

VITAMINA C EM FRUTOS DE INTERESSE TECNOLÓGICO

(IV.^a Comunicação sobre Vitamina C)*

José Cambraia
Walter Brune
José M. Fortes
Otto Andersen**

1. INTRODUÇÃO

Os métodos químicos de determinação de vitamina C baseiam-se, quase que exclusivamente, no seu poder redutor. Estas determinações incluem titulações do extrato ácido com iodo, azul de metileno na presença de luz e, mais comumente, com 2,6 diclorofenol-indofenol.

Os autores HAWK et alii (3) afirmam que a vitamina C achase, quase que totalmente, na forma de ácido ascórbico. E, conforme aceitação geral, a vitamina C em material natural encontra-se preponderantemente neste estado.

Entretanto, isto não foi comprovado em experimentos realizados em nossos laboratórios. Aconteceu que quando se analisou fru-

* Projeto de pesquisa 13/68 da Diretoria Geral de Experimentação e Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa.

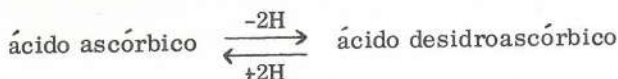
Recebido para publicação em 3-12-1970.

** Respectivamente, Professor Contratado, Professor Titular, Professor Assistente e Professor Titular da Universidade Federal de Viçosa. Bolsistas do CNPq. Os autores agradecem ao CNPq a concessão de bolsas de pesquisa, que permitiram a realização deste trabalho

tos pelo método Tillmans (com 2,6 diclorofenolindofenol), às vezes se obtinha um valor bem aquém do esperado. Em alguns casos, verificou-se apenas traços de vitamina C na forma reduzida. Verificou-se, ainda, uma variação muito grande do teor de vitamina C, dentro de uma mesma variedade de material vegetal, quando colhido em diferentes estádios de maturação (2).

Como existe um equilíbrio entre as duas formas de vitamina

C:



determinou-se o teor de vitamina C sob a forma reduzida e a total, procurando-se atingir os seguintes objetivos:

1. Adaptar um método rotineiro de avaliação de vitamina C total em material vegetal.
2. Avaliar o teor de vitamina C, em ambas as formas em frutos de interesse tecnológico.
3. Verificar e procurar correlacionar as duas formas; sob as quais a vitamina C apresenta-se em material vegetal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados, quanto ao seu teor em vitamina C, diversos frutos de interesse tecnológico fornecidos pelo Instituto de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, após conveniente adaptação de processos rotineiros de avaliação da forma reduzida e do teor total. Em alguns casos, foram analisados frutos com relação a diferentes graus de maturação e diferentes partes do fruto.

2.1. Extração da Vitamina C

O material, tão logo recebido, era descaroçado, quando oportuno, e a polpa desintegrada em presença de ácido oxálico 0,4 % (7 ml de ácido oxálico/grama de amostra) por liquidificador, durante 3 minutos. A suspensão era filtrada, e, em seguida, tornada límpida por filtração com celite.

2.2. Avaliação do Teor em Ácido Ascórbico

A avaliação da forma reduzida da vitamina C foi efetuada segundo o método preconizado por BRUNE *et alii* (1): "Os extratos ácidos e as soluções padrão foram medidos por reação com solução de 2,6 diclorofenolindofenol (12 ppm; 1 + 9 ml). As leituras da extinção foram feitas dentro do prazo máximo de 1 minuto, no comprimento de onda de

520 nm, em cubas de 5 cm de espessura".

A calibração do aparelho foi feita com água destilada (extinção relativa 0, 0). O reagente 2, 6 diclorofenolindofenol foi testado diâ-riamente.

2. 3. Avaliação do Teor Total em Vitamina C

O teor em vitamina C total foi avaliado adaptando-se para a análise de rotina o método desenvolvido por ROE e KUETHER (6).

2. 3. 1. Curva Padrão

Foram preparados padrões de ácido ascórbico, em ácido oxálico 0, 4%, nas concentrações de 0 até 788 microgramas por 10 ml.

2. 3. 2. Medição do Teor em Vitamina C Total

Os extratos e os padrões foram tratados com norita sob forte agitação (1 grama/20 ml de extrato ou padrão) e filtrados. Tomaram-se alíquotas de 4, 0 ml, às quais se adicionaram, respectivamente, duas gotas de solução alcoólica 10% de tiuréia e 1, 0 ml de 2, 4 dinitrofenilhidrazina. Em seguida, foram colocadas em banho-maria a 37°C, durante exatamente 3 horas. Decorrido este tempo, as amostras foram retiradas, colocadas em banho de gelo e tratadas com 5, 0 ml de ácido sulfúrico ($d = 1, 815 \pm 0, 005$) e, após 30 minutos, foi determinada a extinção da solução resultante em espectrofotômetro Zeiss PMQ II no comprimento de onda de 540 nm, em cubas de 1 cm de espessura.

A calibração do aparelho foi feita com um branco de ácido oxálico 0, 4%, que sofreu os mesmos tratamentos dos extratos e padrões.

2. 3. 3. Influência da Concentração do Ácido Sulfúrico

A fim de se estudar a influência da concentração do ácido sulfúrico no desenvolvimento da cõr, preparou-se uma solução de ácido ascórbico (10, 9 mg/100 ml de solução), aplicou-se os mesmos tratamentos supra-referidos (2. 3. 2.), variando-se, apenas, a concentração do ácido sulfúrico e mediu-se a extinção da solução.

2. 3. 4. Interferentes

A fim de se determinar possíveis interferências de certas substâncias, bastante encontradas na maioria dos frutos (glucose, frutose e ácido galacturônico) (5), preparou-se uma solução de ácido as -

córbico (40,0 mg/100 ml de solução), adicionou-se diferentes quantidades destas substâncias, aplicou-se os mesmos tratamentos do item 2.3.2. e mediu-se a extinção da solução.

3. RESULTADOS

3.1. Curva Padrão para a Determinação de Vitamina C Total

A curva padrão foi estabelecida entre 0,0 e 788 microgramas de ácido ascórbico por 10 ml. O coeficiente de variação foi de 5,77% (figura 1).

A curva foi ajustada estatisticamente e estabelecida a seguinte equação que define o teor de vitamina C em função da extinção:

$$C = 429,79 e - 5,26$$

onde:

C = concentração, em microgramas de vit. C/10 ml

e = extinção a 540 nm

Para o material natural, a fórmula toma a expressão:

$$C = \frac{(429,79 e - 5,26) 0,25 v}{d p}$$

onde:

C = concentração, em mg de vit. C/100 g de amostra

e = extinção a 540 nm

v = volume do extrato, em ml

d = espessura da cuba, em cm

p = peso da amostra, em g

3.2. Influência da Concentração do Ácido Sulfúrico

Mantendo-se constantes a concentração de vitamina C e do reagente 2,4 dinitrofenilhidrazina e variando-se a concentração do ácido sulfúrico, obteve-se os seguintes resultados que se vêem na figura 2.

3.3. Interferentes

Foi estudado o efeito de três substâncias, bastante comuns em frutos (glucose, frutose e ácido galacturônico), sobre o desenvolvimento da cor. Os resultados figuram no quadro 1.

Todos os valores de \bar{t} , calculados entre duas médias, foram

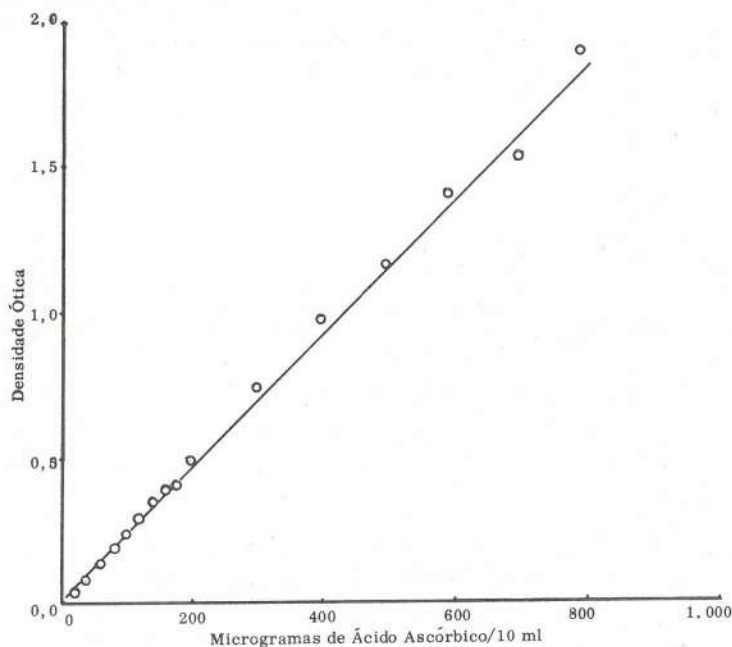


FIG. 1 - Curva padrão para a determinação de vitamina C total com 2,4-dinitrofenilhidrazina (Cubas: 1 cm de espessura; comprimento de onda: 540 nm)

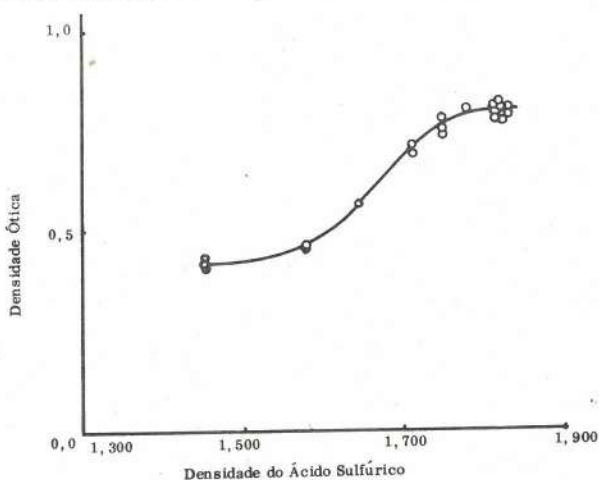


FIG. 2 - Efeito da densidade do ácido sulfúrico sobre o desenvolvimento da cor (Cubas de 1 cm de espessura; comprimento de onda: 540 nm)

QUADRO 1 - Influência de alguns interferentes no desenvolvimento da cor. Solução padrão - 40 mg de ácido ascórbico/100 ml de solução

Interferentes	% do interferente	Densidade ótica
Testemunha	--	1,09
Frutose	0,5	1,12
	1,0	1,12
	1,5	1,08
	0,5	1,10
Glucose	1,0	1,05
	1,5	1,06
	0,125	1,11
Ác. galacturônico	0,250	1,10
	0,375	1,11

"t máximo" calculado = 1,95

t (5%; 4 GL) = 2,78

menores que os tabulados ao nível de 5%.

3.4. Resultados das Análises Químicas

Diversos frutos de interesse tecnológico foram analisados quanto ao seu teor em ácido ascórbico e vitamina C total (quadro 2).

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo método preconizado por KOLLER (4):

Nº de observações = 17

Soma das diferenças em % = 1.574,0

Média das diferenças em % = 92,6

Erro padrão das diferenças (δ) = 32,5

Erro padrão da média das diferenças (δ_M) = 7,88

Valor de T* = 3,54 (* - Múltiplo de δ_M em função dos GL)

Desvio da média = 30,6

QUADRO 2 - Comparação do teor de ácido ascórbico e vitamina C total, em diversos frutos de interesse tecnológico. Frutos maduros

Frutos	Parte Analisada	Ácido ascórbico	Vitamina C total
mg/100 g			
Jambo	polpa	7,9	21,6
Sapucaia branca	polpa	3,8	24,4
Mexerica	suco	18,1	58,5
Abiu	polpa	12,0	60,6
Mamão	polpa	34,5	68,8
Limão Taiti	suco	15,5	76,1
Araçá	fr. inteiro	19,2	76,3
Lar. Baía Cabula	suco	53,1	86,2
Lar. Hamlin	suco	44,8	93,2
Lar. Barão	suco	43,8	96,5
Limão Eureka	suco	40,4	97,8
Carambola	fr. inteiro	32,1	99,6
Lar. Baía suco	suco	69,8	112,2
Pitanga	fr. inteiro	29,9	113,9
Lar. Campista	suco	35,8	140,2
Uvaia	polpa	133,4	236,0
Cabeludinha	fr. inteiro	786,3	1.387,1

A significância foi calculada na hipótese de que a média das diferenças em % menos o desvio da média é diferente de zero.

Ao nível de 0,1%: $92,6 - 30,6 \neq 0$

As análises químicas foram feitas em frutos de diferentes estádios de maturação e para diversas partes do fruto (quadros 3 e 4).

4. DISCUSSÃO

4.1. Influência da Concentração do Ácido Sulfúrico

Verificou-se que o desenvolvimento da cor, no método de determinação de vitamina C total, é grandemente influenciado pela con-

centração do ácido sulfúrico usado para a dissolução do precipitado formado pela condensação entre o reagente 2, 4 dinitrofenilhidrazina e a vitamina C.

QUADRO 3 - Comparação do teor de ácido ascórbico e vitamina C total, conforme o grau de maturação

Frutos	Ácido ascórbico			Vit. C total		
	Verde	"de-vez"	Maduro	Verde	"de-vez"	Maduro
	mg/100 g			mg/100 g		
Limão-cravo	25,5	21,3	15,2	75,0	66,2	46,6
Nêspera	0,0	6,0	6,0	21,6	24,9	33,0
Cambuci	--	68,3	46,5	--	160,2	149,3
Maracujá	94,8	--	9,1	165,6	--	65,5

QUADRO 4 - Comparação do teor de ácido ascórbico e vitamina C total, conforme a parte do fruto analisado. Frutos maduros

Frutos	Ácido ascórbico				Vit. C total			
	1	2	3	4	1	2	3	4
	mg/100 g							
Tang. Flórida	109,0	17,0	33,5	0,0	162,5	91,6	153,3	20,5
Lar. S. d'Água	202,3	37,3	60,6	0,0	295,5	111,4	163,4	17,3
Lima Pérsia	124,9	37,0	42,4	0,0	188,5	92,8	126,9	23,3
Limão-cravo	30,4	2,3	5,0	0,0	81,4	47,7	51,6	12,8

1 - Casca; 2 - Suco; 3 - Bagaço; 4 - Sementes

Entre as densidades 1,450 e 1,780 há uma relação quase linear entre a concentração do ácido sulfúrico e a intensidade da cor, po-

rém, a partir deste ponto, entre as densidades 1,800 e 1,830 existe um patamar, isto é, embora a densidade ótica seja alta, não existe variação nestas concentrações.

A concentração escolhida para as determinações foi a densidade $1,815 \pm 0,005$.

4.2. Interferentes

Os mais prováveis interferentes na determinação de vitamina C são glucose, frutose e ácido galacturônico. O efeito destas três substâncias no desenvolvimento da côr foi estudado e verificado não influenciar significativamente (teste de t, ao nível de 5%), pelo menos dentro da faixa de concentração tomada.

4.3. Comparação Entre o Teor de Ácido Ascórbico e Vitamina C Total em Diversos Frutos

O quadro 2 mostra uma comparação entre o teor de ácido ascórbico e vitamina C total, para diversos frutos de interesse tecnológico.

Como os resultados obtidos variam segundo duas ordens de grandezas, o método de determinação e o tipo de fruto, a comparação dos dados foi feita com valores percentuais que, deste modo, dão a cada amostra o mesmo peso.

A análise estatística dos resultados mostra haver diferença significativa entre os métodos empregados na avaliação de vitamina C. Sempre o teor de vitamina C total foi estatisticamente superior ao teor de ácido ascórbico.

Observa-se, ainda, pela análise do quadro 2, que a relação ácido desidroascórbico*/ácido ascórbico muitas vezes aproxima-se de 1, e, às vezes, ultrapassa este valor, indicando alta participação da forma oxidada no teor total desta vitamina.

4.4. Comparação do Teor de Ácido Ascórbico e Vitamina C Total em Frutos de Diferentes Estádios de Maturação

O quadro 3 mostra os resultados de análise química de alguns frutos de diferentes graus de maturação.

Verifica-se que, em alguns casos, o teor de vitamina C, tanto ácido ascórbico como vitamina C total, decresce com a maturação; é

*ácido desidroascórbico = vitamina C total - ác. ascórbico

o caso do "Limão-Bravo", "Cambuci" e "Maracujá". Em outros casos, como na "Nêspera", o teor cresce à medida que o fruto se desenvolve.

4. 5. Comparação do Teor de Ácido Ascórbico e Vitamina C Total, Conforme a Parte do Fruto Analisado

Os resultados do quadro 4 referem-se à comparação do teor de ácido ascórbico e vitamina C total, conforme a parte do fruto analisado, em algumas frutas cítricas.

Verifica-se que os teores de ácido ascórbico são sempre menores do que os de vitamina C total, e também que há completa concordância quanto à localização da vitamina C. Os resultados obtidos mostram que em citros o teor de vitamina C cresce do centro do fruto para a periferia. Assim, em ordem crescente de teor de vitamina C ter-se-ia a seguinte classificação: sementes, suco, bagaço e casca.

5. CONCLUSÕES

Em vista de todos os resultados obtidos e já discutidos, pode-se concluir o seguinte:

1. O método de determinação de vitamina C através da reação com 2, 4 dinitrofenilhidrazina mostrou-se sensível, específico e de fácil desenvolvimento, recomendando-se o seu uso em análises de rotina.

Entretanto, é importante que se trabalhe com extratos mais diluídos que 1:7, para evitar a interferência de substâncias tais como a glucose, a frutose e o ácido galacturônico. Também é importante que se trabalhe com ácido sulfúrico de concentração elevada, porém, bem fixada.

2. Os resultados de análises de vitamina C devem estar acompanhados do grau de maturação dos frutos e também da parte analisada, uma vez que o teor de vitamina C mostrou-se bastante variável com estes fatores.

3. O teor de vitamina C de frutos, visando mostrar o seu valor vitamínico, deve ser, necessariamente, expresso em função de vitamina C total, e não apenas de ácido ascórbico.

6. RESUMO

Foi adaptado para análise de rotina uma técnica de avaliação de vitamina C total (ácido ascórbico + ácido desidroascórbico), baseada na condensação da forma oxidada da vitamina C com 2, 4 dinitrofenil-

hidrazina. O estudo mostrou que o desenvolvimento da côr é fortemente afetado pela concentração do ácido sulfúrico, usado na dissolução do precipitado formado na condensação. A sua densidade deve estar entre 1,800 e 1,830. Verificou-se, ainda, que possíveis interferentes, tais como: glucose, frutose e ácido galacturônico, não constituem problemas nas concentrações em que, normalmente, existem nos frutos.

Em seguida, foram analisados quanto ao seu teor em ácido ascórbico e vitamina C total diversos frutos de interesse tecnológico, verificando-se que o teor total é significantemente superior ao teor de ácido ascórbico.

O estudo mostrou ainda que o teor de vitamina C varia grandemente de fruto para fruto e, para um mesmo tipo de fruto varia com o grau de maturação e com a porção do fruto tomada para análise; em citros, em ordem decrescente de vitamina C seria: casca, bagaço, suco e sementes.

7. SUMMARY

By means of adaptation for routine work we analysed total vitamin C contents (reduced ascorbic acid plus dehydroascorbic acid) by condensation of its oxydized form with 2,4 dinitrophenylhydrazin (DNP). The color developed by the condensation product was strongly influenced by the sulfuric acid concentration when used to solubilize the DNP-derivate. The best value we found lies within the densities 1.800 and 1.830.

There was no interference of glucose, fructose and galacturonic acid within the concentration range usually observed in fruits.

The total vitamin C contents os fruits of some technologically interesting species were significantly higher than those of reduced ascorbic acid.

The contents of this vitamin varied considerably within species, as expected. The same is true for variations according to the ripening stage and to the parts of the fruit; in citrus the latters could be arranged in decreasing order as follows: pee, flesh, juice and kernels.

8. LITERATURA CITADA

1. BRUNE, W., BATISTA, C.M., SILVA, D.O., FORTES, J.M. & PINHEIRO, R.V. Sobre o teor de vitamina C em Mirtáceas. Rev. Ceres, Viçosa, 13(74):123-133. 1966.
2. BRUNE, W., SILVA, D.O. & MATTOS, J. Sobre o teor de vitamina C em Mirtáceas II. Rev. Ceres, Viçosa, 13(75):182-193. 1966.

3. HAWK, P.B., OSER, B.L. & SUMMERSON, W.H. Practical Physiological Chemistry. 13^a ed., New York, McGraw Hill Book. 1954. 1440 p.
4. KOLLER, S. Graphische Tafeln zur Beurteilung Statistischer Zahlen, 2^a ed., Verlag von T. Steinkopff, Dresden. 1943. 75 p.
5. ROE, J. H. Comparative analyses for Ascorbic Acid by the 2,4 Dinitrophenylhydrazin method the coupling reaction at different temperatures: a procedure for determining specificity, J. Biol. Chem., Baltimore, 236(5):1611-1613. 1961.
6. ROE, J.H. & KUETHER, C. A. A color reaction for Dehydroascorbic acid useful in determination of vitamin C. Science, New York, 95(2453):77. 1942.