

SÔBRE O TEOR DE VITAMINA C EM MIRTÁCEAS

Walter Brune
Cid M. Batista
Daison O. Silva
José Maurício Fortes
Rubens V. R. Pinheiro*

1. INTRODUÇÃO

Com o propósito de indagar sistematicamente sobre representantes de nossa flora, em vários de seus constituintes, foram conduzidos, entre outros, os presentes experimentos. Vi-sou-se um método de dosagem rotineira, sendo, em consequência fácil, barato e que permitisse o preparo do material fora do laboratorio. Com este intuito, os experimentos aqui relacionados visam:

- a) preconizar um método de rotina;
- b) determinar alguns fatores que afetam o teor em vitamina C;
- c) avaliar o seu teor em frutos desta família, em espécies cultivadas nas proximidades de Viçosa, Minas Gerais.

O teor de vitamina C, em frutos de algumas espécies cultivadas no Estado de São Paulo foi avaliado recentemente por LEME (6). O autor destas análises aponta, entre outras cou-

* Respectivamente, Prof. Catedrático, Prof. Assistente e Instructor de Bioquímica do Instituto de Biologia e Química, Instructor e Prof. Assistente de Fruticultura do Instituto de Fitotecnia - Escola Superior de Agricultura - UREMG.

sas, um teor bem elevado em algumas espécies de mirtáceas.

A literatura sobre os métodos e modalidades recomendados é bem vasta, vide p. ex. HAWK (3) e LEME (5). No seu estudo, percebeu-se, entretanto, que as informações sobre o processamento de material são escassas. Por via de regra, encontra-se a recomendação laconica de que o extrato vegetal deverá ser filtrado. A filtração conforme é conduzida usualmente, porém, nem sempre rende filtrado límpido e hialino. Tais filtrados interferem facilmente na avaliação, quer seja volumétrica, quer fotométrica.

Após ter-se experimentado vários tipos de purificação, preconizou-se uma que até agora tem vencido, de forma satisfatória, os obstáculos da turvação. Filtrados vermelhos, que, portanto, interferem na medição da absorção do indicador apropriado, foram levados em consideração, para se poder avaliar o teor em vitamina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. 1 Extração do material

Colheram-se frutos, em estado maduro. Tão logo se recebia o material no laboratório, era ele descarocado, quando oportuno, e a polpa desintegrada, em presença de solução de ácido oxálico 0,4% (7 ml solução/grama de amostra) por liquificador, durante 3 minutos. Em seguida, a suspensão de material desintegrado levou uma primeira purificação, por passagem em algodão. A suspensão assim coada foi misturada com celite, em quantidade necessária para se obter solução limpa, por filtração em funil de Büchner.

Nos casos onde os extratos foram conservados por algum tempo, adicionaram-se, como agente fungostático, pequenas porções de timol e de benzoato de sódio.

2. 2 Solução padrão

Prepararam-se soluções-padrão de ácido ascórbico, em ácido oxálico a 0,4%, nas concentrações de 0 até $4 \cdot 10^{-3}\%$, chamadas respectivamente: "padrão 0", "padrão 1" etc., até "padrão 4".

2. 3 Medição do teor em vitamina

Os extratos e as soluções-padrão foram medidos por

reação, com solução aquosa de 2,6-diclorofenolindofenol (12 ppm; 1 + 9 ml). As leituras da extinção foram feitas dentro do prazo máximo de um minuto. O aparelho usado foi o espectrofotômetro PMQ II da Companhia Zeiss.

Comprimento de onda: 520 m μ .

Cubas usadas de preferência: 5 cm.

A calibração do aparelho foi feita em água pura (extinção relativa 0,00). O indicador - a solução de 2,6-diclorofenolindofenol - foi testado diariamente.

2. 4 Teste de fugacidade

A extinção, em função do tempo, foi medida

- a) em solução ácida do indicador e
- b) em certo material natural de fugacidade notadamente pronunciada.

2. 5 Prova de eficiência da filtração, por celite

Um extrato, rico em vitamina, foi avaliado cada vez, depois de filtrações repetidas por celite.

2. 6 Conservação do teor em vitamina, no material natural

As amostras não trabalhadas apresentam sintomas de decomposição rápida, em temperatura ambiente. Dentro de um dia, no máximo, e muitas vezes até dentro de poucas horas, as frutas mostravam sinais de murcha e de ataque pela mosca Drosophila. Para se poder então executar o presente experimento, uma das amostras em seu estado natural foi conservada em câmara fria e medido o teor em vitamina, repetidas vezes.

2. 7 Efeito protetor de ácido oxálico

O material desintegrado em ácido oxálico, depois de coado por algodão, foi conservado, ora em temperatura ambiente, ora em geladeira, e trabalhado depois de vários intervalos.

2. 8 Prova de estabilidade de solução de vitamina

Um extrato de material natural, depois da filtração, foi dividido em duas porções, ambas conservadas no escuro, sendo uma delas mantida em temperatura ambiente e a outra em geladeira. O teor em vitamina foi medido, de tempo em tempo.

3. RESULTADOS

Todos os dados sobre o teor em vitamina são indicados, no presente, em mg/100 g de material.

Todos os resultados são consequência de várias determinações das quais foi avaliado o erro padrão, embora este nem sempre tenha sido indicado nos resultados seguintes.

3. 1 Teor em material natural

Grumichama (<u>Eugenia Dombeyi</u> , Skeels)	$6,6 \pm 0,4$
Uvaia (<u>E. uvalha</u> , Camb.)	103 ± 5
Pitanga (<u>E. uniflora</u> , L.)	$17,0 \pm 0,2$
Cabeludinha (<u>E. tomentosa</u> , Camb.)	783 ± 23
Pitomba (<u>E. Lusch nathiana</u> Klatzch ex Berg.)	$8,0 \pm 0,5$
Jabuticaba (<u>Myrciaria cauliflora</u> , Berg.)	$18,9 \pm 3,9$

Segundo LEME (6), o teor desta vitamina varia extraordinariamente, entre espécie. Segundo a mesma informação, uma espécie de Malpighiaceae - a cereja das Antilhas (Malpighia glabra, L.) - sobressai por seu teor invulgar, dando valores de 560 a 1490. O mesmo autor classifica a pitanga, em valores entre 17 e 26, como material rico em vitamina.

3. 2 Teste de fugacidade

As extinções em "padrão 0" e em extrato natural de semente de pitomba são registradas na figura 1. Os valores são calculados, à base da primeira observação (em 20 seg).

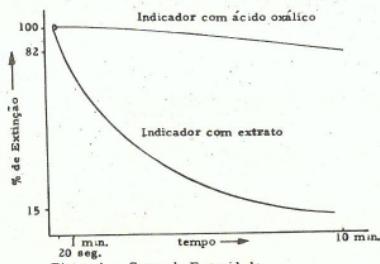


Figura 1. - Curva de Fugacidade

Nos demais materiais analisados, não se percebeu fugacidade qualquer, dentro de um minuto.

3. 3 Efeito da filtração por celite, no teor em vitamina

Percebeu-se, desde o início, que celite é material bom para obtenção de solução límpida. Para testar a retenção da vitamina, o extrato foi filtrado, repetidas vezes, cada vez por nova porção de celite e medido o teor em vitamina. Os resultados observados, em material de cabeludinha, foram:

Nº de Filtrações	Teor
1	146,9 ± 1,2
2	144,9 ± 3,1
3	143,6 ± 0

sendo que não se perceberam quaisquer diferenças significantes.

3. 4 Efeito da conservação de vitamina, em material natural

O material natural foi conservado em câmara fria (-18°C), e observado o teor, em função do tempo.

Dias na Câmara	Teor
0	608
2	356
5	220
8	142
11	15
14	0,6
17	0

O efeito da deterioração do material é bastante evidenciado. Em face deste experimento, chegou-se à conclusão de que o material deve ser trabalhado, sem demora.

3. 5 Efeito protetor de ácido oxálico

Este ensaio foi executado para indagar com que eficiência o material natural, apenas coado por algodão, conservava seu teor em vitamina, quando em contato com ácido oxálico. O material trabalhado para este fim foi cabeludinha.

As observações, segundo o tempo de conservação em temperatura ambiente e em geladeira, foram as seguintes:

	Tempo de conservação (dias)	Em temperatura ambiente	Em geladeira
(início)	0	793	
	1	798	768
	2	753	778
	4	753	728
	5	728	743
	7	729	699
	9	648	713

Em consequência do resultado, percebe-se uma conservação relativamente prolongada do material homogeneizado, fato este que se torna interessante, na colheita do material, em locais bem distantes dos recursos de laboratório. Basta, em tais casos, a homogeneização com ácido oxálico e coação em seguida, por meio do algodão.

3.6 Conservação do teor em vitamina

QUADRO 1. Estabilidade do teor em vitamina, em extratos de *Eugenia tomentosa*, Camb. coados e filtrados.

Dias de conserv.	Semente		Polpa
	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente	Geladeira
1	342	340	654
2	346	352	703
4	290	323	643
8	287*	331**) **	613
11	257	321	559*
14	181	283	448
18	105	245	282
21	59	223	217
23	39	208	167

* Diferença significante, em relação ao valor do primeiro dia

** Diferença significante, quanto ao efeito da temperatura.

O Quadro 1 informa que os dados apresentam diferenças significantes entre si, a partir do 8º ou 10º dia de observação.

vação, quer na diminuição do teor, conforme a idade, quer no modo de conservar o material. Os cálculos foram feitos, à base de 0,27%, conforme KOLLER (4). A conservação em geladeira comprova-se como interessante.

4. CÁLCULOS

A equação que define o teor em vitamina C foi estabelecida mediante os valores provenientes das soluções-padrão. Os valores observados são (extinção x 100):

Padrão 0:	(P ₀)	99; 99; 99;
1	(P ₁)	75; 75; 75;
2	(P ₂)	54; 51; 54;
3	(P ₃)	27; 27; 31; 27; 29; 28;
4	(P ₄)	05; 07; 06;

Estes valores, foi calculada a fórmula seguinte, segundo BRUNE (1):

$$\Delta e = 23,3c + 0,2$$

onde "e" representa as diferenças P₀ - P₁; P₀ - P₂; etc.

e "c" a concentração em 10⁻³% de vitamina C, dos padrões p₁, p₂ etc., respectivamente.

Para o material natural, a fórmula toma a expressão:

$$c = \frac{(\Delta e - 0,2)}{23,3} \cdot v \cdot f$$

onde "c" é a concentração em mg de vitamina C, por 100 g de amostra, "v" é o volume do extrato em (ml), "a" é o peso da amostra, em gramas, e "f" representa o fator de diluição conveniente do extrato, a fim de cair dentro do intervalo mensurável.

Em extratos sem coloração vermelha, "Δe" representa a diferença "p₀ - i", onde "i" é a extinção do extrato, em presença do indicador.

Para casos de extratos de coloração vermelha foi medida, em separado, a extinção do extrato, devidamente diluído, sem indicador (s) e com indicador (i). Assim, o valor Δe resulta da expressão:

$$\Delta e = s + p_0 - i$$

5. DISCUSSÃO

O método colorimétrico na avaliação de vitamina C, conforme foi executado aqui, é o mais indicado para sua aplicação, em material natural. As duas maiores dificuldades técnicas - a "turvidez" e a coloração dos extratos - podem ser superadas adequadamente. Por causa disto, o método colorimétrico recomenda-se como o de escol, em comparação com a determinação volumétrica.

A coloração vermelha das antocianinas é, em várias amostras, bem intensa. Experimentaram-se diversas técnicas para sua eliminação, sem com isto afetar o teor em vitamina, mas todas elas sem resultado satisfatório.

Assim, imaginou-se que, descontando a extinção da coloração do extrato, poder-se-ia medir, não obstante esta implicação, o teor almejado. Para comprovar esta hipótese foi preparado um padrão artificial. Entre vários corantes, distinguiu-se, no presente experimento, a safranina (3,7-diamino-5-fenilfenazinio-cloreto), que satisfez os requisitos necessários, a saber:

- a) apresenta a mesma coloração de antocianinas;
- b) dissolve-se facilmente em água e meio ácido;
- c) não é fugaz;
- d) não modifica a cor, nem precipita com ácido oxálico;
- e) aparentemente, não reage com ácido ascórbico;
- f) obedece à lei de Lambert-Beer, nas concentrações testadas;
- g) não é oxidado pelo indicador aplicado.

Foram comparadas duas soluções de ácido ascórbico, do mesmo teor, das quais uma continha safranina.

Solução	Extinção
indicador	76 76 75
safranina	62 62 61
ácido ascórbico e indicador	57 56 56
safranina, ácido ascórbico e indicador	118 117 117

Os dados permitem calcular os teores em vitamina ($10^{-4}\%$):

sem safranina: $8,36 \pm 0,24$
com safranina: $8,64 \pm 0,30$

A diferença entre os dois valores parece ser puramente casual. Diga-se de passagem, que o teor de vitamina C da solução preparada, há mais de duas semanas, foi originalmente de $5 \cdot 10^{-2}\%$, e depois de diluída para o presente experimento, deveria ter $10^{-3}\%$. O teor medido acusa uma diminuição de 15%. Efeito análogo foi observado e discutido, em outra parte do presente trabalho.

A medição, dentro de 15 segundos, conforme COX (2), evidenciou-se como problemática. Durante os trabalhos deste experimento, percebeu-se que a medição dentro de prazo tão curto acarreta defeitos técnicos, como a medição do volume adicionado, condição da cuba de medição (lavagem, eliminação de bôlhas de ar, colocação controlada no suporte) e calibração do aparelho, de acordo com a voltagem da rede, no momento.

As amostras naturais não conservaram seu teor em vitamina C, por tempo prolongado. Disto decorre que o material deve ser trabalhado imediatamente. A medição depois de um dia, entretanto, ainda rende resultados satisfatórios.

6. CONCLUSÃO

O material analisado contém amostras extraordinariamente ricas em vitamina C.

A fugacidade pode ser acentuada e deve ser levada em conta, entretanto, não foi possível fazer medições anteriores a 20 segundos. Se bem que não testado especificamente, não se percebeu enfraquecimento da absorção, dentro de um minuto. A única exceção percebida até agora, se deu com o material de pitomba, conforme citação anterior.

A filtração por celite resolve, de maneira rápida, eficiente e fácil a clarificação da solução a ser analisada.

O material natural deve ser trabalhado logo, e tem que ser conservado a baixa temperatura; no entanto, basta a homogeneização com ácido oxálico e uma coação para se obterem extractos que mantenham seu teor, por vários dias. Uma vez filtrado por celite, o extrato deve ser medido, dentro de oito dias.

Para a medição fotométrica, a cor vermelha que algumas amostras apresentam, não significa empecilho.

7. SUMÁRIO

A fim de poder avaliar o teor em vitamina C de fruto em várias espécies de mirtáceas, foi desenvolvida uma técnica própria.

Esta permite uma análise rápida, mesmo em material de difícil filtração ou com teor elevado de antocianinas, as quais dificultam as medições feitas por processos convencionais.

Os resultados acusam várias espécies com teor notadamente alto nesta vitamina.

Conforme as presentes observações, a permanência do material não trabalhado em câmara fria provoca uma diminuição acentuada do teor, sendo que em duas semanas o desaparecimento é completo. Ácido oxálico, do outro lado, em contato com o material desintegrado por líquidificador, conserva bem o teor, dentro de uma semana. Neste período, não foi percebida diminuição significante.

8. SUMMARY

The contents of vitamin C of fruits of several Myrtaceae were measured by a new technique. This allows for analysis of samples of difficult filtration as well as those with high contents of anthocyanins.

The results show various species to have notably high yields of this vitamin. Eugenia dombeyi, Skeels; E. uvalha, Camb.; E. uniflora, L.; E. tomentosa, Camb.; Myrciaria cauliflora, Berg. e E. Luschnathiana Klatzch ex Berg.

Storage of the unprocessed fruits in freezers destroys the vitamin in a short time. Thus, within two weeks the loss of vitamin was complete. Oxalic acid, on the other hand, when admixed with the desintegrated fruits preserves the amounts of vitamin for a week or so. No significant reduction was noted during this period.

9. LITERATURA CITADA

1. BRUNE, W. - Sobre a Avaliação de Parâmetros em Análises Colorimétricas Rev. Ceres - Brasil-UREMG IX(49): 1-82. 1952.
2. COX, H. E. e Pearson, D. - The Chemical Analysis of Foods, Chemical Publishing Co., Inc., New York, N.

VOL. XIII, Nº 74, 1966 ===== 133

3. HAWK, P. B., Oser L. B. e Summerson W. H. - Practical Physiological Chemistry, 13^a Edição, McGraw-Hill Book Company Inc., New York 1954. 1227p.
4. KOLLER, S. - Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen, 2^a Edição, Theodor Steinkopff, Dreden, 1943. 73 p.
5. LEME, J. J. e Malavolta E. - Determinação fotométrica do ácido ascórbico-Anais Esc. Sup. Agric. "Luiz de Queiroz", Vol. VII - 115-129. 1950.
6. LEME, J. J. - A vitamina C em algumas plantas brasileiras e exóticas - Rev. Agricultura 26(9-10): 319-330. 1951.