encontram-se descritos nas Figuras 31 e 32.

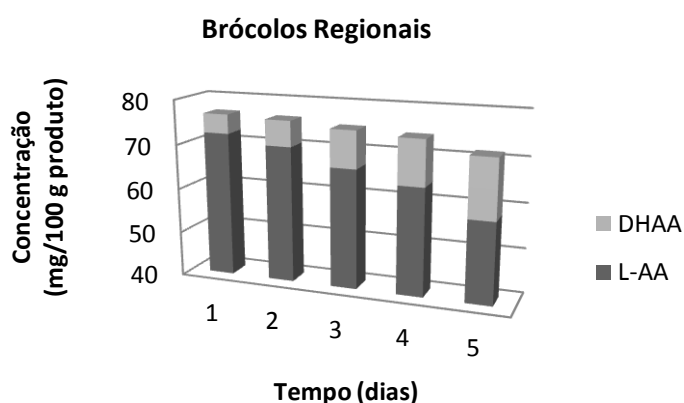


Figura 31 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nos brócolos regionais, armazenados à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.

Os conteúdos iniciais (dia 1) de L-AA ($72,38 \pm 9,68$ mg/100 g produto) e vitamina C total ($76,37 \pm 10,38$ mg/100g produto) dos brócolos regionais revelaram que estes são uma boa fonte de vitamina C (Figura 31). A concentração inicial de DHAA foi $3,99 \pm 0,96$ mg/100 g produto, que correspondia a 5,22% da vitamina C total. A degradação do L-AA e vitamina C foi aumentando com o período de armazenamento, resultando em perdas totais de 19,63% (3,93%/dia) e 6,82% (1,36%/dia), respectivamente. A concentração de DHAA foi inversamente proporcional à degradação do L-AA e vitamina C. No final do estudo, o teor de DHAA ($12,99 \pm 3,53$ mg/100g produto) correspondia a 18,25% da concentração da vitamina C total. As concentrações médias obtidas nos brócolos regionais foram: $66,33 \pm 5,60$ mg L-AA/100 g produto; $74,57 \pm 2,10$ mg vitamina C total/100 g produto e $8,24 \pm 3,56$ mg DHAA/100 g produto. O DHAA representou em média cerca de 11,16% da vitamina C total encontrada nos brócolos regionais.

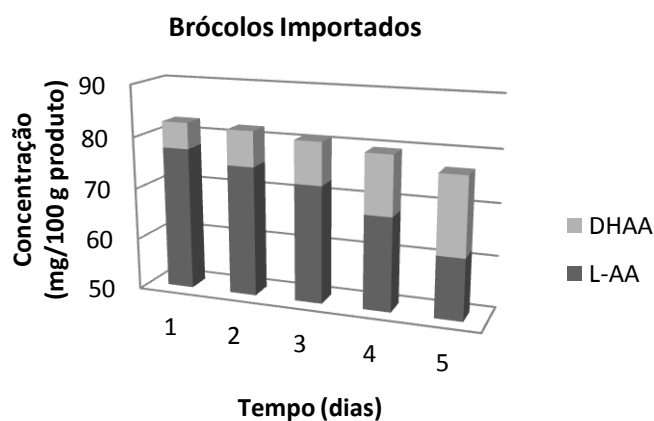


Figura 32 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) brócolos importados, armazenados à temperatura de 4 °C, durante 5 dias.

No primeiro dia de análise (Figura 32) os brócolos importados tinham também teores elevados de L-AA ($77,61 \pm 5,07$ mg/100 g produto) e vitamina C total ($82,40 \pm 4,53$ mg/100 g produto). A concentração de DHAA obtida inicialmente foi $4,79 \pm 1,64$ mg/100 g produto (5,81% da vitamina C total). A degradação do L-AA (20,29%) e vitamina C total (7,16%) ao longo do estudo foram significativas. Isto resultou em perdas diárias de 4,06% e 1,43% para o L-AA e vitamina C total, respectivamente. A concentração final de DHAA correspondia a 19,14% da vitamina C total ($14,64 \pm 2,20$ mg/100 g produto). Os teores médios obtidos neste estudo para o L-AA, vitamina C total e DHAA foram, respectivamente, $71,08 \pm 6,24$ mg/100 g produto; $80,22 \pm 2,34$ mg/100 g produto e $9,15 \pm 3,93$ mg/100 g produto (11,52% da vitamina C total). Os brócolos importados apresentaram valores de vitamina C superiores aos dos brócolos

regionais. Em média, os conteúdos de L-AA, vitamina C total e DHAA eram 6,67%; 7,11% e 10,46% maiores que os verificados no cultivar regional.

As concentrações de L-AA documentadas por Zhang [25] (103 – 124 mg/100 g produto) e Vallejo [119] (43 – 146 mg/100g produto) foram superiores às obtidas no presente estudo. Por outro lado, os níveis de vitamina C obtidos nos dois cultivares estão dentro dos valores relatados por Singh [120] (25,5 – 82,3 mg/100 g produto). Koh et al [28], observaram grandes variações nos conteúdos de L-AA (13,37 – 110,30 mg/100 g produto) e vitamina C total (57,25 – 131,35 mg/100 g produto) nas amostras de brócolos estudadas. Os resultados obtidos por este autor indicam que aproximadamente 33 - 62% da vitamina C presente nos brócolos encontra-se na forma DHAA. Estes valores foram superiores aos obtidos no nosso estudo (5,2 – 19,8%). Segundo Podsedek [121], a contribuição do DHAA para o conteúdo vitamina C total nos brócolos varia entre 8 – 11,3%. Apesar do L-AA ser a forma predominante da vitamina C nos brócolos, o rácio DHAA/vitamina C total tende a aumentar com o período de armazenamento. Os elevados valores de DHAA sugerem que o L-AA é espontaneamente convertido a DHAA nos brócolos. Isto sugere que a taxa de oxidação do L-AA é mais rápida que a redução do DHAA provavelmente devido à diminuição da actividade do ciclo ascorbato-glutationa durante o armazenamento dos brócolos. Além disso, tal como o agrião os brócolos são ricos em ferro e têm uma elevada actividade enzimática que promove a degradação do L-AA.

As variações relatadas por Franke [41] foram menores (41,2 – 63,8 mg/100 g produto) que no caso anterior. Estas diferenças estão provavelmente relacionadas com a época de colheita, métodos de cultivo e manutenção pós-colheita.

Relativamente à degradação da vitamina C, os valores obtidos foram superiores aos descritos na literatura. Galgano et al [122] encontraram perdas de 18% no conteúdo de vitamina C nos brócolos após 7 dias de armazenamento (6 °C). Já Hussein et al [123] relataram perdas de 8% em amostras frescas de brócolos conservadas a 4 °C durante 8 dias. Segundo Vallejo [124], o conteúdo de vitamina C em brócolos embalados reduziu cerca de 2% após 7 dias de armazenamento a 1 °C. Apesar das discrepâncias entre os resultados referidos, estes dados estão em concordância com o facto da diminuição da temperatura e do tempo de conservação resultarem em perdas menores de vitamina C nos alimentos.

Os processos de cozimento dos vegetais afectam os seus níveis de antioxidantes, nomeadamente a vitamina C. Os brócolos são normalmente cozidos pelo sistema convencional ou no microondas antes de serem consumidos. As perdas de L-AA são mínimas quando os

vegetais são cozidos sem água (por exemplo a vapor ou microondas), enquanto as perdas máximas são associados com a cozedura pelo sistema convencional [33, 125]. O efeito da cozedura dos brócolos regionais sobre a retenção da vitamina C foi também avaliado neste estudo. Os resultados encontram-se descritos na figura e tabela seguintes.

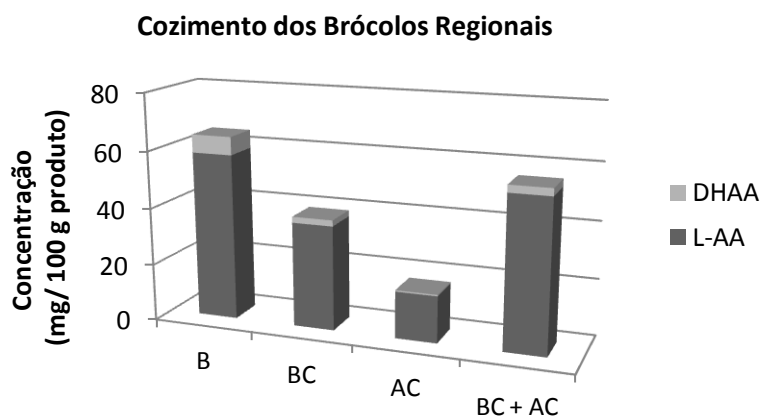


Figura 33 - Degradação da vitamina C total (L-AA + DHAA) nos brócolos regionais após cozedura. B: Brócolos crus; BC: Brócolos Cozidos; AC: Água da Cozedura.

Tabela 17 - Efeito do cozimento dos brócolos sobre a vitamina C total durante 5 minutos. TC: tempo de cozedura.

TC (minutos)	Brócolos ^a		Água da cozedura ^a	Brócolos cozidos + Água da cozedura ^a
	0	5	5	5
L-AA	58,4 ± 2,9	36,74 ± 4,4	16,4 ± 5,5	53,17 ± 4,2
vitamina C total	64,7 ± 3,5	38,85 ± 6,4	16,9 ± 5,7	53,67 ± 4,8
DHAA	6,3 ± 2,1	2,1 ± 1,4	0,5 ± 0,2	2,6 ± 1,5

^aos dados são a media de 3 triplicatas ($n = 3$) ± desvio-padrão

Pela análise da Figura 33 e Tabela 17, os brócolos crus continham $58,38 \pm 2,9$ mg L-AA/100 g produto e $64,70 \pm 3,5$ mg vitamina C total/ 100 g produto. O conteúdo de DHAA correspondia a 9,78% da vitamina C total. O cozimento dos brócolos, durante 5 minutos, resultou em perdas nos conteúdos de L-AA (37,07%), vitamina C total (39,95%) e DHAA (66,61%). O teor final de DHAA correspondia a 5,43% da vitamina C total. Vários autores demonstraram que o conteúdo de L-AA diminui drasticamente durante a cozedura, dependendo de factores como o método de cozedura, tipo de alimento, temperatura, oxigénio, pH, quantidade de água e tempo de cozedura, e outros factores que facilitem a oxidação. É importante estudar a cinética da retenção da vitamina C em vários produtos

cozidos, uma vez que é difícil produzir um sistema modelo que inclua todos os vegetais [25, 125].

Os valores de vitamina C obtidos nos brócolos cozidos neste estudo estão de acordo com os descritos pela base de dados DTU: 37,0 mg L-AA/100g e 39,6 mg vitamina C total/100g [20]. O conteúdo de DHAA representava 6,57% da vitamina C total, sendo ligeiramente superior ao indicado no presente estudo (5,43% da vitamina C total). A redução verificada do conteúdo de L-AA foi inferior à obtida por Zhang [25]. Estes autores encontraram cerca de 103 mg L-AA/ 100g de brócolos e após 5 minutos de cozimento o valor encontrado reduziu-se para 35 mg/100 g (- 65,9%). Galgano et al [122] verificaram perdas de vitamina C entre 34 - 37%, em brócolos, após cozimento em água durante 15 minutos. Segundo Vallejo [124], o cozimento dos brócolos, durante 5 minutos, pelo sistema convencional resulta em perdas menores para o L-AA e vitamina C total (31,71% e 27,28%, respectivamente). Pelo contrário, os teores de DHAA aumentaram cerca de 14,3% após o cozimento. No caso de Franke et al [41] foram relatados valores de L-AA entre 18 - 21 mg/100 g nos brócolos cozidos e indicaram perdas de 63,24% do conteúdo de L-AA. As perdas verificadas são superiores às do presente estudo e podem estar relacionados com o tempo de confecção e quantidade de água utilizada.

Constatou-se que, as perdas de vitamina C nos brócolos, durante o processo de cozimento em água, foram devidas sobretudo à lixiviação e não por degradação térmica, conforme observado na Figura 33 e Tabela 17. A grande maioria da vitamina C perdida durante o cozimento encontrava-se dissolvida na água de cozedura (70,70% e 61,04% do conteúdo inicial de L-AA e vitamina C total, respectivamente), indicando que a solubilização é o factor que mais contribuí para as perdas da vitamina C no cozimento convencional. Dada a natureza hidrosolúvel da vitamina C as maiores perdas ocorrem sobretudo por lixiviação e não por causa da degradação térmica. Caso contrário, a quantidade L-AA e vitamina C total retidos na água seriam muito inferiores. Estes dados estão de acordo com o descrito pela literatura, pois sabe-se que um dos factores que mais influencia a perda de vitamina C durante a preparação dos alimentos é a lixiviação. Francisco et al [33] demonstraram que as maiores perdas da vitamina C ocorrem durante a manipulação dos alimentos, devido à elevada solubilidade e instabilidade deste nutriente.

No presente estudo, aproximadamente 29,3 % da vitamina C não estava presente nem no vegetal nem na água, tendo sofrido degradação. As maiores perdas verificaram-se no caso da vitamina C total (39,0%), pois o DHAA sofreu maior degradação durante o processo. A concentração de DHAA na água de cozedura ($0,46 \pm 0,22$ mg/100 g produto) correspondia apenas a 2,9% da vitamina C total. Isto pode estar relacionado com a temperatura e pH da

água de cozedura que promoveram a sua degradação a DKG e outros produtos. A presença de iões não contribuiu para a oxidação do L-AA pois a utilizou-se água destilada no estudo. No caso de Vallejo [124] verificou-se o contrário: apesar das perdas do L-AA e vitamina C total verificadas terem sido menores a maior parte da vitamina C sofreu degradação originando outros compostos, uma vez que a retenção destes analitos na água da cozedura era muito baixa (apenas 12% e 30,5% dos conteúdos iniciais de L-AA e vitamina C total, respectivamente). Isto pode estar relacionado com o facto de estes autores utilizarem água da torneira que contém iões que contribuem para a degradação da vitamina C. O DHAA presente na água de cozedura correspondia a 58,2% da vitamina C total.

4.2.2. Estudo da estabilidade do ácido L-ascórbico nos extractos

A vitamina C é conhecida pela sua grande instabilidade e existem muitos factores que influenciam negativamente esta propriedade. Muitos estudos têm sido realizados para encontrar as condições ideais para a estabilização do L-AA durante a sua análise. A temperatura é um factor chave para evitar a oxidação do L-AA e os estudos de estabilidade realizados com altas temperaturas confirmaram um elevado grau de degradação do L-AA [30]. A refrigeração das amostras durante a análise parece melhorar a estabilidade do L-AA [40]. Com o objectivo de estudar o papel da temperatura na estabilização da vitamina C, os extractos de maracujá (regional e importado) e agrião foram conservados a diferentes temperaturas durante o período de 2 meses. Foi também avaliada a degradação do ácido L-ascórbico no injector à temperatura ambiente. Estabeleceu-se uma comparação com uma solução padrão de ácido L-ascórbico (50 µg/mL) armazenada nas mesmas condições.

4.2.2.1. Estabilidade do ácido L-ascórbico no injector

A estabilidade dos extractos de maracujá (regional e importado) enquanto permaneciam no injector (temperatura ambiente) foi avaliada. A Figura 34 ilustra a degradação do ácido L-ascórbico durante o período de estudo (5 horas).

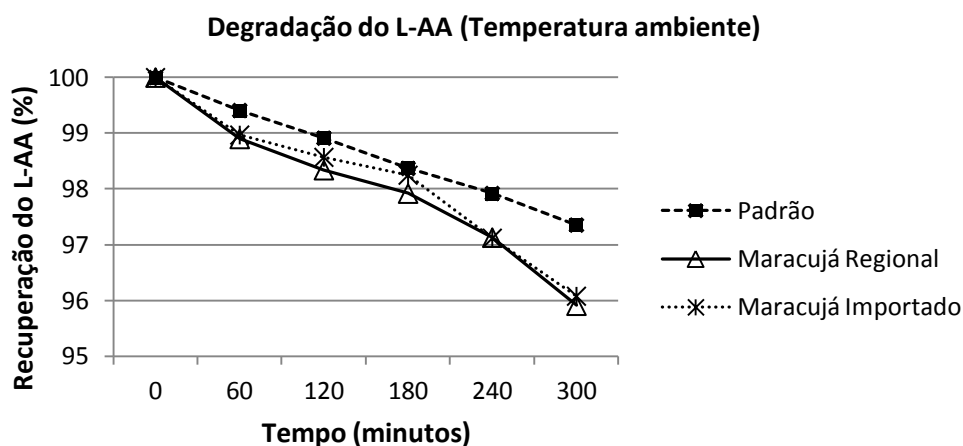


Figura 34 - Recuperação do ácido L-ascórbico em extractos de maracujá e solução padrão (50 $\mu\text{g/mL}$) à temperatura ambiente durante 5 horas.

Uma hora após o início do estudo a recuperação do L-AA nos extractos de maracujá regional e importado foi, respectivamente, 98,90% e 98,97% (Figura 34). No caso da solução padrão a recuperação foi superior (99,40%) que no caso dos extractos. O decréscimo foi aumentando com o passar do tempo, verificando-se perdas de 1,66% no extracto de maracujá regional, 1,43% no extracto de maracujá importado e 1,09% na solução padrão após 2 horas. No final (5 horas) as perdas totais foram superiores no caso do extracto de maracujá regional (4,09%), seguidas do extracto de maracujá importado (3,92%) e solução padrão (2,65%). As diferenças obtidas entre os extractos e a solução padrão podem estar relacionadas com a presença de outras substâncias que contribuam para a oxidação do ácido L-ascórbico. No caso dos extractos, as variações não foram significativas mas podem ser atribuídas às diferenças de pH, sendo este inferior no caso do extracto de maracujá importado. Tendo em conta os resultados, podemos afirmar que o armazenamento dos extractos à temperatura ambiente não é a melhor opção visto que mesmo sob condições ácidas (pH 2,13) e ao abrigo da luz as perdas ocorridas são significativas (mesmo após uma hora). Segundo Iwase [40], uma solução de L-AA é estável à temperatura ambiente durante uma hora. Este facto está em concordância com os resultados obtidos no presente estudo e como tal, os extractos nunca permanecem no injector por um período superior a meia hora.

4.2.2.2. Estabilidade do ácido L-ascórbico a 4 °C.

A degradação do L-AA a 4 °C foi estudada nos extractos de maracujá regional e importado e os resultados obtidos estão descritos na Figura 35.

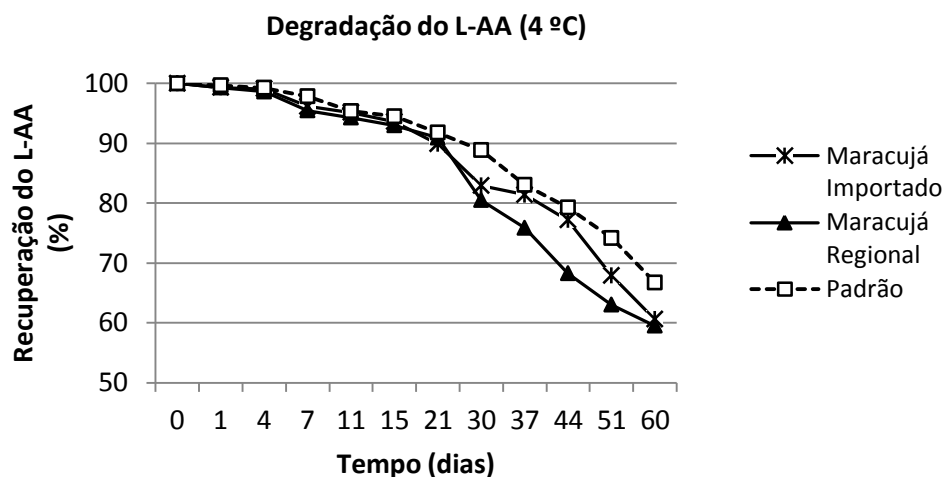


Figura 35 - Recuperação do ácido L-ascórbico em extractos de maracujá e solução padrão (50 µg/mL) armazenados a 4 °C durante 2 meses.

Após 7 dias de armazenamento, a recuperação do L-AA nos extractos de maracujá (regional e importado) e solução padrão foram, respectivamente, 4,53 %; 3,87% e 2,16% (Figura 35). Uma semana depois as perdas aumentaram para aproximadamente o dobro. Passado um mês as perdas foram ainda mais significativas, resultando em reduções de 19,50% (maracujá regional); 17,07% (maracujá importado) e 11,14% (solução padrão). Nota-se que a partir dos 30 dias de armazenamento o declive das rectas aumentou, significando que as perdas ocorridas a partir desta data foram ainda mais acentuadas. No final do teste de estabilidade, as perdas totais foram superiores no extracto de maracujá regional (40,49%), seguidas pelo extracto de maracujá importado (39,40%) e solução padrão (33,29%). Em todos os dias de análise observou-se que as perdas foram sempre superiores nos extractos do que na solução padrão. Sabe-se que o pH das amostras e outras características específicas da matriz afectam a estabilidade da vitamina C. A presença de outras substâncias da matriz como açúcares, proteínas e minerais podem ser responsáveis pelo facto das perdas maiores se verificarem nos extractos. Não foram encontradas diferenças significativas no decréscimo do L-AA entre os extractos do maracujá regional e importado. No entanto, pela observação do Gráfico 35 as perdas foram mais notáveis no caso do extracto de maracujá regional, após os 30 dias de armazenamento. Isto pode ser explicado pelo facto do extracto de maracujá importado ser ligeiramente mais ácido (pH 1,6) que o extracto de maracujá regional (pH 1,7). Tendo em conta os resultados obtidos, o armazenamento dos extractos à temperatura de refrigeração

(4 °C) não é adequado para longos períodos de tempo. Apesar do procedimento mais correcto ser a análise das amostras imediatamente a seguir à extracção, o armazenamento dos extractos a 4 °C pode ser utilizado para guardar as amostras por um período inferior ou igual a 24 horas. Segundo Hernández [38], Davey [3] e Kall [54], uma solução de extracção ácida (pH < 2) fornece uma boa estabilização do L-AA em extractos mantidos a 4 °C e protegidos da luz durante 24 horas. A acidificação do meio, o contacto mínimo com a luz e oxigénio contribuíram para que as perdas verificadas nos frutos fossem muito superiores às dos extractos, após o mesmo período de estudo.

4.2.2.3. Estabilidade do ácido L-ascórbico a -20 °C.

O armazenamento das soluções à temperatura de 4°C não mostrou ser muito eficaz na conservação do ácido L-ascórbico. Avaliou-se então o efeito da temperatura negativa (-20 °C) na estabilização desta molécula. Na Figura 36 estão representados as recuperações do L-AA obtidas ao longo dos dois meses. Após 7 dias de armazenamento a redução do teor de ácido L-ascórbico nos extractos regional e importado foram, respectivamente, 3,08% e 2,72%. No caso da solução padrão as perdas foram apenas de 1,80%. Duas semanas após o início do estudo as perdas aumentaram para 4,04% no caso do extracto de maracujá regional; 4,73% no extracto de maracujá importado e 3,58% na solução padrão. Pela análise da Figura 36, a partir do primeiro mês de armazenamento (30 dias) as diferenças entre os extractos e a solução padrão tornaram-se mais significativas. As reacções entre o L-AA e outros constituintes da matriz contribuem para a sua degradação que se tornou mais acentuada ao longo do tempo. No final do estudo (60 dias), as perdas totais foram superiores no extracto regional (21,21%) e importado (19,68%) seguido pela solução padrão (15,03%). Apesar das maiores perdas se verificarem nos extractos, o padrão do decréscimo do L-AA foi semelhante nas 3 soluções. Neste caso, a temperatura teve um papel mais importante na estabilização do L-AA que o pH das soluções. A conservação dos extractos e solução padrão a temperaturas negativas (-20°C) retardou as reacções de oxidação do L-AA resultando em recuperações maiores do que no caso anterior (Figura 35). Isto está de acordo com a literatura que afirma que a diminuição da temperatura reduz as perdas mas não é suficiente para impedir a degradação do L-AA [3, 8]. Este procedimento revelou ser um pouco mais eficaz que o armazenamento a 4 °C e pode ser utilizado para guardar amostras por um período inferior a uma semana.

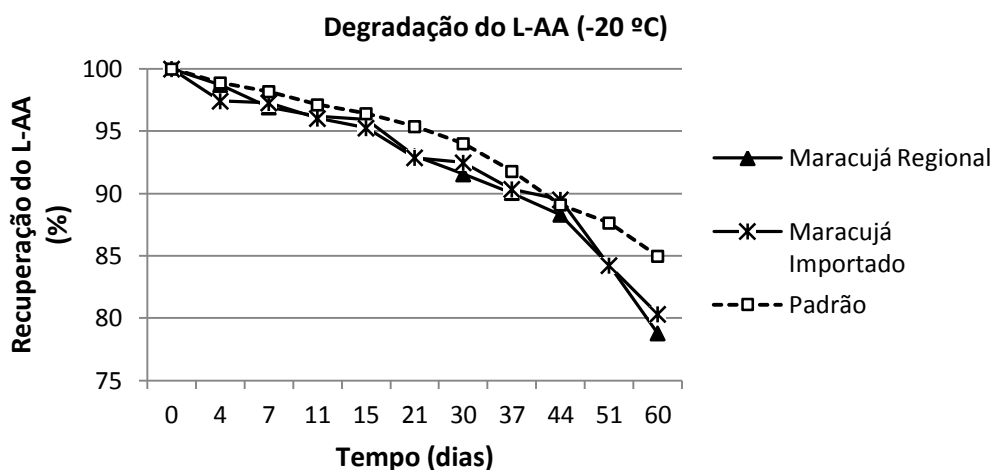


Figura 36 - Recuperação do ácido L-ascórbico em extractos de maracujá e solução padrão (50 µg/mL) armazenados a -20°C durante 2 meses.

4.2.2.4. Estabilidade do ácido L-ascórbico a -80 °C

Os extractos de agrião e todos os outros extractos preparados posteriormente, foram conservados à temperatura de -80 °C até ao momento da análise. Como tal, decidiu-se avaliar o comportamento do L-AA no extracto de agrião regional e solução padrão, durante 2 meses, armazenados nesta temperatura. Os resultados obtidos estão representados na Figura 37.

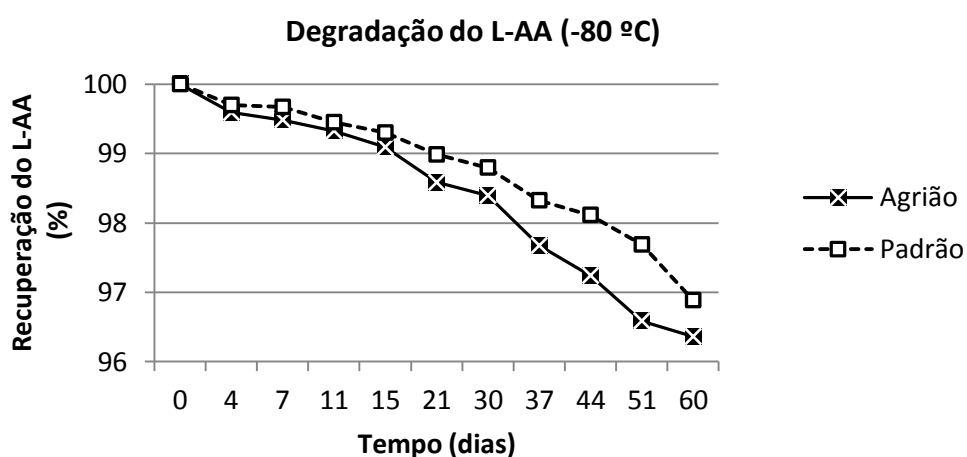


Figura 37 - Recuperação do ácido L-ascórbico em extractos de agrião regional e solução padrão (50 µg/mL) armazenados a -80°C durante 2 meses.

Uma semana após o início do estudo a degradação do L-AA no extracto e solução padrão era inferior a 0,6% em ambos os casos. Na segunda semana do estudo, a recuperação obtida para o extracto e solução padrão foi, respectivamente, 99,09% e 99,3% (Figura 37). Mesmo assim, ao fim do primeiro mês, a redução do L-AA no extracto (1,61%) e na solução padrão (1,20%) continuavam pouco significativas. As perdas eram mínimas até às 4 semanas, mas continuaram a aumentar com o tempo de armazenamento. No final da análise, a degradação do analito resultou em perdas totais de 3,64% no extracto e 3,11% na solução padrão. A degradação foi superior no caso do extracto devido à presença de outros componentes da amostra além do L-AA que contribuem para a oxidação desta molécula. O pH da solução de agrião (1,80) era também superior ao da solução padrão (1,60). Apesar disso, as diferenças verificadas entre o extracto de agrião e solução padrão não foram significativas e apresentaram um padrão de degradação semelhante. Os resultados obtidos indicam que o L-AA é bastante estável em extractos armazenados nestas condições, provavelmente devido à elevada acidez dos mesmos. A conservação ao escuro e sem contacto com o oxigénio também evitaram perdas adicionais. Tal como esperado, a conservação das amostras a -80 °C revelou ser o método de conservação mais eficaz, verificando-se perdas muito inferiores às encontradas nos outros casos (4 °C e -20 °C). Nesta temperatura (-80 °C) as reacções de oxidação do L-AA são retardadas, pois a temperatura influencia a actividade enzimática [3]. Tal como relatado por Hernández [38] este procedimento é capaz de estabilizar o L-AA em ambientes ácidos durante pelo menos um mês. Phillips et al [12] estudaram a degradação do L-AA em extractos conservados a -60°C sob atmosfera de azoto e obtiveram resultados semelhantes.

4.2.3. Discussão Geral

As frutas e legumes sofrem mudanças a partir do momento da colheita devido a reacções bioquímicas e fisiológicas. A temperatura é o factor extrínseco mais importante que influencia a preservação dos produtos hortofrutícolas colhidos. Em termos gerais, a diminuição da temperatura, melhora a retenção da vitamina C (influencia as reacções enzimáticas, respiração celular, entre outras), mas as perdas continuam a ocorrer. A retenção da vitamina C é frequentemente utilizada como uma estimativa para a retenção global de nutrientes dos alimentos, pois é dos nutrientes mais instáveis e altamente sensível à oxidação. A sua degradação começa imediatamente após a colheita e continua de forma constante durante o armazenamento prolongado, mesmo em produtos congelados [3, 8].

A dose diária recomendada (DDR) de vitamina C foi estabelecida de acordo com o Conselho de Alimentação e Nutrição do Instituto de Medicina [27]. Os valores indicados para homens e mulheres adultos saudáveis são 90 mg/dia e 75 mg/dia, respectivamente. A Tabela 18 apresenta os valores médios obtidos de vitamina C total nos produtos analisados e as respectivas contribuições para as necessidades diárias deste nutriente.

Tabela 18 - Conteúdo de vitamina C total nos 9 produtos hortofrutícolas analisados e a sua contribuição (%) para a DDR da vitamina C em homens e mulheres adultos saudáveis.

Produto	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Contribuição da vitamina C total (%) DDR	
		Homens	Mulheres
Frutos			
Anonas	22,7 ± 3,6	25,2%	30,3%
Limões Regionais	50,7 ± 2,0	56,3%	67,7%
Limões Importados	54,6 ± 2,3	60,6%	72,8%
Maracujás Regionais	28,0 ± 4,1	31,1%	37,3%
Maracujás Importados	26,0 ± 3,7	28,9%	34,7%
Morangos Regionais	69,9 ± 2,4	77,7%	93,3%
Morangos Importados	52,8 ± 2,1	58,7%	70,5%
Papaias Regionais	114,7 ± 9,5	127,4%	152,9%
Papaias Importadas	93,8 ± 7,8	104,2%	125,0%
Hortícolas			
Agriões	65,4 ± 1,8	72,7%	87,3%
Brócolos Regionais	74,6 ± 2,0	82,9%	99,5%
Brócolos Importados	80,3 ± 2,2	89,3%	107,1%
Pimentos Verdes Regionais	117,0 ± 6,1	130,0%	156,0%
Pimentos Verdes Importados	122,0 ± 6,5	135,6%	162,7%
Pimentos Vermelhos Regionais	212,1 ± 10,0	235,6%	282,8%
Pimentos Vermelhos Importados	221,5 ± 12,0	246,1%	294,7%

^amédia dos teores obtidos nos dias de análise ($n = 5$) ± desvio-padrão.

Pela análise da Tabela 18, os pimentos vermelhos são os produtos hortofrutícolas analisados com o teor mais elevado de vitamina C, seguidos pelos pimentos verdes e papaia. Estes alimentos apresentaram as concentrações mais elevadas de L-AA e vitamina C total, constituindo uma excelente fonte deste nutriente e fornecendo entre 294,7 – 104,2% da DDR deste nutriente. Tal como reportado na literatura científica, o conteúdo de vitamina C nos pimentos vermelhos foi superior ao dos pimentos verdes [8, 106]. Os brócolos, morangos, agrião e limões são também uma boa fonte de vitamina C, sendo classificados como alimentos

com teor médio de L-AA e vitamina C total. Estes produtos fornecem entre 58,7 – 107,1% da DDR da vitamina C. Já os maracujás e anona são frutos pobres neste nutriente, apresentando os níveis mais baixos de L-AA e vitamina C total encontrados neste estudo. Apenas contribuem entre 25,2 – 37,2% da DDR da vitamina C.

No caso das papaias, maracujás e anonas os valores obtidos no presente estudo são superiores aos relatados nas FCDB (Tabela 3). No geral, os resultados obtidos na determinação de vitamina C estão em concordância com aqueles relatados na literatura. Os dados nutricionais disponibilizados pelas FCDB geralmente são obtidos através de literatura científica publicada, resultados de análises laboratoriais e/ou baseados em cálculos utilizando métodos computacionais. Em algumas bases de dados existe uma significativa falta de informação sobre o teor de vitamina C total, especialmente no caso das frutas exóticas. As FCDB nunca estão completas e necessitam de uma constante actualização, devido às constantes melhorias dos métodos de análise dos alimentos e novos dados publicados. Além disso, nem todas têm em conta os teores de DHAA, expressando apenas o conteúdo de L-AA ou de vitamina C total.

O L-AA foi sempre a forma predominante da vitamina C, presente em quantidades muito maiores do que o DHAA. As concentrações do L-AA e vitamina C total foram superiores nos produtos regionais no caso dos maracujás, morangos e papaias. Já os pimentos (verdes e vermelhos), limões e brócolos importados apresentavam teores de L-AA e vitamina C mais elevados que os produtos de origem regional. O conteúdo de DHAA nos alimentos é geralmente baixo, representando menos de 10% do conteúdo de vitamina C total. O seu aumento está relacionado com condições adversas pós-colheita que promovem a degradação do L-AA. As proporções entre a quantidade de vitamina C total e DHAA podem variar muito com o tipo de vegetal, condições e tempo de armazenamento [8]. A oxidação do L-AA levou à diminuição do seu conteúdo nas frutas e vegetais durante o estudo. Já os teores de DHAA apresentaram uma tendência inversa, sendo mais significativo sobre os produtos importados. Além disso, os conteúdos de DHAA foram superiores nas frutas em relação aos vegetais. No final do estudo, esta molécula representava cerca de 10% da vitamina C total na maioria dos produtos, com excepção das anonas (29,4%) e maracujás importados (15,8%,) e regionais (13,3%). Estas frutas foram os produtos estudados com maior teor deste nutriente e os limões o mais baixo (2,7% e 3,9% para os regionais e importados, respectivamente).

A degradação da vitamina C nos produtos alimentares também foi avaliada. As espécies que registaram maiores perdas de L-AA diárias ao longo do estudo foram aquelas sujeitas a cortes, nomeadamente, anonas (11,5%/dia), papaias (6,3%/dia), pimentos verdes

(5,2%/dia) e pimentos vermelhos (5,1%/dia) (Figura 38). A conservação das anonas à temperatura ambiente e o facto de ser um fruto bastante susceptível ao escurecimento enzimático podem justificar os resultados obtidos. Nestes casos, nota-se uma acentuada oxidação e/ou degradação após o terceiro dia de armazenamento. A integridade dos tecidos é um dos factores mais importantes na preservação do L-AA. As frutas cortadas são geralmente mais perecíveis do que as frutas inteiras devido ao stress fisiológico causado pelos danos físicos ou fermentos. Segundo Odriozola-Serrano [113], o corte dos produtos induz uma série de distúrbios fisiológicos como o escurecimento dos tecidos, acelera a perda de água, aumenta as taxas de respiração e produção de etileno resultando em algumas alterações indesejadas como perdas a nível nutricional e a diminuição do prazo de validade dos produtos frescos. A ruptura da parede celular causada pelo corte ou fatiamento aumenta a actividade enzimática, resultando em perdas rápidas de ácido L-ascórbico. Isto foi observado com maior evidência nas papaias e pimentos verdes e vermelhos. Pela análise da Figura 38, nota-se também que os produtos importados registaram maiores perdas diárias do conteúdo de L-AA que os regionais (com excepção dos morangos). O facto de que os produtos locais foram colhidos por último do que os importados podem justificar o maior teor de vitamina C obtidos.

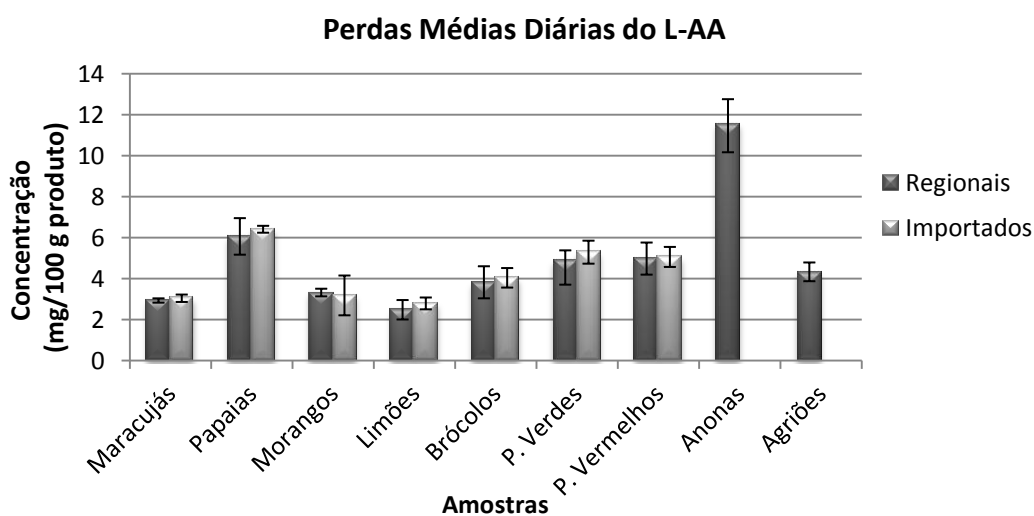


Figura 38 - Perdas médias diárias do L-AA nos frutos e vegetais ao longo do período de armazenamento (4 °C).

Os limões, apesar das operações de corte, foram os produtos com menor redução do L-AA (2,64%/dia). Isto pode estar relacionado com o facto do baixo pH estabilizar a vitamina C nos alimentos ácidos, como os citrinos [12]. Além disso a própria fisiologia do fruto contribuiu para os resultados obtidos. O sumo do limão encontra-se no interior de vesículas denominadas “faivos”, as quais protegem a vitamina C da oxidação. O mesmo já não acontece, por exemplo,

nos maracujás nos quais a polpa é exposta totalmente ao oxigénio após o corte do fruto. Os limões foram os produtos cuja polpa apresentava o valor de pH mais baixo, seguidos pelos maracujás e morangos. As frutas e hortaliças intactas também se deterioram após a colheita devido a alterações fisiológicas e reacções bioquímicas, provocadas por enzimas (peroxidase, ascorbato oxidase) ou microorganismos [3]. A degradação enzimática pode ser directa, causada pela ascorbato oxidase, ou indirecta, promovida pela peroxidase, polifenoloxidase e citocromo oxidase. Normalmente, antes do armazenamento, os vegetais sofrem tratamentos térmicos cujo objectivo consiste na inactivação das enzimas, nomeadamente peroxidase [100], o que não aconteceu neste caso. Nos produtos mantidos inteiros, o maior decréscimo diário de L-AA verificou-se no agrião (4,3%/dia), seguido pelos brócolos (4,0%/dia), morangos (3,3%/dia) e maracujás (3,0%/dia) (Figura 38). Os vegetais da família *Brassicaceae* são conhecidos pelo seu alto teor em ferro [29], elevada área superficial e actividade enzimática que contribuem naturalmente para a oxidação do L-AA. O maracujá, apesar de ser o produto armazenado durante mais tempo (15 dias), foi aquele que registou menor redução do conteúdo de L-AA. A casca do maracujá protege a polpa do contacto com a luz e oxigénio, o que, aliado ao seu baixo pH resulta numa taxa de degradação da vitamina C mais lenta.

Não foram observadas variações significativas no comportamento da degradação da vitamina C entre os cultivares regionais e importados. No geral, os produtos regionais apresentavam menor conteúdo de DHAA e menores perdas totais de L-AA, o que pode estar associado ao facto de terem sido colhidos há menos tempo que os cultivares importados. Desconhece-se a data de colheita dos produtos importados, bem como o seu estado de amadurecimento no momento da colheita, se este foi natural ou forçado. Sabe-se que quanto mais avançado o estado de amadurecimento dos produtos, maior a sua susceptibilidade aos efeitos do armazenamento e processamento. Além disso, a acidez das polpas pode ter desempenhado um papel fundamental na estabilização do L-AA durante o período de estudo. Com excepção da polpa de maracujá e morango, o pH das polpas regionais era inferior ao das polpas importadas. Os morangos foram os produtos que apresentaram maior variação dos conteúdos de L-AA e vitamina C total entre o cultivar regional e importado. O estado de amadurecimento dos produtos importados e maior período de armazenamento podem justificar os teores de DHAA apresentados. Já no caso dos pimentos (verde e vermelhos), brócolos, papaias e limões o seu conteúdo em L-AA e vitamina C total era superior ao encontrado nos cultivares regionais. Além das perdas devidas ao armazenamento, esta variabilidade pode ser atribuída às práticas agrícolas e região de cultivo, às condições ambientais (temperatura, tipo de solo, pluviosidade) e às variações genéticas. A frequência de

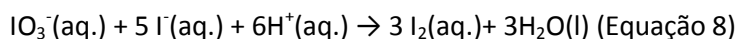
irrigação, a intensidade da luz, a humidade do ar e o uso e tipo de agroquímicos (fertilizantes, herbicidas, pesticidas), podem afectar também a qualidade nutricional de frutas e vegetais [3, 8].

Apesar do comportamento de degradação ser semelhante em todos os produtos hortofrutícolas, a extensão das perdas dependia das características de cada matriz. As taxas de degradação da vitamina C em frutas e verduras *in natura* são muito diferentes, e são afectados por factores como a área de superfície, pH, temperatura, teor de humidade, presença de oxigénio, actividade da água, luz e elevação da temperatura e do tempo de armazenamento. Os mecanismos de tais perdas ainda não estão completamente estabelecidos para frutas e produtos hortícolas específicos, e é provável que envolvam alguns ou todos os processos em graus diferentes. Deste modo, não é possível traduzir as perdas segundo um modelo matemático pois dependem de uma série de factores [29]. Frutos ácidos como os limões foram menos susceptíveis à oxidação do L-AA, ao contrário dos agriões e brócolos. Cada produto tem a sua especificidade e exige cuidados de manutenção diferentes. No entanto, em todos os produtos, verificou-se uma perda progressiva do L-AA e aumento do DHAA com o tempo. Os produtos que sofreram corte durante a análise foram os mais afectados, apresentando perdas totais superiores a 20% para o L-AA em todos os casos. A papaia destaca-se pela sua enorme perecibilidade, quando sujeita a corte ou fatiamento. Esta observação é bastante relevante, pois é uma prática comum dos locais de venda apresentarem a papaia embalada, cortada em metades com a parte interna exposta à luz ou já descascada ou fatiada.

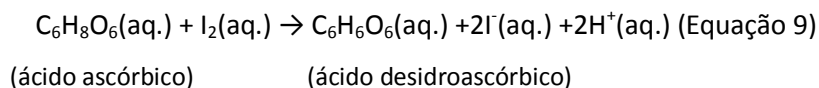
O armazenamento dos produtos hortofrutícolas a 4°C levou a alterações nutricionais tanto nos frutos intactos como nos cortados. No entanto, o tempo de vida útil destes últimos foi muito menor. Os resultados revelaram que a metodologia aplicada não foi adequada pois as perdas verificadas ao longo do armazenamento foram elevadas comparativamente com outros estudos desenvolvidos nas mesmas condições. Foram mimetizadas as condições habituais de acondicionamento doméstico (armazenamento em frigorífico comum a 4°C). As frutas e vegetais que não foram mantidos intactos deveriam ter sido conservados a temperaturas inferiores (-20 °C ou -80 °C) com o objectivo de retardar as reacções de degradação. O revestimento dos produtos cortados com película aderente ou o armazenamento em embalagens adequadas (escuras) poderiam ser opções utilizadas para prolongar o tempo de vida dos vegetais e frutas. Outra alternativa era trabalhar com quantidades maiores dos produtos de modo a poder descartar os frutos e vegetais cortados do estudo.

4.2.4. Titulação Iodométrica

As polpas das frutas e vegetais relativas ao primeiro dia de estudo foram submetidas à análise do L-AA pelo método clássico de titulação com objectivo de estabelecer uma comparação com os teores obtidos por cromatografia líquida. A titulação iodométrica é um procedimento aplicado para determinar a quantidade de ácido L-ascórbico em alimentos frescos, congelados ou embalados, sumos de frutas, e comprimidos [51, 52]. Nesta titulação de oxidação-redução utilizou-se como titulante uma solução 0,002M de KIO_3 e como indicador uma solução 1% de amido. Quando a solução titulante é adicionada ao extracto acidificado, contendo KI, ocorre a formação de iodo molecular (I_2), através da seguinte reacção:



O iodo molecular formado na reacção anterior é um agente oxidante de poder moderado capaz de provocar a oxidação do L-AA a DHAA (Equação 9):



Simultaneamente, o ácido ascórbico provoca a redução do iodo molecular a iodeto que em solução aquosa é incolor. Enquanto houver L-AA presente na solução, o iodo molecular é convertido em ião iodeto muito rapidamente. No entanto, quando todo o L-AA presente na amostra tiver sido consumido, o excesso de iodo produzido reage com o amido, dando origem a um composto de cor azul intensa, indicando o ponto final da titulação. A cor azul característica que se desenvolve na presença do excesso de iodo surge a partir da absorção do iodo na cadeia helicoidal da β -amilose (Figura 37) [47, 51, 52].

Segundo a Equação 9, o L-AA é quantitativamente oxidado pelo iodo, isto é, uma mol de L-AA reage com uma mol de iodo. A concentração do L-AA está directamente relacionada com a quantidade de iodo consumida na titulação, ou seja, quanto mais ácido L-ascórbico contiver a amostra o aparecimento da cor azul é mais lento e maior será o volume de solução de iodo gasto na titulação. Deste modo, é possível estabelecer uma relação matemática entre o volume da solução de KIO_3 necessário para reagir com a quantidade de ácido ascórbico

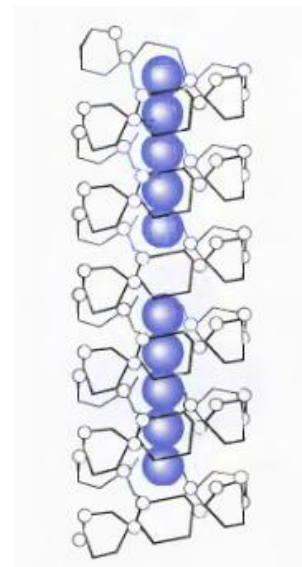


Figura 39- Reacção entre as moléculas de iodo (bolas azuis) e a hélice β -amilase (Fonte: [46]).

presente no produto. O cálculo da concentração do L-AA presente na amostra é feito com base na relação entre o volume de titulante gasto e a massa da polpa utilizada (1 mL de KIO_3 0,002M = 0,8806 mg de L-AA) [48].

A rapidez de reacção do iodo com o L-AA e a facilidade em detectar o ponto final da titulação são as principais vantagens deste método. No entanto, além dos erros pessoais e sistemáticos associados às titulações, deve-se prestar atenção ao titulante uma vez que o iodo é conhecido pela sua falta de estabilidade. As soluções de iodo são bastante instáveis e o soluto pode ser facilmente perdido devido à sua volatilidade. A oxidação pela acção do oxigénio é promovida por ácidos, calor e luz e provoca alterações na molaridade de uma solução de iodo. O aumento da molaridade da solução resulta em resultados sobreestimados da concentração do L-AA.

No entanto, a sua estabilidade pode ser melhorada através da complexação do iodo com iodeto originando o iodo molecular (Equação 8), obtendo-se um resultado mais preciso [47, 51]. Sabe-se também que a temperaturas elevadas a reacção do iodo com o amido torna-se mais lenta [36]. Além disso, o iodo pode ser reduzido por outras espécies oxidáveis, além do L-AA, presentes naturalmente nas frutas e vegetais como a amónia, tióis, taninos, fenóis, metais, entre outros, contribuindo para teores de L-AA superiores aos reais [38, 47]. Deste modo, as soluções de iodo e iodato de potássio eram preparadas de fresco no dia da análise, envolvidas em papel de alumínio e armazenadas no frigorífico. A solução aquosa de amido decompõe-se em poucos dias, principalmente por causa da acção bacteriana. Os produtos da decomposição tendem a interferir com a determinação do ponto final da titulação pois podem ser oxidadas pelo iodo [47]. A preparação de uma solução fresca de amido, no dia em que vai ser utilizada, e a sua conservação ao frio é a melhor solução para evitar erros na determinação do L-AA.

A acidificação do extracto com recurso ao ácido sulfúrico e a extracção a baixas temperaturas foi fundamental para estabilizar o L-AA durante o processo de preparação das amostras. Toda a titulação foi realizada o mais rápido possível para prevenir a oxidação do L-AA pelo oxigénio do ar e pela luz. Além disso, os extractos foram colocados no frigorífico até ao momento de análise. Na Figura 38 e Tabela 19 encontram-se as concentrações obtidas do L-AA nos vários produtos hortofrutícolas determinadas pela titulação iodométrica e pelo UHPLC.

Pela análise da Figura 40 e Tabela 19, as concentrações de ácido L-ascórbico obtidas pela titulação iodométrica são inferiores às obtidas pela cromatografia líquida, com excepção dos maracujás e papaias. Os teores mais baixos podem estar relacionados com o facto de as

amostras terem permanecido em contacto com o oxigénio e luz e oxigénio ao longo do procedimento, o que implica a oxidação do L-AA. Além disso, não podemos comprovar que os valores obtidos são atribuídos exclusivamente à oxidação do L-AA pelo iodo. As perdas ocorridas ao longo da preparação das amostras podem ter sido disfarçadas pela presença de interferentes. Já os níveis superiores obtidos nos maracujás e papaias podem ser atribuídos pela presença de outras moléculas redutoras, além do L-AA, que reagem com os iões iodo retardando o aparecimento do ponto final da titulação. Isto resulta em teores sobrestimados, tal como aconteceu nestes produtos.

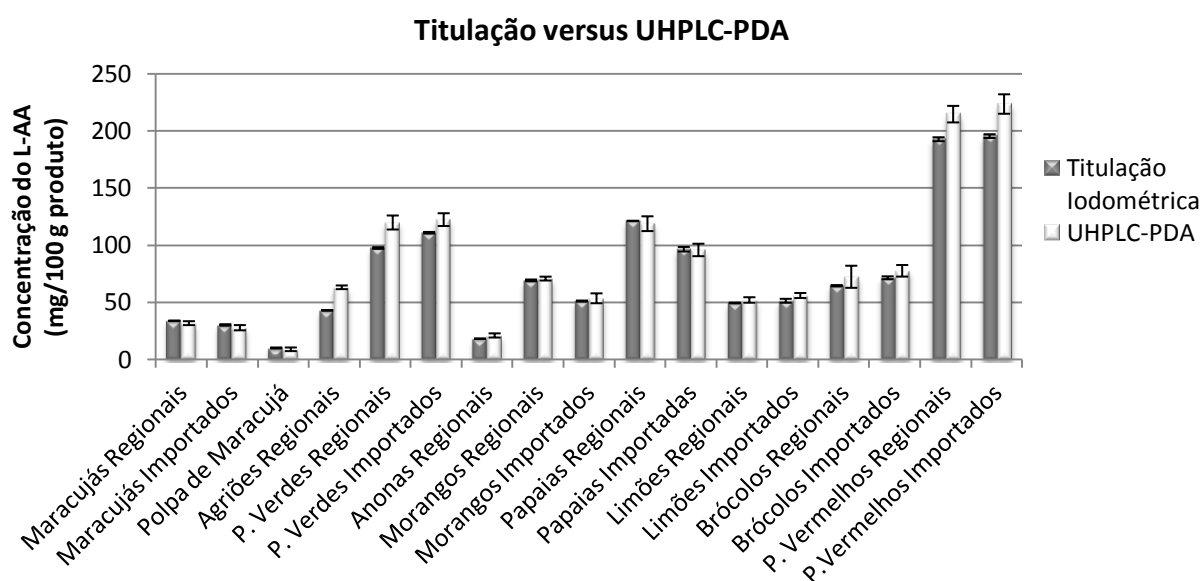


Figura 40 - Comparação do teor de L-AA nos produtos hortofrutícolas determinado pela titulação iodométrica e pelo método UHPLC-PDA. P: Pimentos.

Tabela 19 - Comparação do teor de L-AA nos produtos hortofrutícolas determinado pela titulação iodométrica e pelo método UHPLC-PDA.

Amostra	Titulação Iodométrica ^a	UHPLC-PDA ^a	FCDB ^b
Maracujás Regionais	33,84 ± 0,24	31,76 ± 1,71	30
Maracujás Importados	30,20 ± 0,63	27,78 ± 2,29	
Polpa de Maracujá Congelada	10,04 ± 0,44	8,87 ± 1,61	---
Agriões	42,97 ± 0,32	63,16 ± 1,63	40 - 80
Pimentos Verdes Regionais	97,56 ± 0,75	119,91 ± 13,13	80 - 154
Pimentos Verdes Importados	110,94 ± 0,70	122,43 ± 10,6	
Anonas	18,17 ± 0,22	21,00 ± 1,83	10 - 13
Morangos Regionais	69,20 ± 0,80	70,80 ± 1,70	44- 109
Morangos Importados	51,10 ± 0,48	53,54 ± 4,33	
Papaias Regionais	121,26 ± 0,15	118,86 ± 13,47	62
Papaias Importadas	96,50 ± 2,01	95,87 ± 5,45	
Limões Regionais	49,46 ± 0,33	52,07 ± 2,39	35 - 62
Limões Importados	51,37 ± 1,72	55,97 ± 2,22	
Brócolos Regionais	64,52 ± 0,58	72,38 ± 9,68	87 - 133
Brócolos Importados	71,50 ± 1,28	77,61 ± 5,07	
Pimentos Vermelhos Regionais	192,84 ± 1,71	214,79 ± 13,24	128 - 240
Pimentos Vermelhos Importados	195,53 ± 1,66	223,65 ± 16,51	

^aconcentração média do L-AA (mg/100 g produto) ± desvio-padrão ($n = 3$).

^bvariação dos teores de L-AA nos alimentos relatados nas diferentes FCDB (mg/ 100g produto).

O doseamento do L-AA através deste método é bastante susceptível a incorporar erros, especialmente por parte do operador, pois é difícil determinar com exactidão o ponto final da titulação de alguns extractos coloridos. Deste modo, a cor dos extractos é outro factor que contribuí para erros de medição do teor de L-AA, uma vez que não se mede com exactidão o volume de titulante gasto. Constatou-se também uma grande diferença na cor e turbidez entre os extractos obtidos com ácido sulfúrico (utilizados na titulação) e os extractos obtidos com MPA (UHPLC-PDA), sendo os últimos mais claros e límpidos. Este facto pode também ajudar a disfarçar a mudança de cor da solução. Outra desvantagem deste método é a sua incapacidade em determinar o DHAA presente nas amostras. Pelas razões descritas acima, a cromatografia líquida revelou ser uma técnica mais rigorosa e exacta na determinação das concentrações de L-AA nas amostras. Adicionalmente, é um método mais simples, menos susceptível a erros sistemáticos, interferências da matriz e permite a quantificação do DHAA e da vitamina C total. No entanto, no que diz respeito aos teores do L-AA, as variações entre os métodos não são significativos e estão de acordo com os da cromatografia líquida em relação

aos produtos que apresentam maior quantidade de L-AA inter e intra-cultivares. Tendo em conta que o método UHPLC-PDA implica um enorme investimento económico em equipamento, para análises preliminares ou em situações em que o custo seja um obstáculo, a titulação iodométrica fornece resultados aceitáveis. Talvez por isso seja o método sugerido pela Farmacopeia Brasileira e pelas normas europeias de segurança alimentar na quantificação do L-AA em fármacos e alimentos.

Finalmente, os conteúdos de L-AA obtidos pelos dois métodos estão dentro dos limites relatados nas FCDB (Tabela 19). Tal como verificado pelo método UHPLC-PDA, os teores apresentados pelos maracujás, anonas e papaias são superiores aos descritos pelas bases de dados.

4.3. Actividade Antioxidante pelo método ABTS^{•+}

A actividade antioxidante dos alimentos é atribuída à presença de fitoquímicos com acção antioxidante, nomeadamente, vitaminas (A, C, E), minerais, polifenóis, carotenóides, entre outros. A capacidade antioxidante destas moléculas é devida às suas propriedades redutoras. Uma alimentação rica em frutas e vegetais está associada ao risco reduzido em desenvolver doenças degenerativas, devido à presença destas moléculas [26, 112, 126]. A medição da actividade antioxidante dos alimentos é uma questão com interesse crescente, pois pode fornecer uma variedade de informações tais como, a resistência à oxidação, a contribuição quantitativa das substâncias oxidantes, e a função antioxidante dos alimentos [91, 127]. No entanto, o estudo dos antioxidantes nos alimentos ainda é uma tarefa difícil do ponto de vista analítico, pois as moléculas de interesse encontram-se em misturas muito complexas. Ainda não existe um método de extracção universal para todos os tipos de amostras e compostos, uma vez que os fitoquímicos apresentam diferenças de solubilidade nos solventes. A etapa de extracção é a etapa mais importante, pois os resultados das análises são obtidos em função do conteúdo de substâncias presentes nos extractos. Além do tipo de solvente, o pH, a temperatura, o número de etapas de extracção, entre outros, são factores que influenciam os resultados da capacidade antioxidante [128]. Neste caso, a extracção das amostras foi feita com 50% metanol seguida por 70% acetona de acordo com Vasco et al [26]. Segundo estes autores este método permite a extracção eficaz de vários compostos bioactivos.

Existem muitos métodos empregues para avaliar a capacidade antioxidante dos alimentos e moléculas, e no presente estudo foi aplicado o método ABTS (ou TEAC). Este ensaio é baseado no sequestro dos radicais ABTS^{•+} pelos antioxidantes, convertendo a solução

verde em incolor. O grau dessa descoloração afecta a quantidade de ABTS^{•+} que foi eliminado [129]. A actividade antioxidante dos 9 produtos hortofrutícolas, foi avaliada através deste método, em duas fases: no primeiro e no último dia do estudo (dias 1 e 5, respectivamente). No caso dos maracujás, o último dia de análise corresponde ao 15º dia de armazenamento. Os extractos obtidos eram analisados dentro de uma semana após a sua preparação tendo em conta os resultados obtidos por Nilsson [130]. Estes autores observaram que o valor da TEAC de extractos armazenados a 4°C foi constante durante a primeira semana e depois caiu rapidamente em 40% nas semanas seguintes.

Na Figura 41 e Tabela 20 estão apresentados os resultados obtidos pelo método ABTS^{•+} dos extractos das polpas das frutas e vegetais, expressos em actividade antioxidante equivalente ao Trolox ($\mu\text{mol Trolox/g polpa}$).

Pela análise da Figura 41, a TEAC inicial das frutas e vegetais analisados variou enormemente, apresentando uma ampla gama de capacidades antioxidantes ($3,01 \pm 0,05 - 34,99 \pm 0,88 \mu\text{mol Trolox/g polpa}$). Os produtos que apresentaram maior actividade antioxidante foram os morangos regionais e importados ($34,99 \pm 0,88$ e $32,58 \pm 1,03 \mu\text{mol Trolox/g polpa}$, respectivamente), seguidos pelo agrião ($29,34 \pm 0,68 \mu\text{mol Trolox/g polpa}$) e pimento vermelho regional ($26,67 \pm 1,04 \mu\text{mol Trolox/g polpa}$). Os produtos com menor poder antioxidante foram os maracujás importados e regionais ($3,01 \pm 0,05$ e $4,36 \pm 0,08 \mu\text{mol Trolox/g polpa}$, respectivamente) e os pimentos verdes regionais ($9,63 \pm 0,19 \mu\text{mol Trolox/g polpa}$) e importados ($9,78 \pm 0,13 \mu\text{mol Trolox/g polpa}$) (Tabela 20).

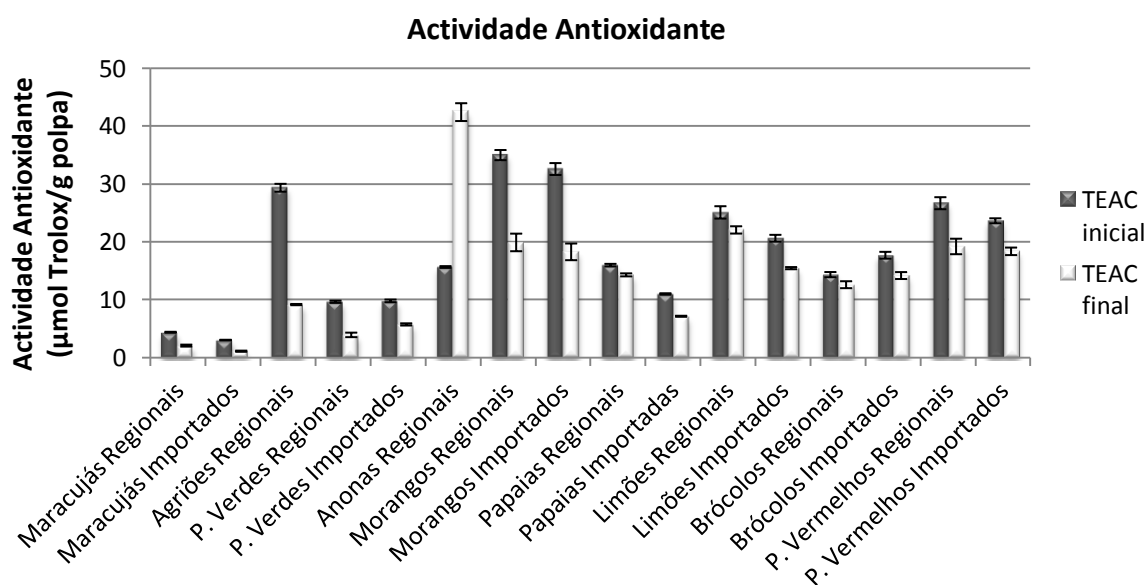


Figura 41- Actividade antioxidante das polpas dos produtos hortofrutícolas, expressa em TEAC ($\mu\text{mol Trolox/g polpa}$). Os produtos foram estudados no primeiro e último dia de análise. P: Pimentos.

Tabela 20 - Actividade antioxidante dos extractos dos produtos hortofrutícolas analisados.

Amostra	TEAC Inicial^a	TEAC Final^b	TEAC média^c
Maracujás Regionais	4,36 ± 0,08	2,05 ± 0,17	3,21 ± 1,63
Maracujás Importados	3,01 ± 0,05	1,08 ± 0,10	2,05 ± 1,36
Agriões	29,34 ± 0,68	9,14 ± 0,11	19,24 ± 14,28
Pimentos Verdes Regionais	9,63 ± 0,19	3,90 ± 0,39	6,77 ± 4,05
Pimentos Verdes Importados	9,78 ± 0,13	5,71 ± 0,19	7,75 ± 2,88
Anonas	15,64 ± 0,15	42,42 ± 1,54	29,03 ± 18,94
Morangos Regionais	34,99 ± 0,88	19,89 ± 1,52	27,44 ± 10,68
Morangos Importados	32,58 ± 1,03	19,26 ± 0,44	25,92 ± 9,42
Papaias Regionais	15,96 ± 0,22	14,28 ± 0,26	15,12 ± 1,19
Papaias Importadas	10,98 ± 0,12	7,12 ± 0,09	9,05 ± 2,73
Limões Regionais	25,08 ± 1,07	22,05 ± 0,63	23,57 ± 2,14
Limões Importados	20,61 ± 0,59	15,44 ± 0,19	18,03 ± 3,66
Brócolos Regionais	14,32 ± 0,45	12,58 ± 0,60	13,45 ± 1,23
Brócolos Importados	17,67 ± 0,59	14,16 ± 0,60	15,92 ± 2,48
Pimentos Vermelhos Regionais	26,67 ± 1,04	19,19 ± 1,34	22,93 ± 5,29
Pimentos Vermelhos Importados	23,63 ± 0,43	18,35 ± 0,65	20,99 ± 3,73

^aActividade antioxidante ($\mu\text{mol eq. Trolox/g polpa}$) dos produtos hortofrutícolas no primeiro dia de análise \pm desvio-padrão ($n = 3$).

^bActividade antioxidante ($\mu\text{mol eq. Trolox/g polpa}$) dos produtos hortofrutícolas após 5 dias de armazenamento \pm desvio-padrão ($n = 3$).

^cMédia das actividades antioxidantes inicial e final ($\mu\text{mol eq. Trolox/g polpa}$) \pm desvio-padrão ($n = 2$).

As diferenças verificadas entre os cultivares regionais e importados não foram significativas, apresentando em todos os casos valores muito semelhantes. Os valores obtidos podem ser atribuídos à região de cultivo, manuseamento e pelo facto dos produtos regionais terem sido colhidos maduros directamente da planta, enquanto, os produtos importados foram colhidos ainda verdes e tiveram o seu amadurecimento completado após a colheita.

No final do estudo, a capacidade antioxidante dos produtos estudados (TEAC final) sofreu algumas alterações em relação ao início do estudo (Figura 41). De um modo geral, a actividade antioxidante dos produtos diminuiu com o tempo de armazenamento, verificando-se perdas entre 10,53 – 68,85%. O maior decréscimo verificou-se no agrião sendo neste caso o vegetal mais sensível. A anona foi a excepção, verificando-se um aumento de 63% do seu poder antioxidante. Estes resultados podem ser justificados com o aumento das reacções químicas e bioquímicas responsáveis pelo amadurecimento das anonas. Além disso, o armazenamento a temperaturas elevadas aliado ao stress nos tecidos induzido pelo corte das

anonas pode ter contribuído para o aumento da actividade enzimática envolvida na síntese de compostos antioxidantes [126]. Já as outras frutas e vegetais não apresentam o mesmo comportamento durante o seu armazenamento a baixas temperaturas. A diminuição da actividade antioxidante pode estar relacionada com o armazenamento a temperaturas de refrigeração, uma vez que as baixas temperaturas retardam as reacções enzimáticas [126]. Hunter [131] e Antonia Murcia [132] relataram diminuições da actividade antioxidante nos vegetais armazenados à temperatura ambiente e refrigerados. Os brócolos armazenados num frigorífico doméstico durante uma semana mostraram perdas entre 30 - 40% em relação ao primeiro dia de análise. As perdas da actividade antioxidante dos brócolos analisados no presente trabalho variaram entre 12,15 – 19,86%. Por outro lado, o avançado estado de amadurecimento dos produtos associado ao corte/fatiamento contribuíram para os resultados obtidos. O ferimento dos tecidos vegetais provoca um conjunto de distúrbios fisiológicos, incluindo a degradação enzimática e produção de etileno, que acelera a senescência dos produtos. Deste modo, as frutas e vegetais sujeitas a corte ou fatiamento são mais susceptíveis à deterioração e ao aumento do stress oxidativo resultando no consumo das moléculas antioxidantes [126, 133].

Os produtos com maior TEAC final foram as anonas ($42,42 \pm 1,54 \mu\text{mol Trolox/g polpa}$), limões regionais ($22,05 \pm 0,63 \mu\text{mol Trolox/g polpa}$) e morangos regionais ($19,89 \pm 1,52 \mu\text{mol Trolox/g polpa}$). Os maracujás importados ($1,08 \pm 0,10 \mu\text{mol Trolox/g polpa}$), regionais ($2,05 \pm 0,17 \mu\text{mol Trolox/g polpa}$) e pimentos verdes regionais ($3,90 \pm 0,39 \mu\text{mol Trolox/g polpa}$) foram os produtos com menor actividade. Ao contrário dos pimentos verdes e dos brócolos importados, todos os outros produtos regionais tinham maior capacidade antioxidante que os produtos importados.

De um modo geral, os produtos hortofrutícolas que apresentaram maior actividade antioxidante (TEAC média) por ordem decrescente foram: Anonas > Morangos Regionais > Morangos Importados > Limões Regionais > Pimentos Vermelhos Regionais > Pimentos Vermelhos Importados > Agriões > Limões Importados > Brócolos Importados > Papaias Regionais > Brócolos Regionais > Papaias Importadas > Pimentos Verdes Importados > Pimentos Verdes Regionais > Maracujás Regionais > Maracujás Importados (Tabela 20). Leong et al [112] estudaram a capacidade antioxidante de vários frutos (expressa em mg vitamina C/100 g polpa) e observaram também que os morangos tinham maior actividade que os limões. Vasco [26] indicaram a mesma ordem de potencial antioxidante ao estudar várias

frutas tropicais (anonas, morangos e maracujás). As actividades antioxidantes destes frutos também foram semelhantes às obtidas no presente estudo.

Os resultados obtidos neste trabalho para os maracujás (2,05 – 3,21 $\mu\text{mol Trolox/g}$ polpa) estão de acordo com os encontrados no estudo realizado por Prado [128] (3,34 \pm 0,08 $\mu\text{mol Trolox/g}$ polpa) e Kuskosi [134] (2,7 $\mu\text{mol Trolox/g}$ polpa). Segundo este autor a capacidade antioxidante dos maracujás, obtida pelo método ABTS, está directamente relacionada com o teor de compostos fenólicos e antocianinas. Além disso, relatou que o potencial antioxidante do morango é superior ao do maracujá.

Tiveron [135] no seu trabalho sobre actividade antioxidante de legumes e verduras, encontrou valores muito superiores para o agrião (79,90 \pm 0,10 $\mu\text{mol Trolox/g}$ polpa) e brócolos (33,91 \pm 1,22 $\mu\text{mol Trolox/g}$ polpa). Esta autora verificou também que o agrião apresenta actividade antioxidante superior aos brócolos (Tabela 20).

Na literatura não foi encontrada nenhuma referência sobre a actividade antioxidante dos pimentos verdes pelo método ABTS.

Estudos recentes [107, 108] revelam que a anona contém elevadas propriedades antioxidantes (22,94 – 37,63 $\mu\text{M Trolox}/\mu\text{L extracto}$), o que está de acordo com as actividades antioxidantes obtidas neste trabalho (29,03 \pm 18,94 $\mu\text{M Trolox/g}$ polpa). As anonas são frutos ricos em compostos fenólicos e segundo Barreca [108] e Vasco [26] o elevado potencial antioxidante destes frutos deve-se à presença destas substâncias.

Tulipani [136] e Proteggente [137] relataram actividades inferiores às obtidas neste trabalho (25,92 – 27,44 $\mu\text{M Trolox/g}$ amostra) em diferentes génotipos de morangos (11,27 – 19,41 $\mu\text{M Trolox/g}$ amostra). Num estudo realizado por Odriozola-Serrano [113] a actividade antioxidante dos morangos (conservados em atmosferas modificadas) manteve-se constante durante os dois primeiros dias de armazenamento, seguindo-se um aumento no dia 4 e um decréscimo após o dia 9 em qualquer uma das condições analisadas. As variações dos teores dos compostos activos ao longo do tempo podem estar associadas à composição da atmosfera. No presente estudo, o avançado estado de amadurecimento dos morangos pode ter contribuído para a diminuição da actividade antioxidante. Apesar disso, os morangos analisados por Odriozola-Serrano [113] apresentaram também antioxidantes inferiores às obtidas no presente estudo. Tulipani [136] e Odriozola-Serrano [113] observaram uma forte correlação entre o conteúdo de antocianinas e a capacidade antioxidante total dos morangos,

confirmando as descobertas anteriormente observadas nestes frutos. Sabe-se que os flavonóides, nomeadamente as antocianinas, são os componentes antioxidantes principais dos morangos. Estas moléculas desempenham um papel muito importante na actividade antioxidante destes frutos. Além disso, este último autor obteve também uma boa correlação entre a capacidade antioxidante e o conteúdo de L-AA nos morangos. Assim, pode-se dizer que para além das antocianinas a presença da vitamina C no extracto de morango também contribuiu para os resultados obtidos.

Gayosso-García Sancho et al [114] relataram que a capacidade antioxidante diminui com o amadurecimento das papaias, relacionado com a diminuição do conteúdo em compostos fenólicos. A actividade antioxidante nas papaias estudadas variou entre 5,94 – 5,48 $\mu\text{mol Trolox/g}$ amostra, sendo inferiores às relatadas no presente estudo (7,12 – 15,96 $\mu\text{mol Trolox/g}$ amostra). Almeida et al [129] indicaram valores inferiores ($7,60 \pm 0,20 \mu\text{mol Trolox/g}$ amostra) aos descritos neste estudo. Foi também observada uma forte correlação entre a actividade antioxidante mediada por ABTS e DPPH e o teor de compostos fenólicos (ácidos fenólicos, taninos e proantocianidinas), indicando que estes são os compostos com maior contribuição para a actividade antioxidante nos frutos estudados. Isto está em concordância com os factos relatados por Kuskosi [134]. Num estudo realizado por Gayosso-García Sancho [116] a actividade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH, ABTS e ORAC apresentou uma forte correlação com o conteúdo de vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos. Deste modo, outros compostos, como os carotenóides e vitamina C podem também contribuir para o potencial antioxidante das amostras.

Nilsson [130] investigaram a capacidade antioxidante dos limões e indicaram valores ligeiramente superiores ($29,6 \pm 7,0 \mu\text{mol Trolox/g}$ polpa) aos encontrados neste estudo ($18,03 - 23,57 \mu\text{mol Trolox/g}$ polpa). Por outro lado, os resultados obtidos encontravam-se de acordo com as actividades antioxidantes relatadas por González-Molina [118] ($14,2 - 35,5 \mu\text{mol Trolox/ mL}$ polpa). Segundo estes mesmos autores, o potencial antioxidante nos citrinos é o resultado do conteúdo em vitamina C e flavonóides. A vitamina C contribui com cerca de 65% da capacidade antioxidante total do limão, constituindo o principal antioxidante nos citrinos [138].

O potencial antioxidante dos brócolos obtido neste trabalho ($13,45 - 15,92 \mu\text{mol Trolox/g}$ polpa) foi inferior ao relatado por vários autores: $33,91 \pm 1,12 \mu\text{mol Trolox/g}$ polpa [135]; $26,2 \pm 1,37 \mu\text{mol Trolox/g}$ polpa [139] e $25,1 - 25,9 \mu\text{mol Trolox/g}$ polpa [140].

Protegente [137] estudaram brócolos com actividades inferiores às observadas no presente estudo (6,5 $\mu\text{mol Trolox/g}$ polpa). Os vegetais da família *Brassicaceae* como os brócolos e agrião são conhecidos pela sua elevada actividade antioxidante devido ao seu alto teor de compostos fenólicos e vitamina C. Além dos flavonóides, os glicosinolatos têm sido associados ao potencial antioxidante destes vegetais porque estão presentes em grandes quantidades. Já os carotenóides e vitamina E são responsáveis por até 20% da sua actividade antioxidante total [121, 139].

Os resultados obtidos para os pimentos vermelhos (21,41 – 22,51 $\mu\text{mol Trolox/g}$ polpa) estão de acordo com as actividades antioxidantes reportadas por Navarro [141] (17,57 – 32,42 mmol Trolox/ mL polpa). Estes autores observaram também uma correlação entre a actividade antioxidante total medida pelo método ABTS e o conteúdo dos carotenóides (licopeno e β -caroteno) dos pimentos vermelhos. Isto significa que a actividade antioxidante deste vegetal deve-se sobretudo a estes compostos. No entanto, os carotenóides são degradados por co-oxidação com a senescência dos produtos [142]. Segundo Navarro [141] os pimentos vermelhos apresentam um maior conteúdo de carotenóides (licopeno, β -caroteno) que os pimentos verdes, o que pode justificar as diferenças de actividades observadas entre os pimentos verdes e vermelhos estudados.

Todos os produtos hortifrutícolas estudados apresentaram boas capacidades antioxidantes, no entanto, a intensidade desta acção variou consoante a espécie. As variações obtidas inter e intra-espécies estão relacionadas com a concentração dos compostos bioactivos presentes nos produtos hortofrutícolas. A quantidade e o perfil destes fitoquímicos variam em função do tipo, variedade e grau de maturação bem como das condições climáticas e edáficas de cultivo [112, 121, 126]. Por outro lado, os teores dos fitoquímicos variam ao longo do tempo, sendo afectados pelas condições pós-colheita como a temperatura e duração do armazenamento. Os compostos fenólicos e a vitamina C são os antioxidantes mais susceptíveis à oxidação [132]. As anonas e os morangos destacaram-se (Figura 39 e Tabela 20) enquanto os maracujás apresentaram o potencial antioxidante mais baixo. O conteúdo dos compostos antioxidantes sofreu alterações com o armazenamento. No geral, a actividade antioxidante dos produtos diminuiu em relação ao primeiro dia de análise, sobretudo devido à deterioração dos produtos. No caso das anonas observou-se o inverso. O avançado estado de amadurecimento dos outros produtos comparado com as anonas pode ser a justificação dos resultados obtidos, uma vez que as anonas foram colhidas verdes. Tendo em conta a acção antioxidante exibida, os alimentos estudados podem ser apontados como boas fontes de

antioxidantes naturais. Deste modo, o seu consumo deve ser estimulado devido às propriedades benéficas que apresentam para a saúde humana.

Sabe-se também que, a capacidade antioxidante dos frutos e vegetais depende de um grande número de fitoquímicos, tais como, flavonóides, ácidos fenólicos, aminoácidos, vitamina C, tocoferóis e carotenóides que contribuem para a capacidade antioxidante total dos produtos. O conteúdo destes compostos varia em muito entre as várias frutas e legumes, daí que, a capacidade antioxidante de um produto difere consideravelmente de outro. A contribuição da vitamina C para a actividade antioxidante medida pelo método ABTS varia extensivamente entre frutas (15 - 65%) [112, 138]. A Figura 42 exhibe os dados da vitamina C total versus os valores da actividade antioxidante média obtidos no presente estudo, mostrando a inexistência de correlação ($r^2 = 0,0098$) entre eles. Deste modo, a capacidade antioxidante não pode ser apenas atribuída à vitamina C, mas sim à acção combinada de diferentes compostos bioactivos [26, 129]. Por exemplo, as anonas que apresentam um baixo teor de vitamina C são o produto com maior potencial antioxidante. Isto revela, que a vitamina C não é o principal contribuidor da actividade antioxidante desta fruta. É possível que outros compostos, além do L-AA, estejam presentes nos extractos testados, os quais podem estar contribuindo sinérgica ou antagonicamente para a capacidade antioxidante das frutas analisadas. Para tal, a identificação e quantificação de outras moléculas bioactivas deve ser a etapa a investigar de seguida. Uma vez que a capacidade antioxidante do alimento é determinada por uma mistura de antioxidantes diferentes, com diferentes mecanismos de acção, entre interações sinérgicas e antagónicas, é necessário combinar mais de um método para determinar *in vitro*, a capacidade antioxidante de produtos alimentares [26, 143].

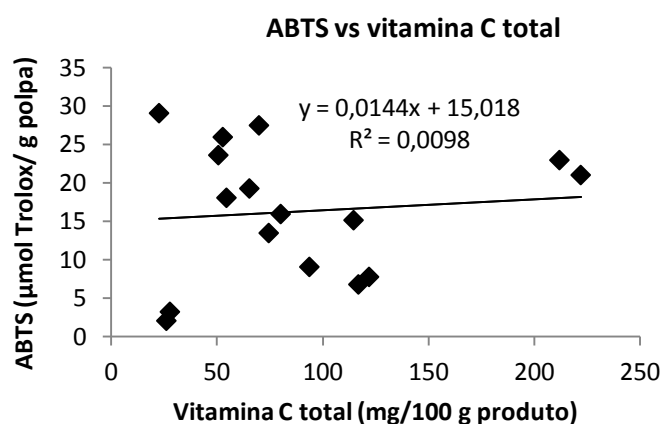


Figura 42 - Correlação entre o teor médio de L-AA obtido e o método ABTS.

O método ABTS revelou ser de confiança, rápido (6 minutos de análise), simples e fornece resultados reprodutíveis e coerentes. Além disso, permite tanto a análise de amostras de natureza lipofílica como hidrofílica [134, 143]. Permite também medir a actividade antioxidante das amostras na sua totalidade sem ser necessário estudar cada composto separadamente. O efeito sinérgico que pode existir entre os diferentes antioxidantes significa que o efeito antioxidante total pode ser maior do que a soma das actividades antioxidantes individuais e o isolamento de um composto pode não reflectir exactamente a sua acção global. Além disso, existem muitos componentes bioactivos nos tecidos vegetais, sendo bastante difícil medir o potencial antioxidante de cada componente separadamente. Embora o método TEAC seja mais simples e barato do que outros (DPPH, ORAC), o resultado obtido pode ser subestimado pois ocorrem interacções antagonistas entre os vários compostos presentes em misturas complexas, como extractos de frutas e vegetais [26, 127]. Muitas vezes a reacção não está completa ao fim dos 6 minutos traduzindo-se em resultados que não correspondem à realidade. Este método tem sido criticado pelo facto do ABTS^{•+} ser uma molécula artificial e como tal não se encontra em nenhum sistema biológico e pode não representar com precisão os efeitos *in vivo* [143]. Adicionalmente é difícil comparar os valores obtidos com os dos outros métodos, pois os ensaios diferem em relação ao mecanismo de reacção, às espécies-alvo, às condições reaccionais e na forma como os resultados são expressos. Este facto impõe a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diferentes métodos, com fundamentos e mecanismos de acção diferentes. Só assim é possível obter uma correcta avaliação da capacidade antioxidante dos produtos. Muitas vezes as grandes variações encontradas podem dever-se também à inexistência de um procedimento metodológico universal, além dos factores intrínsecos (variedade, estado de amadurecimento) e extrínsecos (condições ambientais e edáficas). Deste modo, é urgente proceder à padronização dos métodos de avaliação da capacidade antioxidante tal como sugerido por Huang [144].

5. CONCLUSÕES

Neste estudo, foi determinado o conteúdo vitamina C total de 9 produtos hortofrutícolas cultivados na RAM, e estabeleceu-se uma comparação com os teores obtidos em 7 cultivares importados. Desenvolveu-se uma nova metodologia UHPLC-PDA, que foi validada e aplicada com sucesso na análise do L-AA em frutas e vegetais de origens diferentes. A validação do método demonstrou resultados satisfatórios no que diz respeito à selectividade, linearidade, sensibilidade, precisão intra/inter-dias e rendimentos de recuperação. No entanto, a grande inovação desta metodologia diz respeito ao uso de uma fase móvel muito simples, mas eficaz que promove a supressão de iões, aplicando pressões elevadas, e utilizando uma coluna de fase reversa especialmente concebida para compostos polares. Este novo revestimento (HSS - fase ligada trifuncional) revelou-se uma excelente alternativa para as colunas C18 convencionais na análise da vitamina C em diversos produtos alimentares, superando os problemas de resolução normalmente encontrados na abordagem HPLC.

Tendo em conta a instabilidade da vitamina C, adoptaram-se medidas para prevenir a sua degradação ao longo da preparação das amostras, nomeadamente o controlo do pH, temperatura e abrigo da luz e do oxigénio. A metodologia desenvolvida forneceu resultados reprodutíveis e proporcionou uma boa separação cromatográfica, livre da interferência de outros compostos em todas as matrizes vegetais estudadas. A reacção com DTT permitiu quantificar indirectamente o teor de DHAA nos produtos hortofrutícolas. Devido à baixa sensibilidade UV para o DHAA, a análise directa desta molécula era difícil, mesmo em concentrações elevadas. O método da subtracção provou ser uma determinação adequada para a vitamina C total através da conversão do DHAA a L-AA e a detecção da forma reduzida. A metodologia desenvolvida no presente estudo atingiu, portanto, o objectivo de promover uma boa separação cromatográfica para a vitamina C e as perdas do analito foram minimizadas através da adopção de um protocolo de preparação das amostras igualmente simples e rápido.

Os vegetais estudados representaram melhores fontes de vitamina C que as frutas, nomeadamente os pimentos vermelhos e verdes tendo em conta os teores de vitamina C total determinados neste estudo. Já os maracujás e anonas foram os produtos com conteúdo mais baixo de vitamina C. Destaca-se a variação de concentrações de L-AA, DHAA e vitamina C total

encontrados nos diferentes produtos, principalmente no caso dos morangos regionais e importados. Os frutos produzidos localmente apresentaram concentrações mais elevadas de vitamina C, em comparação com os importados (com excepção dos limões). Os legumes apresentaram uma tendência contrária. Sabe-se que o conteúdo de vitamina C é influenciado por vários factores nomeadamente, variações genéticas, métodos de cultivo, grau de amadurecimento, condições ambientais e processamento pós-colheita (temperatura de conservação). O tempo entre a colheita e o consumo desempenha um grande papel no teor de vitamina C encontrado nos alimentos.

Os teores de L-AA e DHAA nos produtos hortofrutícolas variaram de forma oposta com o tempo de armazenamento. O rácio de transformação DHAA/L-AA era superior nos produtos importados. Apesar disso, o L-AA foi sempre a forma predominante da vitamina C em todos os alimentos analisados. A determinação do DHAA juntamente com o L-AA é de grande importância, uma vez que o seu teor torna-se bastante significativo com o aumento do tempo armazenamento dos alimentos e seu processamento. Se o teor de DHAA não for determinado o conteúdo total de vitamina C nos produtos hortofrutícolas é subestimado.

Os produtos com maior perda de vitamina C foram aqueles sujeitos a corte e fatiamento, nomeadamente papaias e pimentos vermelhos. O processamento mínimo das frutas e hortaliças tem consequências no valor nutritivo e é responsável pela deterioração mais rápida limitando o prazo de validade dos produtos. Os ferimentos causados pelo corte ou fatiamento resultam numa activação da actividade metabólica, com o aumento da taxa de respiração e da produção de etileno, promovendo maiores perdas da vitamina C. Com excepção dos morangos regionais, as perdas de L-AA foram superiores nos produtos importados.

Os testes de degradação realizados permitiram estabelecer que a conservação dos extractos a -80 °C em ambientes ácidos é o método mais eficaz na conservação do L-AA por longos períodos.

A cozedura dos alimentos provoca a degradação do L-AA e vitamina C total, que ocorre sobretudo por lixiviação e não por degradação térmica. Uma grande parte da vitamina C fica retida na água de cozedura, daí que os tempos de cozedura dos alimentos devem ser reduzidos tal como, a quantidade de água utilizada no processo.

As FCDB nunca estão totalmente completas e necessitam de uma actualização constante. Existe uma falta de informação sobre teor de vitamina C de algumas frutas e

legumes em algumas bases de dados. Além disso, muitas delas não têm em conta o conteúdo de DHAA dos alimentos, nem fornecem informações sobre o cultivar ou o método de análise aplicado.

A comparação com a titulação iodométrica forneceu, no geral, resultados ligeiramente inferiores aos obtidos pelo método anterior. Este método está sujeito à interferência de várias substâncias redutoras, além de que durante a análise a amostra está em contacto com a luz e oxigénio o que promove a degradação do L-AA. O UHPLC apresenta-se como uma alternativa de confiança para a titulação iodométrica, fornecendo resultados mais satisfatórios e permite também a detecção do DHAA. As principais vantagens do método UHPLC-PDA desenvolvido são a sua simplicidade, rapidez (o tempo análise não excede os 3 minutos) e elevada sensibilidade, selectividade e precisão. Os resultados demonstraram que o método aplicado é uma abordagem atraente e bastante promissora para a análise da vitamina C total em comparação a outros procedimentos clássicos, mas também, ao HPLC. Além disso, esta metodologia pode ser aplicada em trabalhos futuros, na análise da vitamina C numa grande variedade de alimentos, nomeadamente alimentos processados.

Como aspecto secundário, a capacidade antioxidante dos mesmos produtos foi avaliada pelo método do ABTS^{•+}. Os resultados mostraram uma ampla gama de variação em relação à actividade antioxidante total entre os produtos estudados. Os extractos de frutas e vegetais que apresentaram os maiores resultados de actividade antioxidante foram as anonas e os morangos (regionais e importados). O estudo confirmou a boa actividade antioxidante das frutas e das hortaliças estudadas. Os maracujás e os pimentos verdes foram os produtos estudados com menor capacidade antioxidante.

O presente trabalho foi o primeiro a determinar os níveis de vitamina C total em produtos cultivados na RAM. Apesar disso, os resultados obtidos não permitem apresentar uma conclusão consistente sobre o conteúdo de vitamina C dos produtos regionais e importados, uma vez que o trabalho foi realizado com produtos do mesmo lote. Era necessária mais investigação e controlo dos parâmetros que influenciam o conteúdo de vitamina C dos produtos hortofrutícolas e que não foram tidos em conta neste trabalho. O procedimento mais correcto seria desenvolver um estudo durante um período de tempo mais alargado (1 - 2 anos), utilizando mais lotes de frutas, colhidos em diferentes épocas do ano e provenientes de regiões de cultivo diferentes. Utilizando quantidades maiores dos produtos seria possível avaliar a degradação da vitamina C nos alimentos intactos, eliminando a variável do corte ou fatiamento. Assim, os resultados obtidos seriam muito mais significativos e era possível

estabelecer a extensão da influência dos locais, época e métodos de cultivo nos teores de vitamina C. Seria também possível analisar as variações dos níveis de vitamina C e também das capacidades antioxidantes entre os cultivares regionais e importados e estabelecer uma conclusão mais satisfatória. No entanto, tendo em conta o curto prazo para desenvolver a tese de mestrado não foi possível realizar este estudo mais abrangente.

Um estudo complementar que deve ser desenvolvido no futuro é a identificação do L-AA e DHAA por MS, assim como de outros compostos presentes nas amostras. Adicionalmente, o estudo dos teores de L-AA e vitamina C total nos agriões e anonas importados deve ser desenvolvido de modo a complementar o estudo comparativo. Além disso, a utilização de outros métodos para avaliação da capacidade antioxidante dos frutos deve ser aplicado pois permite uma melhor avaliação desta propriedade biológica. O método FRAP e DPPH apresentam o mesmo mecanismo de reacção que o ABTS e portanto podem ser aplicados com o objectivo de estabelecer uma eventual comparação entre os resultados obtidos pelos diferentes métodos e obter o máximo de informação útil sobre a capacidade antioxidante total dos produtos. A técnica LC-MS poderia ser útil pois permite a identificação dos compostos bioactivos que possam estar associados à actividade antioxidante das frutas e vegetais.

Os teores de vitamina C e a considerável capacidade antioxidante de alguns produtos, tornam estas frutas e vegetais produtos indispensáveis à alimentação. O seu consumo deve ser incentivado tendo em conta o seu valor nutricional. Dos 9 produtos alimentares analisados, 7 deles fornecem mais de 50% da DDR para a vitamina C (sendo que 3 fornecem mais de 100% da DDR). Além disso, devem ser alvo de futuras pesquisas visando a identificação e posterior isolamento de compostos bioactivos para aplicação em sistemas *in vivo* e/ou utilizados como nutracêuticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Johnston C. S., Bowling, D.L. Ascorbic acid. In: Handbook of Vitamins. 4 ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2007. p. 489-520.
2. Nyyssonen K., Salonen, J.T., Parviainen, M.T. Ascorbic Acid. In: Modern Chromatographic Analysis of Vitamins. New York, USA: Marcel Dekker, Inc.; 2000. p. 271-300.
3. Davey M. W., Montagu M. V., Inzé D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J Sci Food Agric* 2000; 80:825-860.
4. Eitenmiller R. R., Ye, L., Landen, Jr., W.O. Ascorbic acid: vitamin C. *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*. 2 ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press 2008. p. 231-289.
5. Naidu K. A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J* 2003; 2:7.
6. Arrigoni O., De Tullio M. C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta, Gen Subj* 2002; 1569:1-9.
7. Pauling L. Linus Pauling Institute at Oregon State University. [04-07-2011]; Available from: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminC/>.
8. Lee S. K., Kader A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol Technol* 2000; 20:207-220.
9. Deutsch J. C. Dehydroascorbic acid. *J Chromatogr A* 2000; 881(1-2):299-307.
10. Nollet L. M. L. Quantitative determination of water-soluble vitamins: Vitamin C. *Food Analysis by HPLC*, 2 ed. New York, USA: Marcel Dekker, Inc.; 2000. p. 403-415.
11. Nováková L., Solich P., Solichová D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *TrAC, Trends Anal Chem* 2008; 27:942-958.
12. Phillips K. M., et al. Stability of vitamin C in frozen raw fruit and vegetable homogenates. *J Food Compos Anal* 2010; 23:243-259.
13. Odriozola-Serrano I., Hernández-Jover T., Martín-Belloso O. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chem* 2007; 105:1151-1158.
14. Rosa J. S., Godoy R. L. d. O., Oiano Neto J., Campos R. d. S., Matta V. M., Freire C. A. Desenvolvimento de um Método Rápido para Análise de Vitamina C por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando Coluna de Troca Iônica. *Cienc Tecnol Aliment (Campinas, Braz)* 2007; 27:837-846.
15. Wilson J. X. The physiological role of dehydroascorbic acid. *FEBS Lett* 2002; 527:5-9.

16. Valpuesta V., Botella M. A. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends Plant Sci* 2004; 9:573-577.
17. Griffiths H. R., Lunec J. Ascorbic acid in the 21st century - more than a simple antioxidant. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001; 10:173-182.
18. Davì G., Santilli F., Patrono C. Nutraceuticals in Diabetes and Metabolic Syndrome. *Cardiovasc Ther* 2010; 28:216-226.
19. Fenoll J., Martínez A., Hellín P., Flores P. Simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in vegetables and fruits by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chem* 2011; 127: 340-344.
20. DTU Food National Food Institute, Danish Food Composition Database, ed. 7.01. Technical University of Denmark (DTU); [04-07-11]; Available from: http://www.foodcomp.dk/v7/fcdb_foodnutrlist.asp?CompId=0050.
21. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2006, USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 19, Nutrient Data Laboratory. Nutrient Data Laboratory, USDA; [04-07-2011]; Available from: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>.
22. Tabela da Composição dos Alimentos (TCA) - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Lisboa2006 [04-07-2011]; Available from: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/PorPalavraChave.aspx>.
23. Fineli - Finish Food Composition Database. National Institute for Health and Welfare (THL). 2009 [04-07-2011]; Available from: <http://www.fineli.fi/index.php?lang=en>.
24. Wall M. M. Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa sp.*) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. *J Food Compos Anal* 2006; 19:434-445.
25. Zhang D., Hamazu Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chem* 2004; 88:503-509.
26. Vasco C., Ruales J., Kamal-Eldin A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem* 2008; 111:816-823.
27. Food and Nutrition Board I. o. M., National Academics. Dietary reference intakes (DRIs): estimated average requirements for groups. [27/07/2011]; Available from: http://iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/~media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRIs/RDA%20and%20AIs_Vitamin%20and%20Elements.pdf.

28. Koh E., Wimalasiri K. M. S., Chassy A. W., Mitchell A. E. Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli. *J Food Compos Anal* 2009; 22:637-643.
29. Giannakourou M. C., Taoukis P. S. Kinetic modelling of vitamin C loss in frozen green vegetables under variable storage conditions. *Food Chem* 2003; 83:33-41.
30. Burdurlu H. S., Koca N., Karadeniz F. Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. *J Food Eng* 2006; 74:211-216.
31. Phillips K. M., Tarragó-Trani M. T., Gebhardt S. E., Exler J., Patterson K. Y., Haytowitz D. B. Stability of vitamin C in frozen raw fruit and vegetable homogenates. *J Food Compos Anal* 2010; 23:253-259.
32. Veltman R. H., Kho R. M., van Schaik A. C. R., Sanders M. G., Oosterhaven J. Ascorbic acid and tissue browning in pears (*Pyrus communis* L. cvs Rocha and Conference) under controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biol Technol* 2000; 19:129-137.
33. Francisco M., Velasco P., Moreno D. A., García-Viguera C., Cartea M. E. Cooking methods of *Brassica rapa* affect the preservation of glucosinolates, phenolics and vitamin C. *Food Res Int* 2010; 43:1455-1463.
34. Quirós A. R.-B., Fernández-Arias M., López-Hernández J. A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks. *Food Chem* 2009; 116:509-512.
35. 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 Chromatogr A* 2000; 881:309-316.
36. Arya S. P., Mahajan M., Jain P. Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. *Anal Chim Acta* 2000; 417:1-14.
37. Oliveira M. A. B. Análise de vitamina C e carotenóides - guia prático de laboratório. Noryam Editora; 2007.
38. Hernández Y., Lobo M. G., González M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chem* 2006; 96:654-664.
39. Nováková L., Solichová D., Solich P. Hydrophilic interaction liquid chromatography - charged aerosol detection as a straightforward solution for simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid. *J Chromatogr A* 2009; 1216:4574-4581.
40. Iwase H. Use of an amino acid in the mobile phase for the determination of ascorbic acid in food by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr A* 2000; 881:317-326.
41. Franke A. A., Custer L. J., Arakaki C., Murphy S. P. Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *J Food Compos Anal* 2004; 17:1-35.

42. Iwase H. Routine high-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in foods using L-methionine for the pre-analysis sample stabilization. *Talanta* 2003; 60:1011-1021.
43. Iwase H. Use of nucleic acids in the mobile phase for the determination of ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr A* 2000; 881:327-330.
44. Rizzolo A., Brambilla A., Valsecchi S., Eccher-Zerbini P. Evaluation of sampling and extraction procedures for the analysis of ascorbic acid from pear fruit tissue. *Food Chem* 2002; 77:257-262.
45. Kabasakalis V., Siopidou D., Moshatou E. Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chem* 2000; 70:325-328.
46. AOAC International, *Official Methods of Analysis*. 18 ed. Arlington, VA: AOAC Int Publ 2005.
47. Skoog D. A., West D. M., Holler J. F., Crunch S. R. Applications of oxidation/reduction titrations. In: *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 8th ed. Belmont, USA: Thomson Brooks/Cole; 2004. p. 576-581.
48. Odair Zenebon N. S. P., Paulo Tiglea. *Métodos Físico-Químicos para a Análise de Alimentos: Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz 2008 [27-10-2010]. Available from:
http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf.
49. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food On a request from the Commission related to Calcium ascorbate with a content of threonate for use as a source of vitamin C in food supplements. *The EFSA J* 2007; 491:1-10.
50. ANVISA. *Farmacopeia Brasileira*. Brasília: Editora FIOCRUZ; 2010 [27-10-2010]; 5ª:
[Available from: <http://pt.scribd.com/doc/50285353/Farmacopeia-Brasileira-5-ed-volume-2-Anvisa>].
51. Determinação de vitamina C por titulação iodométrica. [23-10-2010]; Available from:
<http://chemistry.about.com/od/demonstrationexperiments/ss/vitctitration.htm>.
52. Determinação da Vitamina C por titulação. [23-10-2010]; Available from:
http://www.outreach.canterbury.ac.nz/chemistry/documents/vitaminc_iodate.pdf.
53. Burini G. Development of a quantitative method for the analysis of total L-ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2007; 1154:97-102.

54. Kall M. A., Andersen C. Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl* 1999; 730:101-111.
55. Sánchez-Mata M. C., Cámara-Hurtado M., Díez-Marqués C., Torija-Isasa M. E. Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Eur Food Res Technol* 2000; 210:220-225.
56. Romeu-Nadal M., Morera-Pons S., Castellote A. I., Lopez-Sabater M. C. Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 830:41-46.
57. Versari A., Mattioli A., Paola Parpinello G., Galassi S. Rapid analysis of ascorbic and isoascorbic acids in fruit juice by capillary electrophoresis. *Food Control* 2004; 15:355-358.
58. Trenerry V. C. The application of capillary electrophoresis to the analysis of vitamins in food and beverages. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2001. p. 1468-1478.
59. Lee H. S. a. C., G.A. Measurement of total vitamin C activity in citrus products by HPLC: a review. *J Liq Chrom Rel Technol* 1999; 22(2367).
60. Silva F. O. Total ascorbic acid determination in fresh squeezed orange juice by gas chromatography. *Food Control* 2005; 16:55-58.
61. Ribeiro B., Rangel J., Valentão P., Andrade P. B., Pereira J. A., Bölke H., et al. Organic acids in two Portuguese chestnut (*Castanea sativa* Miller) varieties. *Food Chem* 2007; 100:504-508.
62. Rocha Ribeiro S., Queiroz J., Lopes Ribeiro de Queiroz M., Campos F., Pinheiro Sant'Ana H. Antioxidant in Mango (*Mangifera indica* L.) Pulp. - *Plant Foods Hum Nutr (Qual Plant)* 2007; 62:13-17.
63. Kafkas E., Kosar M., Türemis N., Baser K. H. C. Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chem* 2006; 97:732-736.
64. Rodríguez-Comesaña M., García-Falcón M. S., Simal-Gándara J. Control of nutritional labels in beverages with added vitamins: screening of [beta]-carotene and ascorbic acid contents. *Food Chem* 2002; 79:141-144.
65. Chen Z., Chen B., Yao S. High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets. *Anal Chim Acta* 2006; 569:169-175.
66. Lopes P., Drinkine J., Saucier C., Glories Y. Determination of l-ascorbic acid in wines by direct injection liquid chromatography using a polymeric column. *Anal Chim Acta* 2006; 555:242-245.

67. Nawrocki J., Dunlap C., McCormick A., Carr P. W. Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *J Chromatogr A*; 1028:1-30.
68. Fontannaz P., Kiliç T., Heudi O. HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chem* 2006; 94:626-631.
69. Lykkesfeldt J. Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Biological Samples by High-Performance Liquid Chromatography Using Subtraction Methods: Reliable Reduction with Tris[2-carboxyethyl]phosphine Hydrochloride. *Anal Biochem* 2000; 282:89-93.
70. Muller L. D. Improved extraction methods for avoiding the interference of copper in the LC determination of ascorbic acid in multivitamin-mineral tablets. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 25:985-994.
71. Gibbons E., Allwood M. C., Neal T., Hardy G. Degradation of dehydroascorbic acid in parenteral nutrition mixtures. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 25(3-4):605-611.
72. Nishiyama I., Yamashita Y., Yamanaka M., Shimohashi A., Fukuda T., Oota T. Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other actinidia species. *J Agric Food Chem* 2004; 52:5472-5475.
73. Valente A., Albuquerque T. G., Sanches-Silva A., Costa H. S. Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases. *Food Res Int* 2011; 44:2237-2242.
74. Hemstrom P., Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci* 2006; 29:1784-1821.
75. Novakova L., Solichova D., Pavlovicova S., Solich P. Hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of ascorbic acid. *J Sep Sci* 2008; 31:1634-1644.
76. Tai A., Gohda E. Determination of ascorbic acid and its related compounds in foods and beverages by hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr B* 2007; 853:214-220.
77. Maldaner L., Jardim I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. 2009 [20-06-2011]; Available from:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000100036&nrm=iso.
78. Swartz M. E. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction. 2005 [20-06-2011]; Available from:
<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/data/articlestandard//lcgc/242005/164646/article.pdf>.
79. Romeu-Nadal M., Castellote A. I., López-Sabater M. C. Effect of cold storage on vitamins C and E and fatty acids in human milk. *Food Chem* 2008; 106:65-70.

80. Romeu-Nadal M., Castellote A. I., Gayà A., López-Sabater M. C. Effect of pasteurisation on ascorbic acid, dehydroascorbic acid, tocopherols and fatty acids in pooled mature human milk. *Food Chem* 2008; 107:434-438.
81. Zerdin K., Rooney M. L., Vermuë J. The vitamin C content of orange juice packed in an oxygen scavenger material. *Food Chem* 2003; 82:387-395.
82. Furusawa N. Rapid high-performance liquid chromatographic identification/quantification of total vitamin C in fruit drinks. *Food Control* 2001; 12:27-29.
83. Wechtersbach L., Cigic B. Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. *J Biochem Biophys Methods* 2007; 70:767-772.
84. Ihara H., Shino Y., Aoki Y., Hashizume N., Minegishi N. A simple and rapid method for the routine assay of total ascorbic acid in serum and plasma using ascorbate oxidase and o-phenylenediamine. *J Nutr Sci Vitaminol* 2000; 46:321-324.
85. Frenich A. G., Torres M. E., Vega A. B., Vidal J. L., Bolanos P. P. Determination of ascorbic acid and carotenoids in food commodities by liquid chromatography with mass spectrometry detection. *J Agric Food Chem* 2005; 53:7371-7376.
86. Klejdus B., Petrlová J., Potesil D., Adam V., Mikelová R., Vacek J., et al. Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection. *Anal Chim Acta* 2004; 520:57-67.
87. Müller L. D. Improved extraction methods for avoiding the interference of copper in the LC determination of ascorbic acid in multivitamin-mineral tablets. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 25:985-994.
88. Moon J. K., Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components. *J Agric Food Chem* 2009; 57:1655-1666.
89. Roginsky V., Lissi E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem* 2005; 92:235-254.
90. Huang D., Ou B., Prior R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53:1841-1856.
91. Prior R. L., Wu X., Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agric Food Chem* 2005; 53:4290-4302.
92. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 1999; 26:1231-1237.

93. Campos F. v. M., Ribeiro S. n. M. R., Della Lucia C. M., Pinheiro-Sant'Ana H. M., Stringheta P. C. Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. *Química Nova* 2009; 32:87-91.
94. Waters. HSS (High Strength Silica)Technology. [29-07-2011]; Available from: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134618105>.
95. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Resolução RE nº 899 de 29/05/2003.
96. Wikipédia: Dithiotreitol. [25-07-2011]; Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Dithiothreitol>.
97. Dhawan K., Dhawan S., Sharma A. Passiflora: a review update. *J Ethnopharmacol* 2004; 94:1-23.
98. Zeraik M. L., Pereira C. A. M., Zuin V. G., Yariwake J. H. Maracujá: um alimento funcional? *Rev Bras Farmacogn* 2010; 20:459-471.
99. Cruz R. M. S., Vieira M. C., Silva C. L. M. Effect of cold chain temperature abuses on the quality of frozen watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *J Food Eng* 2009; 94:90-97.
100. Gonçalves E. M., Cruz R. M. S., Abreu M., Brandão T. R. S., Silva C. L. M. Biochemical and colour changes of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) during freezing and frozen storage. *J Food Eng* 2009; 93:32-39.
101. Martínez-Sánchez A., Gil-Izquierdo A., Gil M. I., Ferreres F. A Comparative Study of Flavonoid Compounds, Vitamin C, and Antioxidant Properties of Baby Leaf Brassicaceae Species. *J Agric Food Chem* 2008; 56:2330-2340.
102. Pérez-López A. J., del Amor F. M., Serrano-Martínez A., Fortea M. I., Núñez-Delicado E. Influence of agricultural practices on the quality of sweet pepper fruits as affected by the maturity stage. *J Sci Food Agric* 2007; 87:2075-2080.
103. Zhang, Hamazu Y. Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow bell peppers. *J. Food Agric Environ* 2003; 2:22-27.
104. Andrade Cui M. J., Vicente A. R., Concellón A., Chaves A. R. Changes in red pepper antioxidants as affected by UV-C treatments and storage at chilling temperatures. *LWT-Food Sci Technol*; 44:1666-1671.
105. Martínez S., López M., González-Raurich M., Bernardo Alvarez A. The effects of ripening stage and processing systems on vitamin C content in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Int J Food Sci Nutr* 2005; 56:45-51.
106. Marín A., Ferreres F., Tomás-Barberán F. A., Gil M. I. Characterization and Quantitation of Antioxidant Constituents of Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Agric Food Chem* 2004; 52:3861-3869.

107. Gupta-Elera G., Garrett A. R., Martinez A., Robison R. A., O'Neill K. L. The antioxidant properties of the cherimoya (*Annona cherimola*) fruit. *Food Res Int* 2011; 44:2205-2209.
108. Barreca D., Laganà G., Ficarra S., Tellone E., Leuzzi U., Galtieri A., et al. Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). *Food Res Int* 2011; 44:2302-2310.
109. Pareek S., Yahia E. M., Pareek O. P., Kaushik R. A. Postharvest physiology and technology of *Annona* fruits. *Food Res Int* 2011; 44:1741-1751.
110. Amoo I. A., A.E. Emenike, V.O.E. Akpambang. Compositional evaluation of *Annona cherimoya* (Custard Apple) fruit. *Trends Applied Sci Res* 2008; 3:216-220.
111. Cardoso P. C., Tomazini A. P. B., Stringheta P. C., Ribeiro S. M. R., Pinheiro-Sant'Ana H. M. Vitamin C and carotenoids in organic and conventional fruits grown in Brazil. *Food Chem* 2010; 126:411-416.
112. Leong L. P., Shui G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem* 2002; 76:69-75.
113. Odriozola-Serrano I., Soliva-Fortuny R., Martín-Belloso O. Changes in bioactive composition of fresh-cut strawberries stored under superatmospheric oxygen, low-oxygen or passive atmospheres. *J Food Compos Anal* 2011; 23:37-43.
114. Gayosso-García Sancho L. E., Yahia E. M., Martínez-Télez M. A., González-Aguilar G. A. Effect of Maturity Stage of Papaya Maradol on Physiological and Biochemical Parameters. *Am. J Agric Biol Sci* 2010; 5:194-203.
115. Oliveira D. d. S., Aquino P. P., Ribeiro S. M. R., Proença R. P. d. C., Pinheiro-Sant'Ana H. M. Vitamin C, carotenoids, phenolic compounds and antioxidant activity of guava, mango and papaya from Ceasa of Minas Gerais State. *Acta Sci Health Sci* 2011; 33:89-98.
116. Gayosso-García Sancho L. E., Yahia E. M., González-Aguilar G. A. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. *Food Res Int* 2011; 44:1284-1291.
117. González-Molina E., Domínguez-Perles R., Moreno D. A., García-Viguera C. Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 51:327-345.
118. González-Molina E., Moreno D. A., García-Viguera C. Comparison of 'Verna' lemon juice quality for new ingredients and food products. *Sci Hortic* 2009; 120:353-359.
119. Vallejo F., Tomás-Barberán F. A., García-Viguera C. Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *J Sci Food Agric* 2002; 82:1293-1297.
120. Singh J., Upadhyay A. K., Prasad K., Bahadur A., Rai M. Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *J Food Compos Anal* 2007; 20:106-112.

121. Podsedek A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Sci Technol* 2007; 40:1-11.
122. Galgano F., Favati F., Caruso M., Pietrafesa A., Natella S. The Influence of Processing and Preservation on the Retention of Health-Promoting Compounds in Broccoli. *J Food Sci* 2007; 72:S130-S135.
123. Hussein A., Odumeru J. A., Ayanbadejo T., Faulkner H., McNab W. B., Hager H., et al. Effects of processing and packaging on vitamin C and [beta]-carotene content of ready-to-use (RTU) vegetables. *Food Res Int* 2000; 33:131-136.
124. Vallejo, Tomás B., García V. Glucosinolates and vitamin C content in edible parts of broccoli florets after domestic cooking. *Eur Food Res Technol* 2002; 215:310-316.
125. Lesková E., Kubíková J., Kováčiková E., Kosická M., Porubská J., Holčíková K. Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *J Food Compo Anal* 2006; 19:252-276.
126. Rickman J. C., Barrett D. M., Bruhn C. M. Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins C and B and phenolic compounds. *J Sci Food Agric* 2007; 87:930-944.
127. Zulueta A., Esteve M. J., Frígola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem* 2009; 114:310-316.
128. Prado A. Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo; 2009.
129. Almeida M. M. B., de Sousa P. H. M., Arriaga Â. M. C., do Prado G. M., Magalhães C. E. d. C., Maia G. A., et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Res Int* 2011; 44:2155-2159.
130. Nilsson J., Pillai D., Önning G., Persson C., Nilsson Å., Åkesson B. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazol-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing anti-oxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49:239-246.
131. Hunter K. J., Fletcher J. M. The antioxidant activity and composition of fresh, frozen, jarred and canned vegetables. *Innovative Food Sci Emerging Technol* 2002; 3:399-406.
132. Antonia Murcia M., Jiménez A. M., Martínez-Tomé M. Vegetables antioxidant losses during industrial processing and refrigerated storage. *Food Res Int* 2009; 42:1046-1052.
133. Gil M. I., Aguayo E., Kader A. A. Quality Changes and Nutrient Retention in Fresh-Cut versus Whole Fruits during Storage. *J Agric Food Chem* 2006; 54:4284-4296.
134. Kuskosi E. M., Asuero A. G., Troncoso A. M., Mancini-Filho J., Fett R. Aplicación de diversos Métodos Químicos para determinar Actividad Antioxidante en pulpa de frutos

135. Tiveron A. P. Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidas no Brasil. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo; 2010.
136. Tulipani S., Mezzetti B., Capocasa F., Bompadre S., Beekwilder J., de Vos C. H. R., et al. Antioxidants, Phenolic Compounds, and Nutritional Quality of Different Strawberry Genotypes. *J Agric Food Chem* 2008; 56:696-704.
137. Proteggente A. R., Pannala A. S., Paganga G., Buren L. v., Wagner E., Wiseman S., et al. The Antioxidant Activity of Regularly Consumed Fruit and Vegetables Reflects their Phenolic and Vitamin C Composition. *Free Radical Res* 2002; 36:217-233.
138. Gardner P. T., White T. A. C., McPhail D. B., Duthie G. G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem* 2000; 68:471-474.
139. Sikora E., Cieslik E., Leszczynska T., Filipiak-Florkiewicz A., Pisulewski P. M. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chem* 2008; 107:55-59.
140. Sun T., Powers J. R., Tang J. Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. *Food Chem* 2007; 105:101-106.
141. Navarro J. M., Flores P., Garrido C., Martinez V. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chem* 2006; 96:66-73.
142. Gil M. a. I., Aguayo E., Kader A. A. Quality Changes and Nutrient Retention in Fresh-Cut versus Whole Fruits during Storage. *J Agric Food Chem* 2006; 54:4284-4296.
143. Pérez-Jiménez J., Arranz S., Taberner M., Díaz- Rubio M. E., Serrano J., Goñi I., et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int* 2008; 41:274-285.
144. Huang D., Ou B., Prior R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*; 53:1841-1856.

ANEXOS

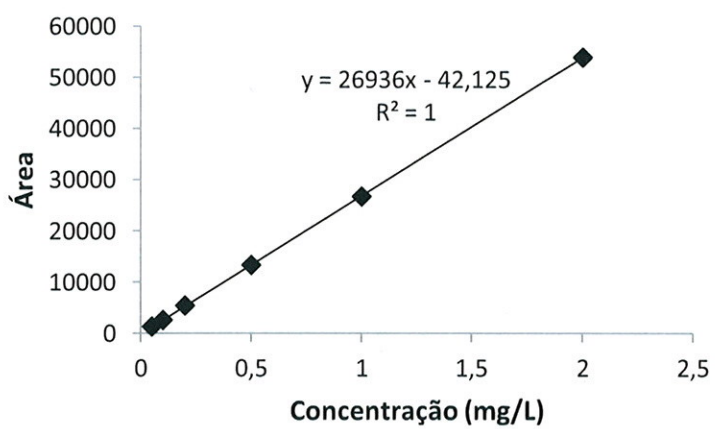
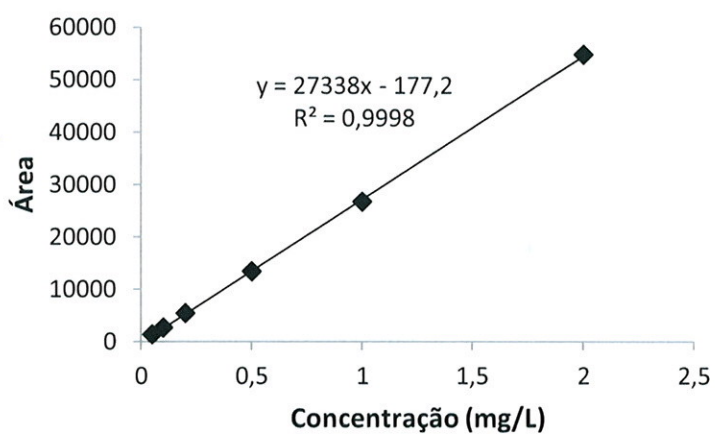
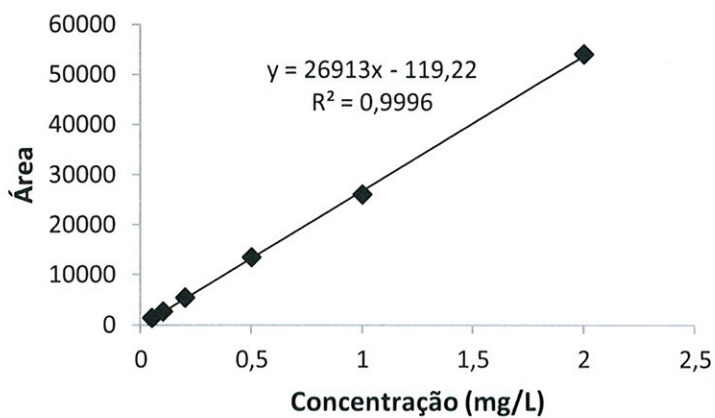


Figura 41 - Rectas calibração do L-AA (0,05 – 2 µg/mL).

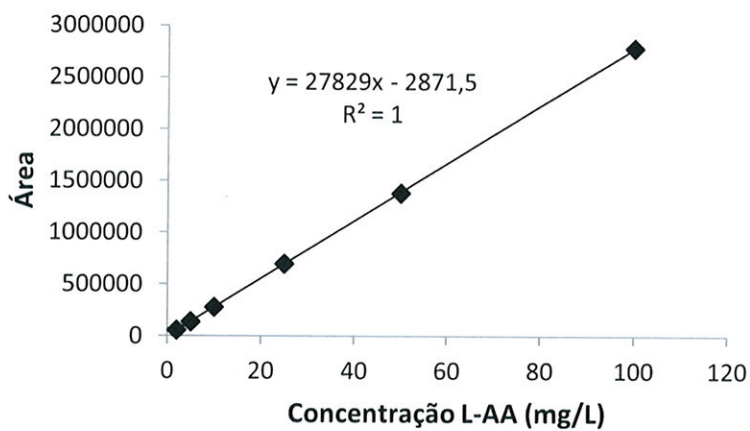
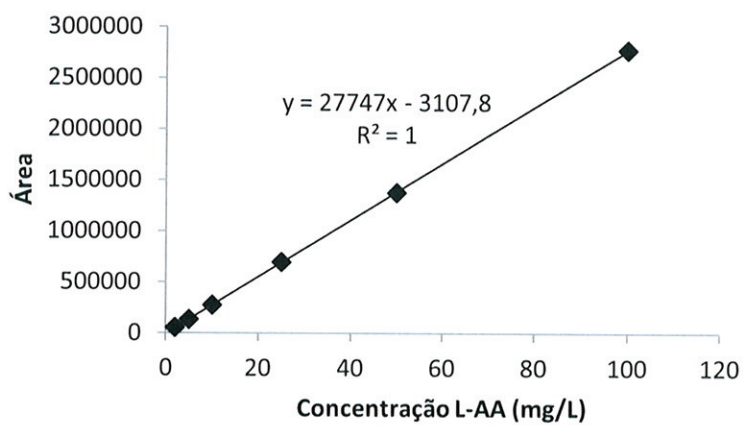
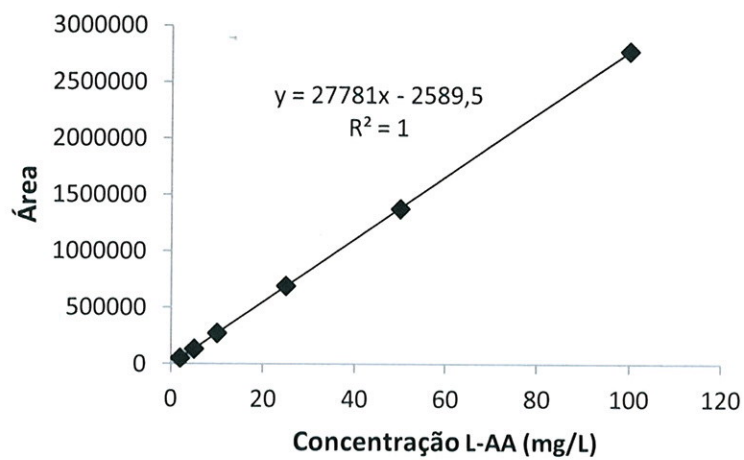


Figura 42 - Rectas de calibração do L-AA (2 – 100 µg/mL).

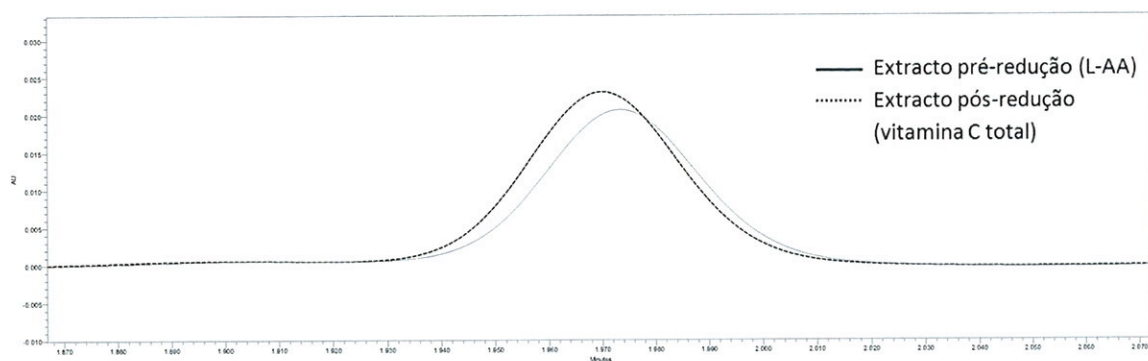


Figura 43 - Cromatogramas típicos do maracujá regional (diluição 1:20) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

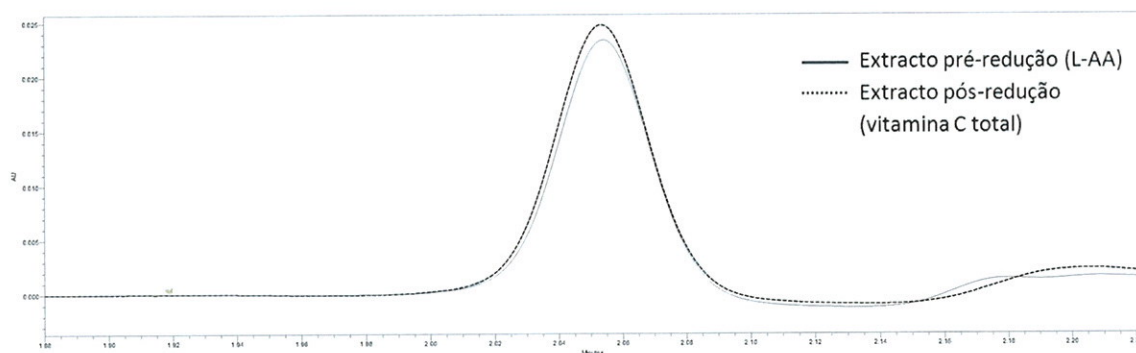


Figura 44 - Cromatogramas típicos do maracujá importado (diluição 1:20) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

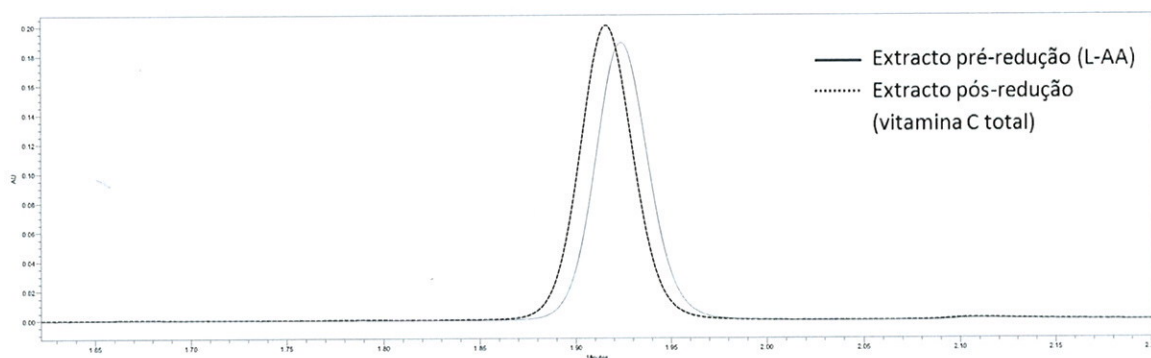


Figura 45 - Cromatogramas típicos da polpa de maracujá regional (diluição 1:20) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

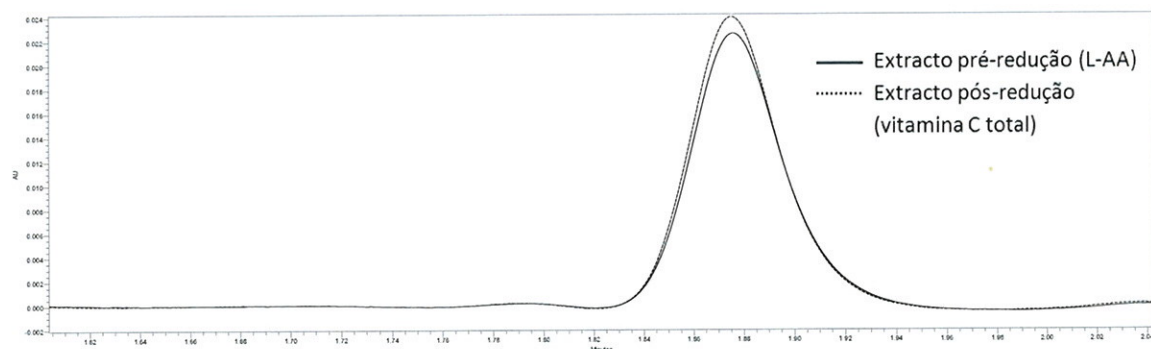


Figura 46 - Cromatogramas típicos do agrião (diluição 1:10) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

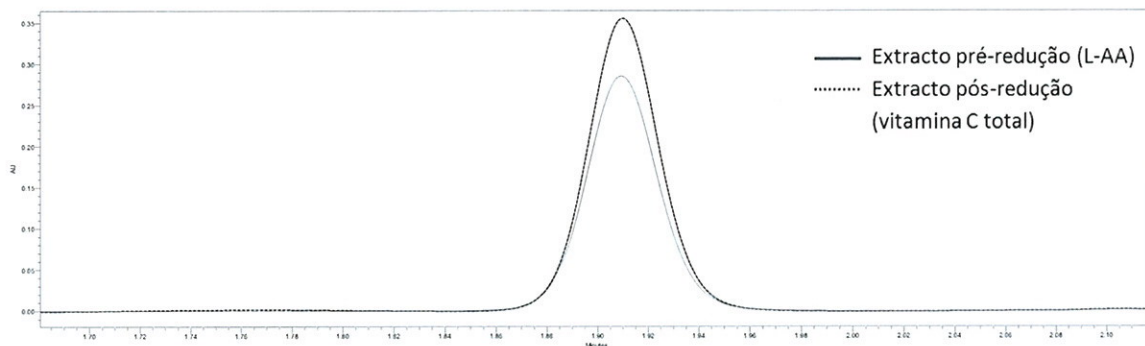


Figura 47 - Cromatogramas típicos dos pimentos verdes regionais (diluição 1:10) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

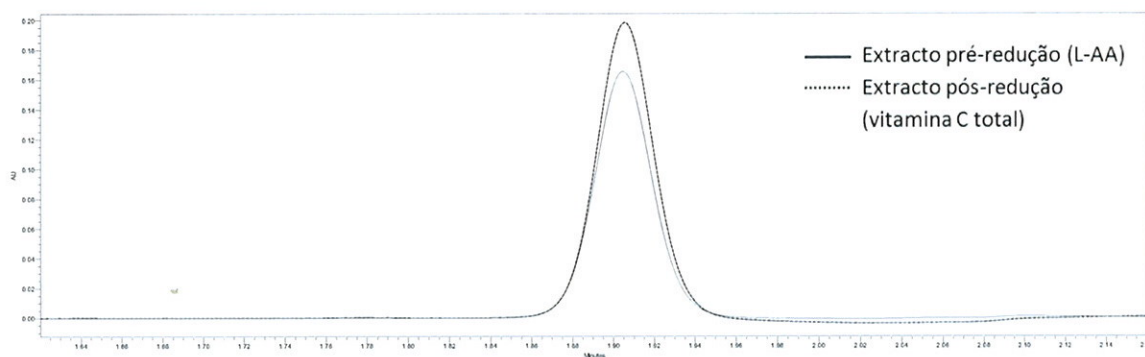


Figura 48 - Cromatogramas típicos dos pimentos verdes importados (diluição 1:10) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

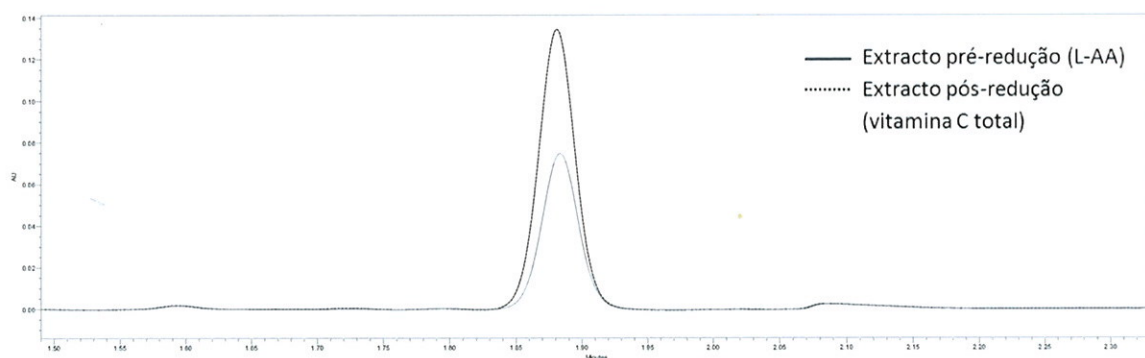


Figura 49 - Cromatogramas típicos das anonas regionais (diluição 1:10) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

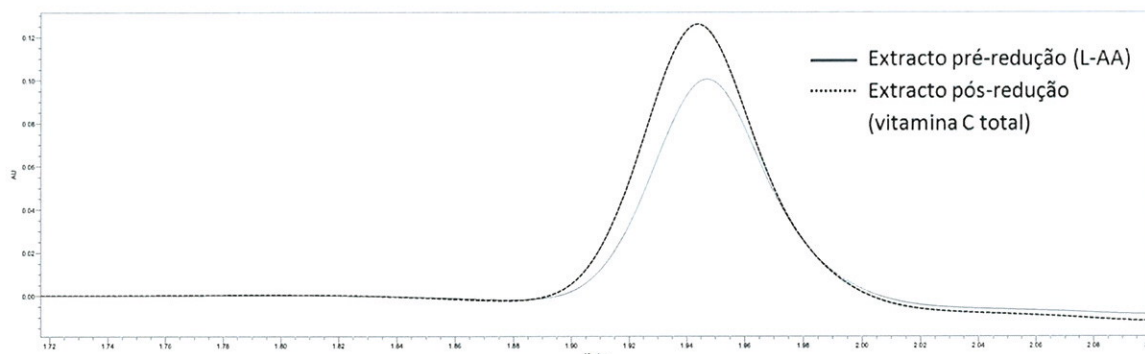


Figura 50 - Cromatogramas típicos dos morangos regionais (diluição 1:10) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

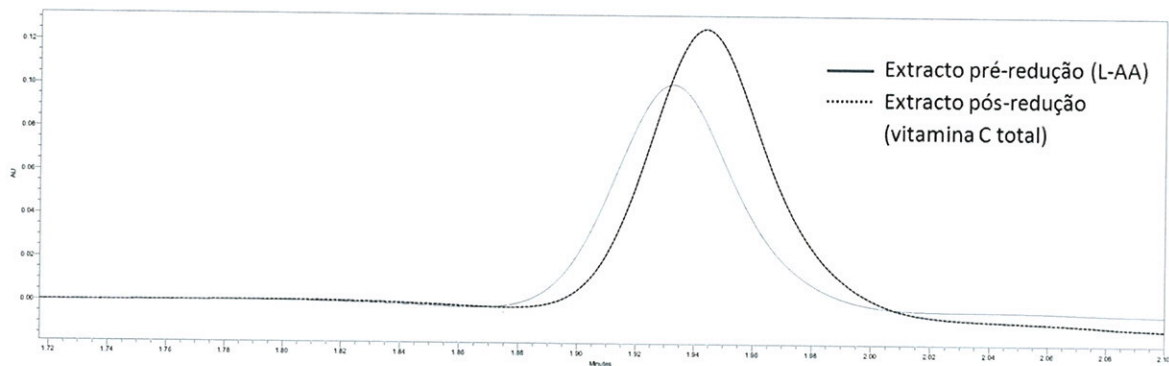


Figura 51 - Cromatogramas típicos dos morangos importados (diluição 1:10) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

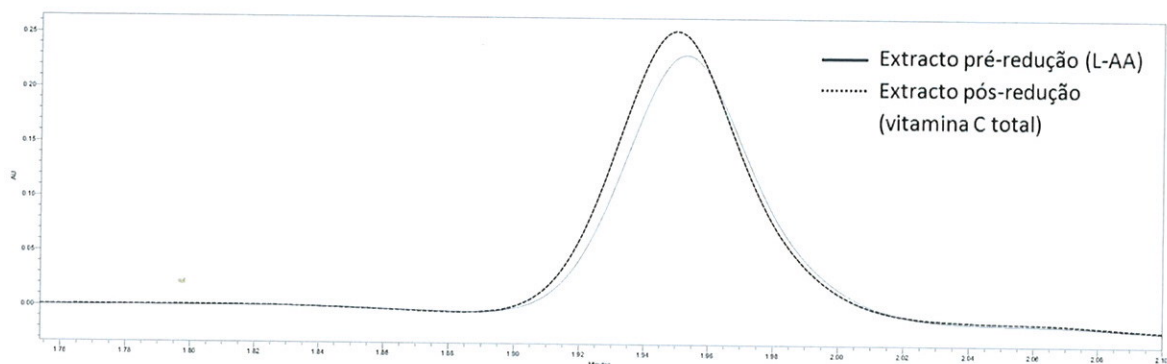


Figura 52 - Cromatogramas típicos das papaias regionais (diluição 1:10) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

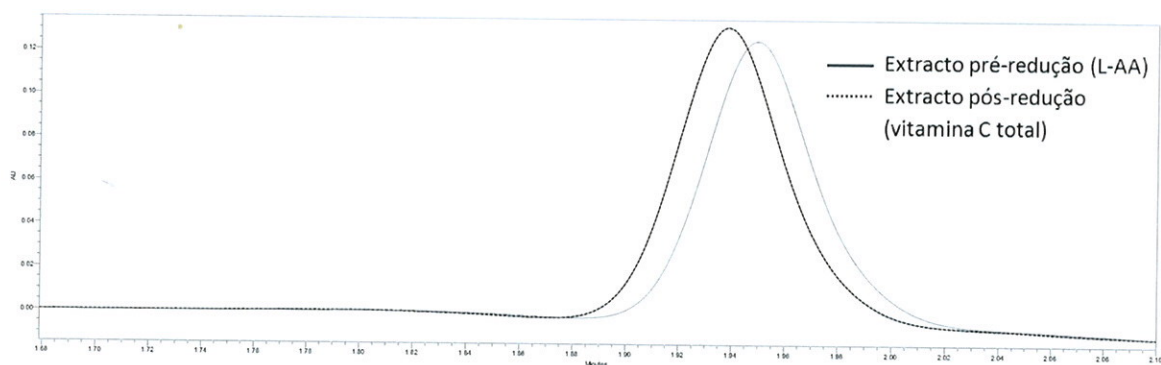


Figura 53 - Cromatograma típicos das papaias importadas (diluição 1:10) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

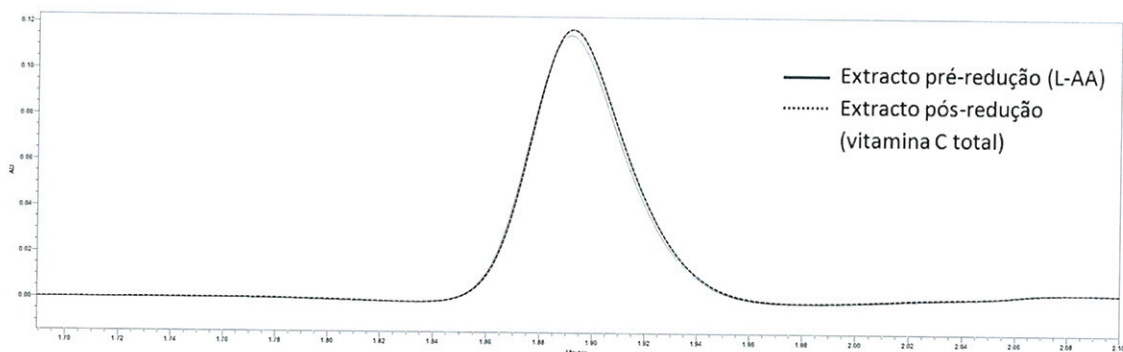


Figura 54 - Cromatogramas típicos dos limões regionais (diluição 1:10) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

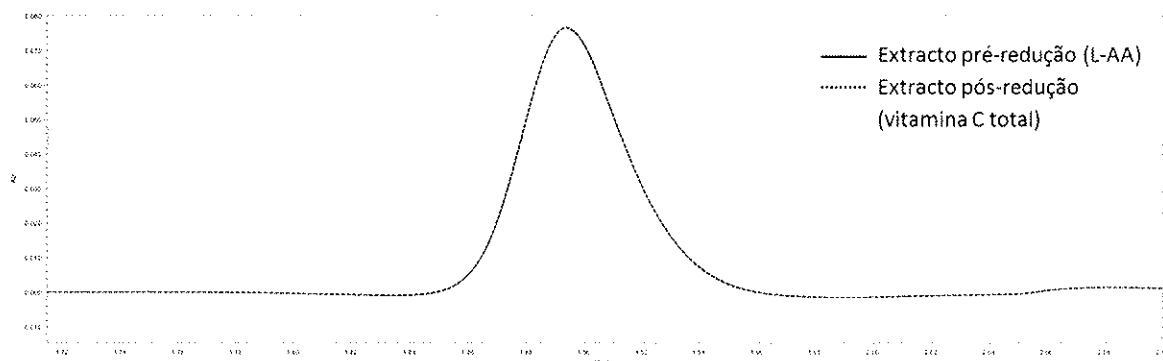


Figura 55 - Cromatogramas típicos dos limões importados (diluição 1:10) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

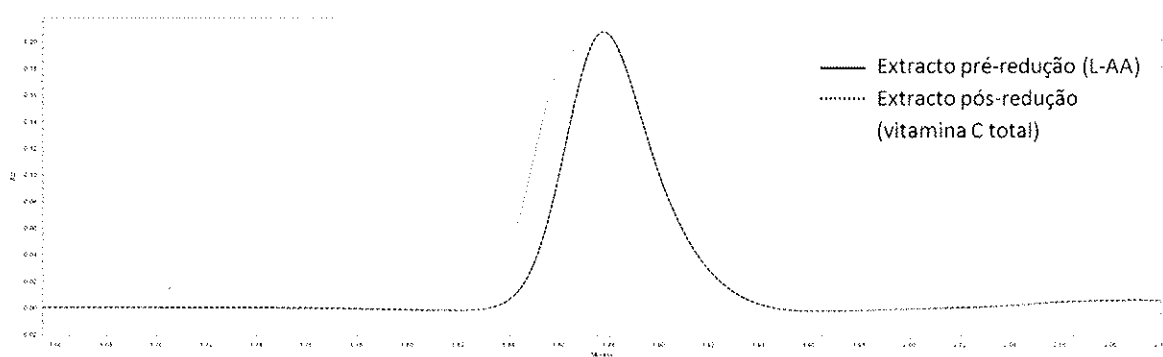


Figura 56 - Cromatogramas típicos dos brócolos regionais (diluição 1:10) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

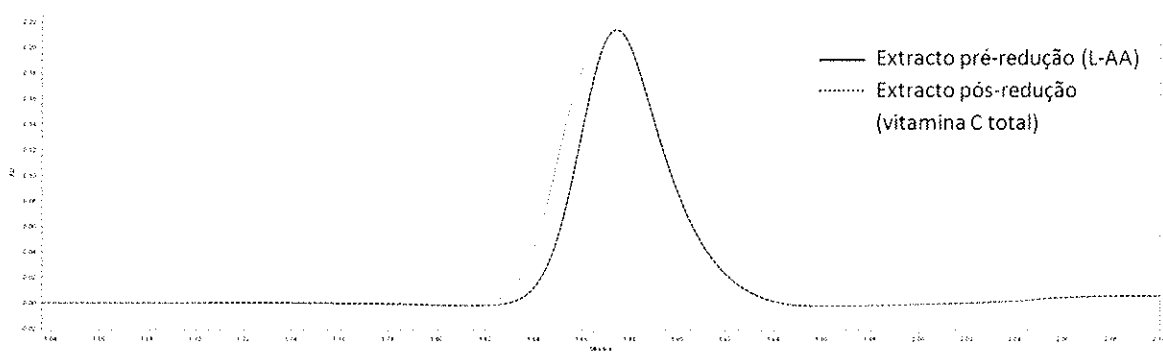


Figura 57 - Cromatogramas típicos dos brócolos importados (diluição 1:10) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

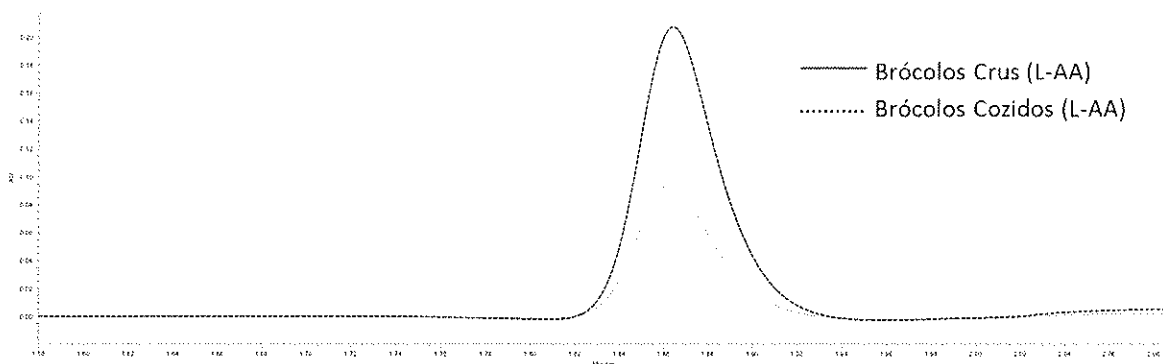


Figura 58 - Cromatogramas típicos dos brócolos crus e brócolos cozidos regionais (diluição 1:10) pré-redução com DTT (245 nm).

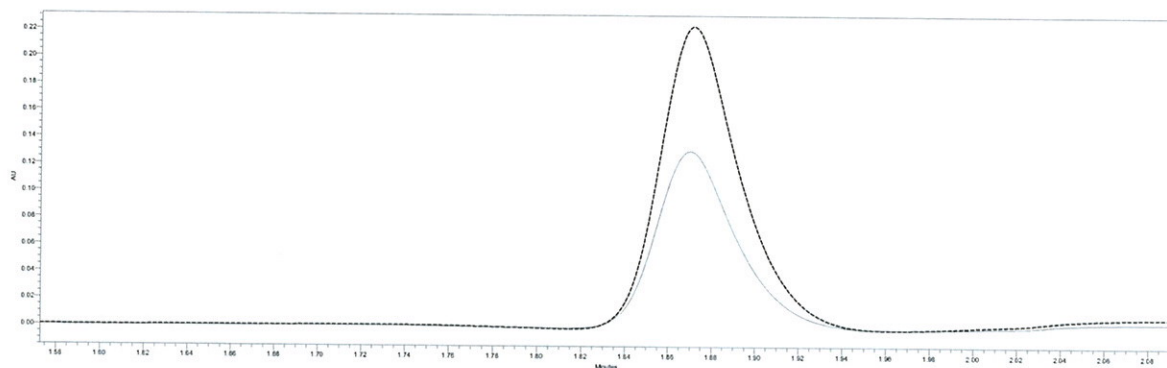


Figura 59 - Cromatogramas típicos dos brócolos crus e brócolos cozidos regionais (diluição 1:10) pós-redução (Vitamina C total) com DTT (245 nm).

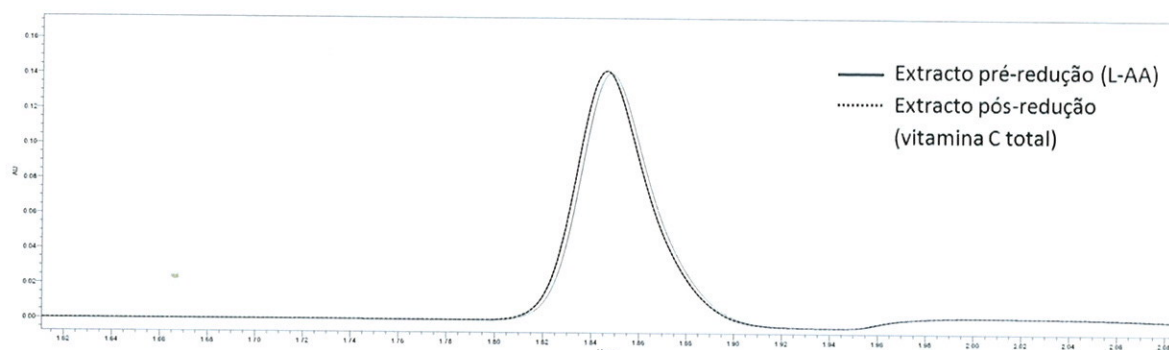


Figura 60 - Cromatogramas típicos da água de cozedura (1:2) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

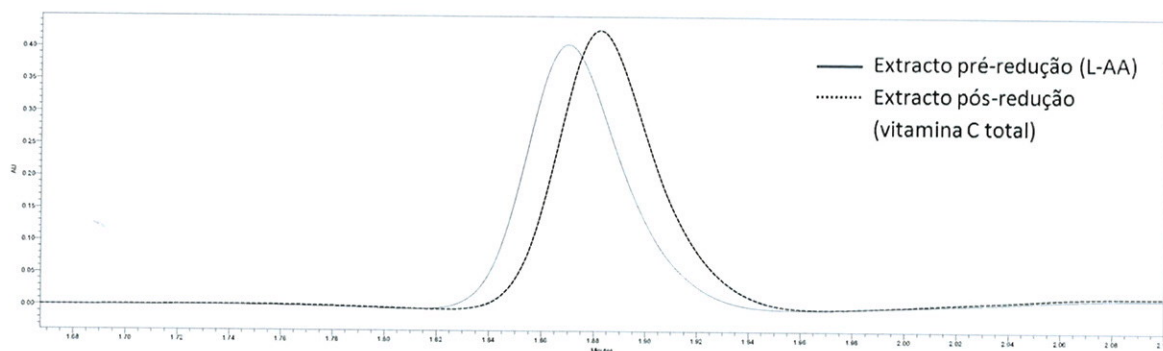


Figura 61 - Cromatogramas típicos dos pimentos vermelhos regionais (diluição 1:10) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

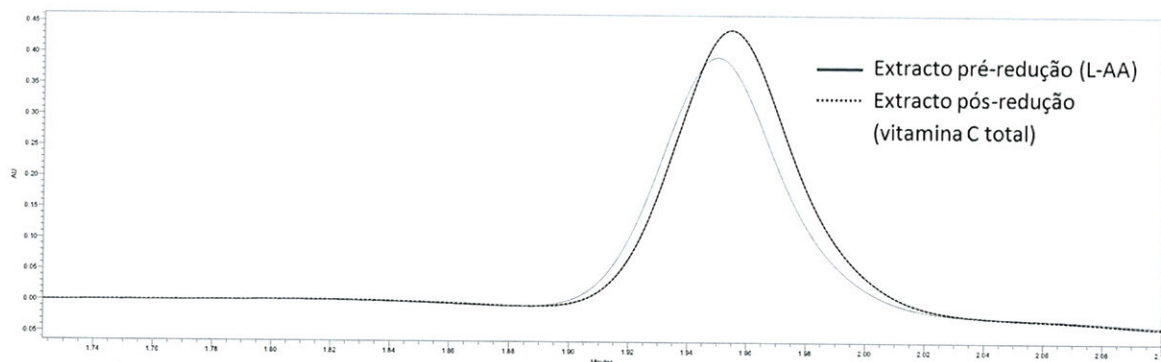


Figura 62 - Cromatogramas típicos dos pimentos vermelhos importados (diluição 1:10) pré e pós-redução com DTT (245 nm).

Tabela 21 - Teores de ácido L-ascórbico e vitamina C total na avaliação da recuperação do método UPLC-PDA.

Produto	Teor inicial de L-AA ^{a,b}	Teor encontrado de L-AA ^{a,b}		Teor inicial de Vitamina C total ^{a,b}	Teor encontrado de vitamina C total ^{a,b}	
		Nível I	Nível II		Nível I	Nível II
		10 (µg/mL)	50 (µg/mL)		10 (µg/mL)	50 (µg/mL)
Maracujá	1,82 ± 1,78	11,85 ± 2,05	53,67 ± 1,71	1,99 ± 3,16	13,26 ± 1,44	56,83 ± 1,65
Agrião	24,59 ± 1,52	34,42 ± 3,86	68,36 ± 2,29	25,68 ± 1,68	35,07 ± 2,07	78,65 ± 1,72
Pimentos Verdes	26,93 ± 1,83	37,15 ± 3,33	70,45 ± 180	27,56 ± 4,58	38,17 ± 1,05	79,10 ± 3,16
Anona	6,99 ± 2,12	16,56 ± 1,48	55,14 ± 1,43	8,32 ± 2,90	20,63 ± 0,63	67,81 ± 3,1
Morango	12,21 ± 1,99	22,58 ± 2,20	58,52 ± 1,64	12,86 ± 1,07	23,77 ± 1,43	61,55 ± 2,68
Papaia	25,85 ± 2,57	35,45 ± 1,96	73,55 ± 4,24	27,75 ± 2,13	38,46 ± 1,93	78,48 ± 4,12
Limão	4,20 ± 0,76	13,54 ± 3,21	46,43 ± 1,54	4,29 ± 3,60	13,80 ± 1,41	47,99 ± 2,19
Brócolos	21,14 ± 1,71	30,77 ± 1,18	68,84 ± 1,65	22,43 ± 3,27	33,03 ± 2,44	73,74 ± 3,23
Pimentos Vermelhos	50,99 ± 1,89	61,09 ± 5,15	100,56 ± 2,31	53,31 ± 1,81	63,89 ± 1,74	105,34 ± 2,72

^amg/100 g produto.

^bmédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

Tabela 22 - Estabilidade do ácido L-ascórbico no extracto de maracujá regional, maracujá importado e solução padrão, armazenados à temperatura ambiente, durante 5 horas (R: Recuperação).

Tempo de armazenamento (minutos)	Maracujá Regional		Maracujá Importado		Padrão	
	L-AA ^{a,b}	R (%)	L-AA ^{a,b}	R (%)	L-AA ^{a,b}	R (%)
0	27,16 ± 1,52	100,00	24,14 ± 1,80	100,00	42,34	100,00
60	26,86 ± 1,24	98,90	23,89 ± 1,36	98,97	42,09	99,41
120	26,71 ± 1,44	98,34	23,79 ± 1,98	98,57	41,88	98,91
180	26,60 ± 0,72	97,92	23,71 ± 1,55	98,25	41,65	98,37
240	26,38 ± 1,08	97,13	23,44 ± 1,68	97,12	41,46	97,92
300	26,05 ± 1,56	95,91	23,19 ± 1,12	96,08	41,22	97,35

^aácido L-ascórbico (mg/100g produto).

^bmédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

Tabela 23 - Estabilidade do ácido L-ascórbico nos extractos de maracujá regional, maracujá importado e solução padrão, armazenados a 4°C, durante 2 meses (R: recuperação).

Tempo de armazenamento (dias)	Maracujá Regional		Maracujá Importado		Padrão	
	L-AA ^{a,b}	R (%)	L-AA ^{a,b}	R (%)	L-AA ^{a,b}	R (%)
0	27,16 ± 1,52	100,00	24,14 ± 1,80	100,00	49,48 ± 2,96	100,00
1	26,97 ± 1,30	99,30	23,98 ± 1,26	99,33	49,32 ± 3,13	99,68
4	26,78 ± 1,63	98,62	23,93 ± 1,31	99,11	49,12 ± 3,22	99,27
7	25,93 ± 1,31	95,47	23,21 ± 1,51	96,13	48,42 ± 1,81	97,84
11	25,60 ± 1,66	94,28	22,97 ± 1,36	95,15	47,19 ± 2,62	95,36
15	25,25 ± 1,50	92,98	22,60 ± 1,27	93,61	46,76 ± 1,71	94,49
21	24,69 ± 1,45	90,93	21,70 ± 1,36	89,90	45,42 ± 1,70	91,78
30	21,86 ± 1,42	80,50	20,02 ± 1,75	82,93	43,97 ± 2,14	88,85
37	20,60 ± 1,32	75,85	19,65 ± 1,39	81,38	41,09 ± 2,16	83,03
44	18,54 ± 1,50	68,26	18,63 ± 1,39	77,18	39,22 ± 2,62	79,26
51	17,11 ± 1,50	63,02	16,39 ± 1,26	67,89	36,69 ± 2,62	74,15
60	16,16 ± 1,67	59,51	14,63 ± 1,18	60,60	33,01 ± 1,97	66,71

^amg/100 g produto.

^bmédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

Tabela 24 - Estabilidade do ácido L-ascórbico nos extractos de maracujá regional, maracujá importado e solução padrão, armazenados a -20°C, durante 2 meses (R: recuperação).

Tempo de armazenamento (dias)	Maracujá Regional		Maracujá Importado		Padrão	
	L-AA ^{a,b}	R (%)	L-AA ^{a,b}	R (%)	L-AA ^{a,b}	R (%)
0	27,16 ± 1,52	100,00	24,14 ± 1,80	100,00	49,48 ± 0,35	100,00
4	26,81 ± 1,53	98,73	23,52 ± 1,26	97,42	48,93 ± 3,07	98,88
7	26,32 ± 2,57	96,92	23,49 ± 2,73	97,28	48,59 ± 1,32	98,19
11	26,13 ± 1,32	96,21	23,18 ± 1,47	96,03	48,06 ± 1,98	97,13
15	26,06 ± 1,39	95,96	23,00 ± 1,55	95,26	47,71 ± 1,56	96,42
21	25,26 ± 2,57	93,02	22,42 ± 2,62	92,88	47,20 ± 1,61	95,38
30	24,86 ± 1,31	91,55	22,33 ± 1,27	92,48	46,52 ± 1,27	94,01
37	24,46 ± 1,65	90,05	21,81 ± 1,28	90,34	45,42 ± 1,54	91,78
44	23,98 ± 1,31	88,31	21,61 ± 2,74	89,50	44,09 ± 2,31	89,10
51	22,89 ± 2,35	84,27	20,33 ± 1,09	84,23	43,37 ± 1,33	87,64
60	21,40 ± 1,34	78,79	19,39 ± 1,27	80,32	42,05 ± 1,46	84,97

^amg/100 g produto.

^bmédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

Tabela 25 - Estabilidade do ácido L-ascórbico nos extractos de agrião regional e solução padrão, armazenados a -80°C, durante 2 meses (R: recuperação).

Tempo de armazenamento (dias)	Agrião		Padrão	
	L-AA ^{a,b}	R (%)	L-AA ^{a,b}	R (%)
0	63,43 ± 1,63	100,00	49,48	100,00
4	63,17 ± 2,58	99,59	49,34	99,70
7	63,10 ± 1,72	99,48	49,32	99,67
11	63,00 ± 1,85	99,33	49,21	99,45
15	62,85 ± 1,59	99,09	49,14	99,30
21	62,53 ± 0,75	98,58	48,98	98,99
30	62,41 ± 1,08	98,39	48,89	98,80
37	61,95 ± 1,11	97,67	48,66	98,32
44	61,68 ± 1,05	97,24	48,55	98,11
51	61,26 ± 1,89	96,59	48,34	97,69
60	61,12 ± 1,63	96,36	47,94	96,89

^amg/100 g produto.

^bmédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

Tabela 26- Teores do ácido L-ascórbico, Vitamina C total e ácido desidroascórbico dos maracujás regionais, determinados pelo método UPLC-PDA.

Tempo de armazenamento (dias)	Ácido L-ascórbico (mg/100g produto) ^a	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Ácido desidroascórbico (mg/100g produto) ^a
1	31,76 ± 1,71	33,97 ± 1,63	2,21 ± 1,75
3	27,16 ± 1,52	29,7 ± 1,51	2,54 ± 1,38
7	23,89 ± 2,30	27,65 ± 2,4	3,76 ± 0,52
10	20,52 ± 1,92	24,68 ± 1,89	4,16 ± 1,50
15	17,27 ± 1,65	23,09 ± 1,64	5,82 ± 1,43
Média ^b	24,12 ± 5,65	27,82 ± 4,29	3,70 ± 1,44

^amédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

^bmédia dos 5 dias de análise (n=5) ± desvio-padrão.

Tabela 27 - Teores do ácido L-ascórbico, Vitamina C total e ácido desidroascórbico do maracujá importado, determinados pelo método UPLC-PDA.

Tempo de armazenamento (dias)	Ácido L-ascórbico (mg/100g produto) ^a	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Ácido desidroascórbico (mg/100g produto) ^a
1	27,78 ± 2,29	30,53 ± 2,40	2,75 ± 1,24
3	24,14 ± 1,80	27,23 ± 1,35	3,09 ± 1,65
7	22,94 ± 1,78	26,72 ± 1,48	3,78 ± 1,38
10	19,74 ± 1,27	24,88 ± 1,25	5,14 ± 1,54
15	15,49 ± 1,28	21,38 ± 1,35	5,89 ± 0,53
Média ^b	22,02 ± 4,65	26,15 ± 3,36	4,13 ± 1,34

^amédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

^bmédia dos 5 dias de análise (n=5) ± desvio-padrão.

Tabela 28 - Teores do ácido L-ascórbico, Vitamina C total e ácido desidroascórbico do agrião regional, determinados pelo método UPLC-PDA.

Tempo de armazenamento (dias)	Ácido L-ascórbico (mg/100g produto) ^a	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Ácido desidroascórbico (mg/100g produto) ^a
1	63,16 ± 1,63	66,40 ± 2,96	3,24 ± 0,84
2	60,93 ± 1,72	67,0 ± 2,31	6,07 ± 1,83
3	58,19 ± 1,53	66,31 ± 1,43	8,12 ± 1,72
4	55,26 ± 1,11	64,63 ± 1,34	9,37 ± 2,66
5	49,59 ± 2,62	62,68 ± 1,52	13,09 ± 3,75
Média ^b	57,43 ± 5,29	65,40 ± 1,76	7,98 ± 3,68

^amédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

^bmédia das 5 análises (n=5) ± desvio-padrão.

Tabela 29 - Teores do ácido L-ascórbico, Vitamina C total e ácido desidroascórbico dos pimentos verdes regionais, determinados pelo método UPLC-PDA.

Tempo de armazenamento (dias)	Ácido L-ascórbico (mg/100g produto) ^a	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Ácido desidroascórbico (mg/100g produto) ^a
1	119,91 ± 13,13	124,52 ± 13,1	4,61 ± 1,83
2	114,21 ± 8,24	122,16 ± 9,1	7,95 ± 2,52
3	100,35 ± 1,46	115,32 ± 1,51	14,97 ± 2,56
4	96,92 ± 1,077	112,35 ± 1,68	15,43 ± 4,58
5	89,91 ± 3,16	110,48 ± 3,21	20,57 ± 1,61
Média ^b	104,26 ± 12,44	116,97 ± 6,13	12,71 ± 6,34

^amédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

^bmédia das 5 análises (n=5) ± desvio-padrão.

Tabela 30 - Teores do ácido L-ascórbico, Vitamina C total e ácido desidroascórbico dos pimentos verdes importados, determinados pelo método UPLC-PDA.

Tempo de armazenamento (dias)	Ácido L-ascórbico (mg/100g produto) ^a	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Ácido desidroascórbico (mg/100g produto) ^a
1	122,43 ± 10,6	127,71 ± 9,80	5,28 ± 1,04
2	119,76 ± 7,92	129,28 ± 8,44	9,52 ± 3,09
3	105,91 ± 9,46	120,63 ± 5,60	14,72 ± 3,65
4	99,03 ± 1,07	118,74 ± 7,63	19,71 ± 2,90
5	89,85 ± 11,74	113,68 ± 2,13	23,83 ± 4,37
Média ^b	107,40 ± 13,77	122,01 ± 6,46	14,61 ± 7,48

^amédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

^bmédia das 5 análises (n=5) ± desvio-padrão.

Tabela 31 - Teores do ácido L-ascórbico, Vitamina C total e ácido desidroascórbico da anona regional, determinados pelo método UPLC-PDA.

Tempo de armazenamento (dias)	Ácido L-ascórbico (mg/100g produto) ^a	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Ácido desidroascórbico (mg/100g produto) ^a
1	21,00 ± 1,83	25,43 ± 1,73	4,43 ± 1,96
2	19,44 ± 3,78	24,67 ± 1,83	5,23 ± 3,27
3	16,96 ± 1,32	23,97 ± 1,51	7,01 ± 4,37
4	13,73 ± 1,82	22,92 ± 1,57	9,19 ± 1,04
5	8,94 ± 2,01	16,45 ± 1,81	7,51 ± 2,12
Média ^b	16,01 ± 4,82	22,69 ± 3,61	6,67 ± 1,89

^amédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

^bmédia das 5 análises (n=5) ± desvio-padrão.

Tabela 32 - Teores do ácido L-ascórbico, Vitamina C total e ácido desidroascórbico dos morangos regionais, determinados pelo método UPLC-PDA.

Tempo de armazenamento (dias)	Ácido L-ascórbico (mg/100g produto) ^a	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Ácido desidroascórbico (mg/100g produto) ^a
1	70,80 ± 1,70	73,84 ± 2,94	3,04 ± 1,72
2	67,02 ± 1,43	70,31 ± 4,12	3,29 ± 1,57
3	65,12 ± 2,63	69,51 ± 1,26	4,39 ± 2,61
4	63,02 ± 1,78	68,72 ± 1,55	5,7 ± 1,32
5	59,04 ± 3,83	67,34 ± 3,71	8,3 ± 0,76
Média ^b	65,00 ± 4,39	69,94 ± 2,44	4,94 ± 2,15

^amédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

^bmédia das 5 análises (n=5) ± desvio-padrão.

Tabela 33 - Teores do ácido L-ascórbico, Vitamina C total e ácido desidroascórbico dos morangos importados, determinados pelo método UPLC-PDA.

Tempo de armazenamento (dias)	Ácido L-ascórbico (mg/100g produto) ^a	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Ácido desidroascórbico (mg/100g produto) ^a
1	53,54 ± 4,33	56,02 ± 1,44	2,48 ± 0,63
2	50,55 ± 3,32	53,73 ± 2,68	3,18 ± 1,12
3	48,62 ± 2,65	51,99 ± 2,24	3,37 ± 0,50
4	46,82 ± 1,65	50,76 ± 2,50	3,94 ± 0,74
5	44,89 ± 4,06	51,71 ± 1,90	6,82 ± 1,05
Média ^b	48,88 ± 3,34	52,84 ± 2,07	3,96 ± 1,68

^amédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

^bmédia das 5 análises (n=5) ± desvio-padrão.

Tabela 34 - Teores do ácido L-ascórbico, Vitamina C total e ácido desidroascórbico das papaias regionais, determinados pelo método UPLC-PDA.

Tempo de armazenamento (dias)	Ácido L-ascórbico (mg/100g produto) ^a	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Ácido desidroascórbico (mg/100g produto) ^a
1	118,86 ± 13,47	123,35 ± 10,52	4,49 ± 1,43
2	114,96 ± 10,76	120,79 ± 10,80	5,83 ± 0,43
3	107,6 ± 11,07	117,72 ± 8,76	10,12 ± 1,93
4	97,1 ± 5,57	112,26 ± 3,79	15,16 ± 2,22
5	82,45 ± 11,35	99,34 ± 6,61	16,89 ± 4,12
Média ^b	104,19 ± 14,71	114,69 ± 9,53	10,50 ± 5,50

^amédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

^bmédia das 5 análises (n=5) ± desvio-padrão.

Tabela 35 - Teores do ácido L-ascórbico, Vitamina C total e ácido desidroascórbico das papaias importadas, determinados pelo método UPLC-PDA.

Tempo de armazenamento (dias)	Ácido L-ascórbico (mg/100g produto) ^a	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Ácido desidroascórbico (mg/100g produto) ^a
1	95,87 ± 5,45	99,82 ± 7,00	3,95 ± 1,43
2	92,55 ± 10,96	97,78 ± 11,17	5,23 ± 0,60
3	88,29 ± 9,64	96,26 ± 11,24	7,97 ± 1,41
4	80,29 ± 8,47	94,69 ± 7,31	14,4 ± 2,44
5	65,12 ± 10,74	80,33 ± 4,92	15,21 ± 2,90
Média ^b	84,42 ± 12,27	93,78 ± 7,76	9,35 ± 5,19

^amédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

^bmédia das 5 análises (n=5) ± desvio-padrão.

Tabela 36 - Tabela 29 – Teores do ácido L-ascórbico, Vitamina C total e ácido desidroascórbico dos limões regionais, determinados pelo método UPLC-PDA.

Tempo de armazenamento (dias)	Ácido L-ascórbico (mg/100g produto) ^a	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Ácido desidroascórbico (mg/100g produto) ^a
1	52,07 ± 2,39	52,77 ± 2,11	0,7 ± 0,16
2	51,70 ± 1,12	52,51 ± 10,50	0,81 ± 0,28
3	49,96 ± 1,31	51,10 ± 2,90	1,14 ± 0,17
4	47,63 ± 2,83	49,17 ± 2,75	1,54 ± 0,71
5	45,58 ± 1,99	48,16 ± 1,74	2,58 ± 0,86
Média ^b	49,39 ± 2,76	50,74 ± 2,03	1,35 ± 0,76

^amédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

^bmédia das 5 análises (n=5) ± desvio-padrão.

Tabela 37 - Teores do ácido L-ascórbico, Vitamina C total e ácido desidroascórbico dos limões importados, determinados pelo método UPLC-PDA.

Tempo de armazenamento (dias)	Ácido L-ascórbico (mg/100g produto) ^a	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Ácido desidroascórbico (mg/100g produto) ^a
1	55,97 ± 2,22	57,14 ± 3,55	1,17 ± 0,88
2	54,92 ± 2,97	56,00 ± 1,75	1,08 ± 0,31
3	52,92 ± 1,56	55,19 ± 1,03	2,27 ± 1,40
4	50,24 ± 1,79	53,26 ± 1,61	3,02 ± 1,84
5	48,19 ± 1,89	51,30 ± 2,72	3,11 ± 2,72
Média ^b	52,45 ± 3,23	54,58 ± 2,32	2,13 ± 0,97

^amédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

^bmédia das 5 análises (n=5) ± desvio-padrão.

Tabela 38 - Teores do ácido L-ascórbico, Vitamina C total e ácido desidroascórbico dos brócolos regionais, determinados pelo método UPLC-PDA.

Tempo de armazenamento (dias)	Ácido L-ascórbico (mg/100g produto) ^a	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Ácido desidroascórbico (mg/100g produto) ^a
1	72,38 ± 9,68	76,37 ± 10,38	3,99 ± 0,69
2	70,41 ± 10,33	76,14 ± 10,34	5,73 ± 1,30
3	66,67 ± 11,29	75,00 ± 6,11	8,33 ± 1,71
4	64 ± 8,41	74,17 ± 6,54	10,17 ± 2,65
5	58,17 ± 7,61	71,16 ± 5,90	12,99 ± 3,53
Média ^b	66,33 ± 5,60	74,57 ± 2,10	8,24 ± 3,56

^amédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

^bmédia das 5 análises (n=5) ± desvio-padrão.

Tabela 39 - Teores do ácido L-ascórbico, Vitamina C total e ácido desidroascórbico dos brócolos importados, determinados pelo método UPLC-PDA.

Tempo de armazenamento (dias)	Ácido L-ascórbico (mg/100g produto) ^a	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Ácido desidroascórbico (mg/100g produto) ^a
1	77,61 ± 5,07	82,4 ± 4,53	4,79 ± 1,64
2	75,13 ± 11,81	81,76 ± 10,58	6,63 ± 1,80
3	72,69 ± 7,91	80,89 ± 7,50	8,2 ± 1,56
4	68,09 ± 8,40	79,56 ± 6,60	11,47 ± 2,73
5	61,86 ± 9,40	76,50 ± 8,12	14,64 ± 2,20
Média ^b	71,08 ± 6,24	80,22 ± 2,34	9,15 ± 3,93

^amédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

^bmédia das 5 análises (n=5) ± desvio-padrão.

Tabela 40 - Teores do ácido L-ascórbico, Vitamina C total e ácido desidroascórbico dos pimentos vermelhos regionais, determinados pelo método UPLC-PDA.

Tempo de armazenamento (dias)	Ácido L-ascórbico (mg/100g produto) ^a	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Ácido desidroascórbico (mg/100g produto) ^a
1	214,79 ± 13,24	221,76 ± 12,30	6,97 ± 1,76
2	203,49 ± 12,45	217,02 ± 11,60	13,53 ± 6,25
3	190,54 ± 21,05	216,47 ± 14,28	25,93 ± 3,15
4	179,02 ± 10,82	208,95 ± 14,55	29,93 ± 9,64
5	161,15 ± 11,36	196,1 ± 10,25	34,95 ± 5,26
Média ^b	189,80 ± 20,91	212,06 ± 10,03	22,26 ± 11,65

^amédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

^bmédia das 5 análises (n=5) ± desvio-padrão.

Tabela 41 - Teores do ácido L-ascórbico, Vitamina C total e ácido desidroascórbico dos pimentos vermelhos importados, determinados pelo método UPLC-PDA.

Tempo de armazenamento (dias)	Ácido L-ascórbico (mg/100g produto) ^a	Vitamina C total (mg/100g produto) ^a	Ácido desidroascórbico (mg/100g produto) ^a
1	223,65 ± 16,51	231,8 ± 11,23	8,15 ± 1,25
2	210,76 ± 10,88	229,46 ± 11,06	18,7 ± 6,76
3	195,4 ± 12,70	225,89 ± 14,28	30,49 ± 13,15
4	184,9 ± 13,68	218,62 ± 14,05	33,72 ± 8,96
5	166,83 ± 11,71	204,9 ± 12,05	38,07 ± 6,88
Média ^b	196,31 ± 22,11	222,13 ± 10,85	25,83 ± 12,22

^amédia das 3 replicatas (n=3) ± desvio-padrão.

^bmédia das 5 análises (n=5) ± desvio-padrão.

Tabela 42 - Dados da titulação iodométrica.

Amostra	Massa polpa ^a	Perdas ^b (g)	Massa Final (g)	Massa Ensaio (g) ^c	Volume titulante médio (mL) ^d
Maracujá Regional	72,19	7,92	64,27	21,42	8,23 ± 0,06
Maracujá Importado	70,25	6,11	64,14	21,38	7,33 ± 0,15
Polpa Maracujá	64,30	3,79	60,51	20,17	2,30 ± 0,10
Agrião	55,02	6,66	48,36	16,12	7,87 ± 0,06
P. Verde Regional	30,67	10,27	20,40	6,80	7,53 ± 0,06
P. Verde Importado	33,94	12,19	21,75	7,25	9,13 ± 0,06
Anona	83,84	13,56	70,28	23,43	4,83 ± 0,10
Morango Regional	50,62	17,79	32,83	10,94	8,60 ± 0,06
Morango Importado	49,93	18,22	31,71	10,57	6,13 ± 0,01
Papaia Regional	19,11	8,66	10,45	3,48	4,80 ± 0,1
Papaia Importada	22,68	9,54	13,14	4,38	4,80 ± 0,06
Limão Regional	52,54	6,25	46,29	15,43	8,67 ± 0,26
Limão Importado	48,57	7,94	40,63	13,54	7,90 ± 0,06
Brócolos Regionais	34,02	7,68	26,34	8,78	6,43 ± 0,06
Brócolos Importados	30,05	9,36	20,69	6,90	5,60 ± 0,1
P. Vermelho Regional	28,41	12,93	15,48	5,16	11,30 ± 0,1
P. Vermelho Importado	29,54	11,12	18,42	6,14	13,63 ± 0,12

^a a massa da polpa foi escolhida de acordo com os valores médio de ácido L-ascórbico descritos nas FCDB.

^b perdas durante a centrifugação.

^c massa de cada ensaio (massa final/3).

^d média dos volumes de titulante gasto (n=3) ± desvio-padrão.

Doseamento do ácido L-ascórbico no maracujá regional (Exemplo):

Volume titulante (mL)	Ácido L-ascórbico (mg)
1	0,8806
8,23	x

x = 7,25 mg L-AA.

Doseamento ácido L-ascórbico/ 100 g polpa:

Massa polpa (g)	Ácido L-ascórbico (mg)
21,42	7,25
100	y

Y= 33,84 mg L-AA.