

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA  
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**

**DAYANE SILVA FABRICIO**

**DETERMINAÇÃO DE VITAMINA C EM SUCO DE FRUTAS *IN*  
*NATURA* E INDUSTRIALIZADOS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA E  
TITULAÇÃO IODOMÉTRICA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**LONDRINA  
2018**

**DAYANE SILVA FABRICIO**

**DETERMINAÇÃO DE VITAMINA C EM SUCO DE FRUTAS *IN*  
NATURA E INDUSTRIALIZADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E  
TITULAÇÃO IODOMÉTRICA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Licenciatura em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vanessa Kienen

**LONDRINA  
2018**

**DETERMINAÇÃO DE VITAMINA C EM SUCO DE FRUTAS *IN*  
NATURA E INDUSTRIALIZADOS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA E  
TITULAÇÃO IODOMÉTRICA**

por

DAYANE SILVA FABRÍCIO

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 28/06/2018 como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciatura em Química. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Professora Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dra. Vanessa Kienen

---

Membro titular

Prof<sup>a</sup>. Dra. Amélia Elena Terrile

---

Membro titular

Prof. Dr. André Luiz Buzzo Mori

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus pelo dom da vida, por me permitir desfrutar de todo ensinamento e por não me desamparar nos momentos mais difíceis durante essa jornada.

Aos meu pais Mario e Magali e aos meus irmãos Diego e Dhara, por toda paciência, dedicação e por todo suporte para alcançar essa conquista e por me ensinarem o significado real da palavra perseverança.

Aos meus professores que sempre estiveram dispostos a me ajudar, contribuindo para o meu aprendizado. Em especial a minha professora orientadora Dra. Vanessa Kienen que gentilmente me proporcionou todo suporte necessário, correções, incentivo e que enriqueceu minha bagagem acadêmica e pessoal.

Aos meus amigos e colegas de universidade, que não me permitiram desistir e desfrutaram comigo dos melhores momentos de diversão e reflexão.

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Londrina, que financiou minha pesquisa e me permitiu chegar ao fim de mais um ciclo de maneira satisfatória.

Enfim, um muito obrigada a todos que me apoiaram até o final dessa etapa!

*“Entrega o teu caminho ao Senhor, confia  
nele, e o mais ele fará.”*

*(Salmos 37:5)*

FABRICIO, Dayane S. **Determinação de Vitamina C em suco de frutas *in natura* e industrializados por cromatografia líquida e titulação iodométrica.** 2018. 64p. Trabalho de conclusão de curso de Licenciatura em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, PR.

## RESUMO

A Vitamina C é essencial para o ser humano, apresentando um papel importante na suplementação diária por possuir propriedades que auxiliam na resistência imunológica. Esse estudo busca avaliar a qualidade dos produtos e quantificar a taxa de degradação da Vitamina C nos sucos *in natura* e industrializado por dois métodos distintos de análise, a Cromatografia Líquida (CL) e a Titulação Iodométrica, avaliando o método economicamente viável, assim como o método mais eficiente para a determinação de Vitamina C nas amostras analisadas. Para isso foram selecionados três sabores: laranja, limão e tangerina, considerados os mais consumidos atualmente. Dentre esses sabores foram analisados os sucos *in natura*, industrializados e em pó, todos os sucos foram mantidos em refrigeração e em frasco âmbar por um período de 21 dias, sendo analisados no dia do preparo das amostras, no primeiro dia após a abertura e a cada três dias até completar o total de 21 dias. As porcentagens de declínio da Vitamina C foram comparadas entre o primeiro e último dia de análise, obtendo os melhores resultados para análise cromatográfica, devido a sensibilidade da técnica, que possibilita atingir valores mais exatos para a concentração de Vitamina C. O suco que obteve melhor resultado entre os analisados foi o da laranja *in natura*, onde é possível encontrar o valor de 447 mg L<sup>-1</sup> por meio do método de titulação e 398 mg L<sup>-1</sup> no método de cromatografia líquida para o primeiro dia de análise após preparo da amostra. No último dia de análise obteve-se os valores de 368 mg L<sup>-1</sup> por meio do método de titulação e 233 mg L<sup>-1</sup> no método de cromatografia líquida. A degradação da Vitamina C é diferente em cada um dos sabores de suco, porém permanece de maneira significativa no decorrer dos dias para a maioria dos sucos analisados. Sendo assim, os sucos podem ser consumidos durante alguns dias sem perda significativa da Vitamina C.

**Palavra-chave:** Vitamina C. Degradação. Titulação iodométrica. Cromatografia líquida.

FABRICIO, Dayane S. **Determination of Vitamin C in fruit juices *in natura* and industrialized by Liquid chromatography and Titration by Iodometry.** 2018. 64p. Undergraduate Thesis in Chemistry graduation. Federal University of Technology in Paraná. Londrina, PR.

### ABSTRACT

The Vitamin C is an essential for the human being, having an important role in the dairy supplementation because it owns properties that help in the immunologic resistance. This study searches to evaluate the quality of the products and how much the vitamin C is degraded into *in natura* juices by two distinctive methods of analyzes the Liquid Chromatography (LC) and the Titration by Iodometry analyzing the best economic method, as well as the most efficient method to determine the vitamin C in the analyzed samples. For this, there were three flavors selected: orange, lemon and tangerine, considering them the most consumed nowadays. Among these flavors we analyzed the *in natura*, the industrialized and the powder juices, all the juices were maintained under refrigeration in an amber bottle during 21 days, being analyzed in the day of the preparation of the samples, in the first day after the opening and every three days until complete the 21 days. The percentage of Vitamin C decline was compared between the first and the last day of analyzes, we got better results under the chromatography analyzes, due to the sensibility of the technic, that enables reach more exact values for the Vitamin C concentration. The juice that obtained better results among all the analyzed was the orange *in natura*, where it was possible to find the value of 447 mg L<sup>-1</sup> by the method of titration and 398 mg L<sup>-1</sup> in the liquid chromatography in the first day of preparation of the samples. In the last day of analyse it was the value of 368 mg L<sup>-1</sup> by the method of titration and 233 mg L<sup>-1</sup> in the liquid chromatography. The degradation of Vitamin C is different in each one of the flavors of the juice, but remains significantly during the days in the most juices analyzed. Therefore, the juices can be consumed during some days without a great loss in Vitamin C.

**Key words:** Vitamin C. Degradation. Titration by iodometry. Liquid chromatography.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Estrutura da Vitamina C .....	16
<b>Figura 2</b> – Isômeros do Ácido Ascórbico .....	17
<b>Figura 3</b> – Reação de Oxidação da Vitamina C.....	19
<b>Figura 4</b> – Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000.....	30
<b>Figura 5</b> – Gráfico de controle de pH suco de laranja .....	16
<b>Figura 6</b> – Gráfico de controle de pH suco de limão.....	17
<b>Figura 7</b> – Gráfico de controle de pH suco de tangerina .....	38
<b>Figura 8</b> – Curva analítica da Vitamina C .....	39
<b>Figura 9</b> – Cromatograma do padrão de Vitamina C 20 mg.L <sup>-1</sup> .....	40
<b>Figura 10</b> – Cromatograma do suco de laranja <i>in natura</i> do primeiro dia de análise (dia 0). Condições: Fase móvel água Milli-Q ajustado pH 3,0, injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18 .....	45
<b>Figura 11</b> – Cromatograma do suco de laranja <i>in natura</i> do dia último de análise (dia 21). Condições: Fase móvel água Milli-Q ajustado pH 3,0, injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.....	46
<b>Figura 12</b> – Cromatograma do suco de limão <i>in natura</i> do primeiro dia de análise (dia 0). Condições: Fase móvel água Milli-Q ajustado pH 3,0, injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18 .....	51
<b>Figura 13</b> – Cromatograma do suco de limão <i>in natura</i> do dia último de análise (dia 21). Condições: Fase móvel água Milli-Q ajustado pH 3,0, injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.....	52
<b>Figura 14</b> – Cromatograma do suco de tangerina <i>in natura</i> do primeiro dia de análise (dia 0). Condições: Fase móvel água Milli-Q ajustado pH 3,0, injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18 .....	57
<b>Figura 15</b> – Cromatograma do suco de tangerina <i>in natura</i> do dia último de análise (dia 21). Condições: Fase móvel água Milli-Q ajustado pH 3,0, injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18 .....	58



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Propriedades do Ácido Ascórbico .....	18
<b>Tabela 2</b> – Quantidade em Vitamina C nos alimentos .....	20
<b>Tabela 3</b> – Concentração de Vitamina C do suco de laranja em mg.L <sup>-1</sup> por titulação iodométrica.....	41
<b>Tabela 4</b> – Concentração de Vitamina C do suco de laranja em mg.L <sup>-1</sup> por CL .....	42
<b>Tabela 5</b> – Concentração de Vitamina C do suco de laranja em mg.L <sup>-1</sup> por titulação iodométrica.....	43
<b>Tabela 6</b> – Concentração de Vitamina C do suco de laranja em mg.L <sup>-1</sup> por CL .....	44
<b>Tabela 7</b> – Concentração de Vitamina C do suco de limão em mg.L <sup>-1</sup> por titulação iodométrica.....	47
<b>Tabela 8</b> – Concentração de Vitamina C do suco de limão em mg.L <sup>-1</sup> por CL.....	48
<b>Tabela 9</b> – Concentração de Vitamina C do suco de limão em mg.L <sup>-1</sup> por titulação iodométrica.....	49
<b>Tabela 10</b> – Concentração de Vitamina C do suco de limão em mg.L <sup>-1</sup> por CL.....	50
<b>Tabela 11</b> – Concentração de Vitamina C do suco de tangerina mg.L <sup>-1</sup> por titulação iodométrica.....	53
<b>Tabela 12</b> – Concentração de Vitamina C do suco de tangerina mg.L <sup>-1</sup> por CL .....	54
<b>Tabela 13</b> – Concentração de Vitamina C do suco de tangerina mg.L <sup>-1</sup> por titulação iodométrica.....	55
<b>Tabela 14</b> – Concentração de Vitamina C do suco de tangerina mg.L <sup>-1</sup> por CL.....	56

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
4.1	VITAMINAS .....	15
4.2	VITAMINA C .....	16
4.2.1	Estruturas .....	16
4.2.2	Características do Ácido Ascórbico.....	18
4.2.3	Propriedades Físico-Químicas .....	18
4.2.4	Atuações da Vitamina C no organismo .....	19
4.2.5	Alimentos que contém Vitamina C .....	20
4.2.5.1	Laranja.....	21
4.2.5.2	Limão.....	21
4.2.5.3	Tangerina .....	21
4.3	TAXA DE DEGRADAÇÃO DA VITAMINA C ( <i>IN NATURA</i> X INDUSTRIALIZADO) .....	22
4.4	ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DA VITAMINA C .....	23
4.5	MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO PARA VITAMINA C .....	23
4.5.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	24
4.5.1.1	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	26
4.5.2	Titulação.....	27
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
5.1	MATERIAL.....	29
5.1.1	Amostras.....	29
5.1.2	Reagentes .....	29
5.1.3	Vidrarias .....	29
5.1.4	Consumíveis.....	29
5.1.5	Equipamentos .....	30
5.1.5.1	Cromatógrafo líquido.....	30
5.2	MÉTODOS.....	31

5.2.1	Preparo das amostras .....	31
5.2.2	Preparo do padrão de ácido L-ascórbico.....	31
5.2.3	Análises Físico-Químicas .....	32
5.2.4	Determinação da Vitamina C – Titulação Iodometria .....	32
5.2.4.1	Preparo da solução de amido 1% (m/v).....	32
5.2.4.2	Preparo da solução de iodeto de potássio (KI).....	33
5.2.4.3	Preparo da solução padrão de iodato de potássio (KIO <sub>3</sub> ).....	33
5.2.5	Preparo das amostras para a análise cromatográfica .....	33
5.2.6	Determinação da Vitamina C – Cromatografia Líquida .....	33
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
6.1	CONTROLE DE pH .....	36
6.2	CURVA ANALÍTICA DA VITAMINA C .....	39
6.3	LARANJA .....	41
6.4	LIMÃO .....	46
6.5	TANGERINA .....	52
6.6	COMPARAÇÃO ENTRE AS METODOLOGIAS UTILIZADAS .....	59
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Com os avanços industriais é possível observar o aumento da tecnologia em sucos industrializados, visando torná-los mais saborosos e nutritivos quando comparados com o suco *in natura*. Segundo Carmo et al. (2014), o índice de consumo de sucos pronto para beber vem aumentando exponencialmente, pois os mesmos trazem grande praticidade e diversidades de sabores.

Atualmente, busca-se a ingestão de alimentos saudáveis e preocupa-se com os componentes nutricionais. Os sucos em geral, possuem vitaminas que são essências para o organismo humano. Essa preocupação auxilia na escolha entre os sucos *in natura* ou industrializado. Dentre os sucos mais consumidos, está o suco de laranja, que contém a Vitamina C que é essencial para a saúde e sobrevivência humana (DA ROSA et al., 2007).

As vitaminas são consideradas compostos orgânicos que se dividem em duas classes, as lipossolúveis (A, D, E e K) e as hidrossolúveis (C e do complexo B). Entre as vitaminas hidrossolúveis a Vitamina C (ácido L-ascórbico), apresenta um papel importante na suplementação diária, pois possui propriedades diversificadas que auxiliam na resistência imunológica, como suplementação de antioxidantes não enzimáticos, que têm como fonte principal os alimentos (SARNI et al., 2010).

A principal característica dessa vitamina é ser hidrossolúvel e termolábil, porém quando essa vitamina é adicionada nos alimentos como conservante, as qualidades nutricionais desses alimentos são mantidas durante o armazenamento e processamento (LAVARDA, 2011). Outra característica importante dessa vitamina é que ela é um forte agente redutor biológico, com capacidade de reduzir os riscos de doenças não transmissíveis. Sua principal atividade é a ação como antioxidante em virtude da sua capacidade em doar elétrons e captar os radicais livres (COZZOLINO, 2012).

Segundo Baierle et al. (2012), recomenda-se a ingestão diária de Vitamina C, visto que o organismo não sintetiza essa substância devido à inexistência da enzima L-gulonolactona oxidase que é responsável por catalisar a última etapa do ácido ascórbico.

Os sucos de frutas ainda são as principais fontes de Vitamina C, apesar da sua rápida capacidade de degradação em que altera suas capacidades nutricionais e sensoriais, como a cor, sabor, aroma e acidez.

A degradação ocorre por diversos fatores associados à armazenagem, tipo de processamento, temperatura e envasamento. O principal fator de degradação é a oxidação e a luz. Quando os sucos de frutas ficam expostos a esses fatores, ocorre a redução do teor de Vitamina C (TEIXEIRA e MONTEIRO, 2006).

Esse trabalho tem como objetivo quantificar e analisar a taxa de degradação do teor de Vitamina C, encontrados nos sucos *in natura* e industrializados. Dentre os métodos de análises conhecidos para a determinação do teor da vitamina, os mais utilizados são a análise titulométrica e a cromatográfica.

A Titulação por Oxidorredução, consiste em uma técnica de análise de baixo custo, na qual ocorre as reações de oxidação (remoção dos elétrons) e redução (doação de elétrons). Nessas reações ocorre a transferência de elétrons, em que é necessário que o analito esteja apenas em um estado de oxidação que consiste na oxidação dos íons iodeto ou a redução de iodo (SKOOG et al., 2006).

Já a Cromatografia Líquida, está entre os métodos analíticos mais utilizados. A cromatografia ganha um papel de destaque nas análises, facilitando a identificação, quantificação e separação de espécies químicas (COLLINS et al, 2006).

Com esse estudo, busca-se analisar e avaliar a eficiência dos métodos, além da sua efetividade em comparação com os custos empregados nos diferentes métodos analíticos, analisando também o teor de ácido ascórbico afim de quantificá-los e compará-los nos sucos *in natura* e industrializados, ressaltando, a importância do consumo diário da Vitamina C, considerando a qualidade nutricional e a importância de atuar no sistema imunológico e nas funções biológicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o teor de Vitamina C encontrada em sucos de laranja, limão, tangerina, *in natura* e industrializados.

Avaliar, por meio de métodos analíticos, a taxa de degradação ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) da Vitamina C ao longo do tempo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar e comparar o teor de Vitamina C em amostras de sucos *in natura* e industrializados.
- Comparar os resultados obtidos nos diferentes tipos de sucos.
- Avaliar o teor da Vitamina C com diferentes métodos analíticos nas amostras de sucos no dia da preparação e na abertura das embalagens dos sucos industrializados e também nos intervalos de 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 dias após a abertura mantidos sob refrigeração.
- Analisar a eficiência dos métodos analíticos: Cromatografia Líquida (CL) e a Titulometria por Iodometria para a determinação da Vitamina C nos sucos de frutas.

### 3 JUSTIFICATIVA

Atualmente, ocorre o aumento do consumo de produtos industrializados, pela facilidade e comodidade. Os produtos industrializados buscam obter características próximas do produto *in natura*, como cor, aroma, sabor e busca atender as regras da Legislação Brasileira e agradar o consumidor de forma geral (BIELEMANN et al., 2015).

Assim, uma das alternativas para amenizar as diferenças entre o suco *in natura* e o industrializado é o cuidado com o processamento e envasamento do suco, sabendo-se que a Vitamina C se degrada com facilidade na presença de ar e luz. (DANIELI et al., 2009)

De acordo com Skoog et al. (2006), Linus Pauling associou a Vitamina C a estudos relacionados à saúde, onde a vitamina age de forma a prevenir doenças. Com base na teoria de Pauling, compreende-se a importância em realizar análises de concentrações de ácido ascórbico em alimentos.

Desta forma, esse estudo busca avaliar a qualidade dos produtos e quantificar a taxa de degradação da Vitamina C nos sucos *in natura* e industrializado por dois métodos distintos de análise a Cromatografia Líquida (CL) e a Titulometria, avaliando o método economicamente viável, assim como o método mais eficiente para a determinação de Vitamina C nas amostras analisadas.

As análises serão realizadas de forma a avaliar a degradação da Vitamina C, no momento do preparo do suco *in natura* e na abertura dos sucos industrializados, sendo analisados no dia 0, 1, 3 e após o 3º dia, serão analisadas a cada três dias de maneira a completar 21 dias. Os fabricantes de sucos industrializados orientam que o consumo dever ser realizado em até três dias após a abertura da embalagem, indicando o motivo da análise ser realizada com um pequeno intervalo até o 3º dia, as outras análises continuarão com o intuito de delinear o comportamento da vitamina.

## 4 REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 VITAMINAS

A denominação da vitamina deu-se por Casimir Funk, que observou o princípio ativo a partir do alimento, onde envolve um grupo amino, que se faz necessário para a conservação da vida e dos processos metabólicos. Desta maneira essa denominação vem a partir de “amina vital” (DOUGLAS, 2006).

As vitaminas são substâncias heterogêneas presentes nos alimentos que são essenciais para a vida do ser humano. A alimentação é a principal fonte de vitaminas, trazendo benefícios para a saúde e evitando o aparecimento de doenças causadas pela ausência dessas vitaminas no organismo (DOUGLAS, 2006).

De acordo com Florinda BOBBIO (1989) e Paulo BOBBIO (1989), as vitaminas são classificadas segundo sua solubilidade, em dois grupos entre: lipossolúveis (A, D, E e K) e hidrossolúveis (C e do Complexo B). A solubilidade determina a absorção da vitamina no intestino e nos tecidos. As lipossolúveis são as vitaminas solúveis em gordura e contêm principalmente grupamentos aromáticos e alifáticos. Já as hidrossolúveis são solúveis em água e possuem grupos polares ou ionizáveis, o que facilita a absorção pelo corpo, auxiliando no metabolismo energético.

A estabilidade da vitamina depende de alguns fatores, dentre eles estão: temperatura, pH, presença de oxigênio e umidade. Parte desses fatores são alterados nos alimentos *in natura*, pois as vitaminas são sensíveis, podendo ser degradadas com facilidade. Os alimentos processados detêm os mesmos fatores de estabilidade do alimento *in natura*, porém estes podem alterar suas propriedades químicas, diminuindo a quantidade de nutrientes presentes. No entanto, esse processamento auxilia na destruição de inibidores e facilita a formação de complexos entre os íons metálicos componentes presentes nos alimentos (CORREIA et al, 2008).

As deficiências de vitaminas no organismo são encontradas como consequências de: consumo impróprio, redução na absorção, metabolismo frágil, alta eliminação, que são a causa de algumas doenças (MARSHALL et al, 2013).



## 4.2 VITAMINA C

O Ácido Ascórbico (AA), conhecido usualmente como Vitamina C, está presente na classe das vitaminas hidrossolúveis. Sua ação antioxidante auxilia na forma ativa da Vitamina C e é usualmente utilizado como agente redutor das reações por possuir a capacidade de receber e doar elétrons (MANSUR, 2009).

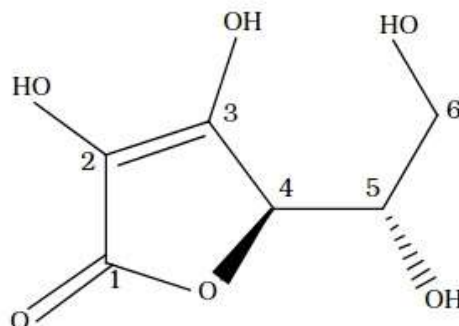
Considerada uma das vitaminas mais importantes na dieta humana, pois o organismo humano é incapaz de sintetizar essa substância devido à inexistência da enzima L-gulonolactona oxidase que é responsável por catalisar a última etapa do ácido ascórbico, fazendo-se necessário o consumo diário dessa vitamina (BAIERLE et al, 2012).

A falta de Vitamina C no organismo causa o escorbuto, doença caracterizada por hemorragia na gengiva, queda dos dentes, anemia e fadiga. Essa doença causa um defeito no tecido conectivo, devido a deficiência na hidroxilação do colágeno. A síntese do colágeno acontece a partir da hidroxilação da prolina, que forma a hidroxiprolina. O colágeno tem como função principal a cicatrização de feridas e fraturas, como também o controle de sangramentos gengivais (MANSUR, 2009).

### 4.2.1 Estruturas

O Ácido Ascórbico representado na Figura 1, tem em sua estrutura um heterocíclico e possui a fórmula molecular  $C_6H_8O_6$ .

**Figura 1 - Estrutura da Vitamina C.**

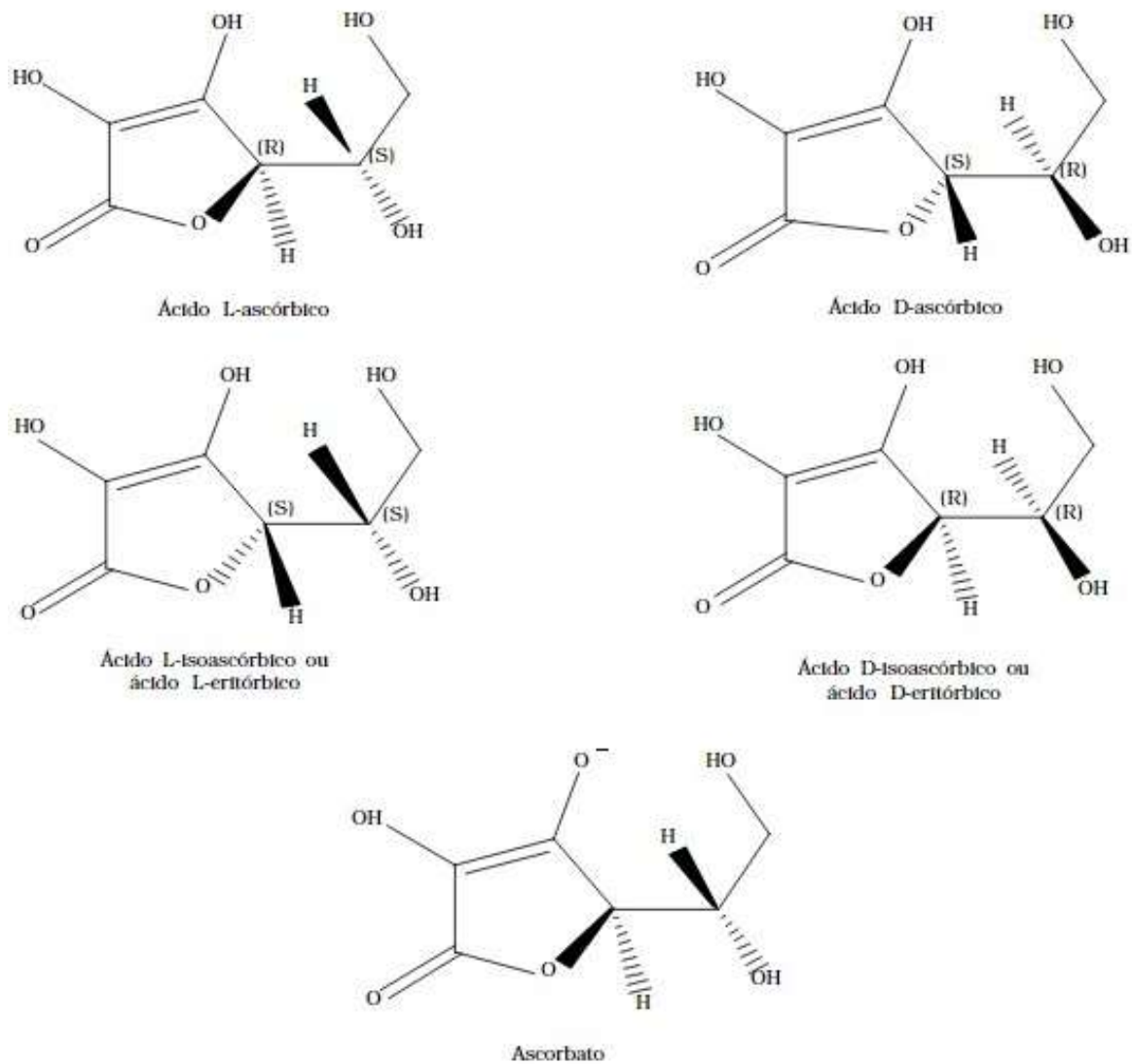


**Fonte:** DA ROSA et al., (2007).

Segundo Da Rosa et al. (2007), a justificação para a acidez da vitamina, deve-se extensão da conjugação da carbonila (Carbono 1), com o acréscimo da acidez no carbono 3 (Figura 1).

O Ácido Ascórbico possui isômeros (Figura 2): dentre eles estão D-isoascórbico (com apenas 5% de atividade vitamínica), Ácido L-ascórbico (pares de estereoisômeros com D-ascórbico), Ácidos D-ascórbico e L-isoascórbico (Nenhuma atividade vitamínica), Semideidroascórbico ou ascorbato (Oxidação reversível com perda de um elétron) (DA ROSA et al, 2007).

**Figura 2 – Isômeros do Ácido Ascórbico.**



**Fonte:** Da Rosa et al., (2007).

#### 4.2.2 Características do Ácido Ascórbico

Através da Tabela 1 é possível observar as características físicas e químicas da Vitamina C:

**Tabela 1** – Propriedades do Ácido Ascórbico.

<b>Propriedades</b>	<b>Descrição</b>
Massa Molar	176,124 g mol <sup>-1</sup>
Densidade	1,65 g cm <sup>-3</sup>
Descrição física	Cristais branco a amarelo claro e inodoro
Decomposição	Acima de 189° C
Solubilidade	Solúvel em água (33 g.100 mL <sup>-1</sup> )
Estabilidade	Em solução a vitamina se oxida quando exposto a luz e ar, estável em estado sólido
pH	2,2 a 2,5 em solução
Característica principal	Antioxidante

**Fonte:** Adaptado de PUBCHEM, (2017).

#### 4.2.3 Propriedades Físico-Químicas

Marzzoco e Torres (2007), enfatiza que a Vitamina C atua como antioxidante, que são capazes de bloquear a ação prejudicial dos radicais livres quando em contato com as estruturas celulares.

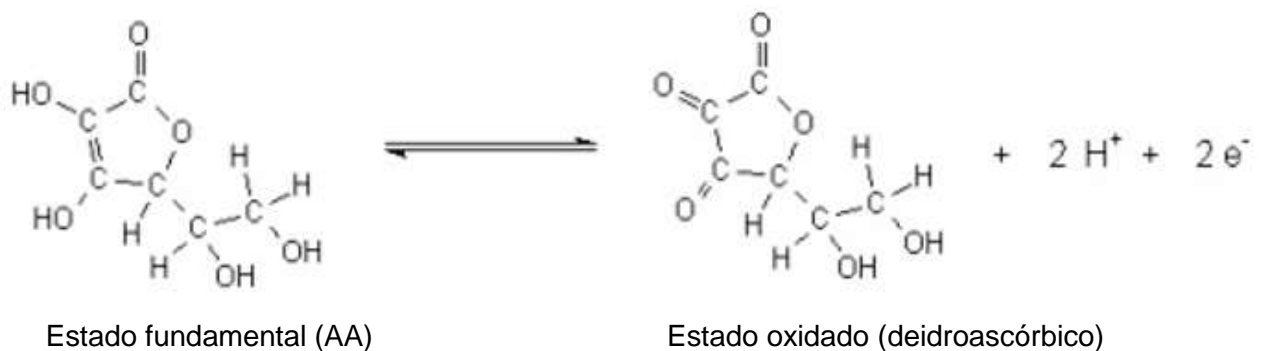
A Vitamina C tem como sua principal fonte os alimentos, sendo encontrados em sua maioria em frutas cítricas, como também está presente em alguns legumes e vegetais. Essa vitamina é facilmente destruída pelo oxigênio, íons metálicos, calor e luz, portanto ao cozinhar o alimento em excesso, é possível que aconteça a diminuição do teor de Ácido Ascórbico (MARSHALL et al., 2016).

Além de ser fundamental para a hidroxilação de prolina em colágeno, também tem um importante papel, em manter o ferro em seu estado reduzido (Fe<sup>2+</sup>), pois o ferro complexa com o ácido ascórbico, atuando como um antioxidante eficiente (MARSHALL et al, 2013).

O pH de 2,2 a 2,5 determina a estabilização do ácido deidroascórbico (presente nos alimentos com níveis baixos) em solução, podendo ser hidrolisada em ácido 2,3 dicetogulônico (DA ROSA et al, 2007).

Considerada uma vitamina termolábil em solução, se decompõe quando exposta a variação de temperatura e oxidada especialmente quando exposta a luz. Ao sofrer oxidação, passa de L-ascórbico para sua forma oxidada L-deidroascórbico, de acordo com a Figura 3 (TEIXEIRA e MONTEIRO, 2006).

**Figura 3** – Reação de Oxidação da Vitamina C.



**Fonte:** TEIXEIRA e MONTEIRO, (2006).

#### 4.2.4 Atuações da Vitamina C no organismo

A falta da Vitamina C no organismo humano pode causar escorbuto, dificuldade de cicatrização, anemia e sangramento na gengiva. O escorbuto pode causar alterações de ego e cognições psicomotoras, ocorre devido a diminuição da síntese de catecolaminas pela enzima que depende da Vitamina C, também conhecida como dopamina beta-hidroxilase. O Ácido Ascórbico também pode perder a função de proteção do folato de oxidação irreversível no organismo (MARSHALL et al., 2016).

Para que a função de proteção antioxidante esteja ativa no organismo é aconselhável o consumo de 45 mg para adultos, segundo a Agência Nacional Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005). Para os fumantes esse valor aumenta em 35mg por dia, em razão do aumento do estresse oxidativo e metabólico (BENDICH, 2001).

De acordo com Rodwell et al. (2016), com cerca de 20 a 50 mg é possível aumentar a absorção ferro no organismo, evitando a anemia. Caso a ingestão ultrapasse 2000mg por dia (para adultos), o corpo não possui a capacidade de

metabolizar acima dessa quantidade e então é eliminada pela urina. Existem poucos indícios de que essa vitamina previna resfriados comuns, porém é iminente que pode reduzir os sintomas e vigor de gripes.

#### 4.2.5 Alimentos que contém Vitamina C

A Tabela 2 apresenta os principais alimentos ricos em Vitamina C.

**Tabela 2** – Quantidade em Vitamina C nos alimentos.

<b>Alimentos</b>	<b>Vitamina C (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
Acerola	940,0
Laranja	40,9
Tangerina	26,7
Alho cozido	6,7
Limão	63,2
Banana-prata	17,3
Mamão	20,5
Batata-doce cozida	29,6
Melão	58,7
Couve-flor	48,0
Manga	43,0
Couve	92,0
Goiaba	45,6
Agrião	45,8
Morango	72,8
Brócolis	80,0
Acelga cozida	12,7
Espinafre	15,3
Macaxeira cozida	26,8
Repolho	17,6
Alface	8,7
Água de coco	2,4

**Fonte:** PINHEIRO et al., (2005); USDA, (2016).

Dentre os alimentos apresentados na Tabela 2, existem três frutas cítricas que apresentam valores significativos de Vitamina C sendo mais consumida na forma de sucos: laranja, tangerina e limão. Além destes alimentos também é possível encontrar Vitamina C em alimentos industrializados, comercializados em mercados. Também é encontrada em forma de comprimidos, com dosagens que variam entre 500 a 2000mg, em comprimidos efervescentes.

#### 4.2.5.1 Laranja

O suco de laranja é considerado um dos alimentos mais saudáveis por possuir baixos níveis de lipídeos e ser excelente fonte de Vitamina C e B, potássio e fibra (SUGAI et al., 2002).

Alguns fatores químicos influenciam na qualidade do suco, devido à ação oxidante, alterando as características do produto. A qualidade do suco de laranja referente à Vitamina C, pode estar condicionado à sensibilidade de conservação e referente aos processos utilizados no preparo e na conservação do suco o que causa a instabilidade térmica, alterando pH, aroma, sabor e cor (SILVA et al., 2006).

#### 4.2.5.2 Limão

Além da Vitamina C, o suco de limão é rico em niacina, piridoxina e ácido fólico. De acordo, com o Ministério da Agricultura e Abastecimento (2000), o suco de limão é uma bebida não fermentada, obtido através da parte comestível do limão, onde deve ser encontrada a quantidade mínima de Vitamina C de 20mg.100mg<sup>-1</sup> para polpas.

#### 4.2.5.3 Tangerina

O suco de tangerina também é consumido frequentemente pelos Brasileiros, por ser fonte de Vitamina C e antioxidantes, porém com teor de Vitamina C inferior em relação à laranja. Contém entre 20 e 35mg.100mL<sup>-1</sup> de Vitamina C no suco da fruta (COUTO e GUIDOLIN, 2010).

### 4.3 TAXA DE DEGRADAÇÃO DA VITAMINA C (*IN NATURA* X INDUSTRIALIZADO)

O Ácido Ascórbico é degradado por diversos fatores, dentre eles, a estocagem, processamento e condições térmicas, alterando assim, suas principais características.

A Vitamina C é rapidamente perdida na cocção dos alimentos, em virtude principalmente da sua solubilidade em água. Sempre que os alimentos de origem vegetal são inseridos crus, a disponibilidade dessa vitamina é maior. A estocagem de alimentos frescos por um longo período também pode reduzir de forma significativa os teores de Vitamina C (COZZOLINO, 2012).

Por ser uma vitamina que oxida com facilidade, quando submetida ao ar, é utilizada como padrão de qualidade nutricional nos alimentos que possuem essa vitamina. Como a oxidação favorece a degradação, é necessário cuidado quanto a sensibilidade de degradação no momento do processamento e armazenagem (DANIELE et al., 2009).

Para auxiliar na manutenção da vitamina, afim de evitar a degradação, Cozzolino (2012), explica que o cozimento rápido e a baixa exposição ao ar no momento do preparo, auxilia na redução de perda da vitamina. Outro fator que pode ocorrer, é a diminuição da perda de vitamina quando existem altas quantidades de flavonoides, que inibem a ação da oxidação, quando complexada com os metais existentes nos sucos.

A exposição dos sucos de fruta ao oxigênio e à luz pode influir na sua qualidade, podendo reduzir o conteúdo de Vitamina C e modificar sensorialmente o produto. Os efeitos adversos do oxigênio sobre a degradação da Vitamina C ocorrem por sua presença no suco, no espaço livre ou através de sua passagem pelo material de embalagem (TEIXEIRA e MONTEIRO, 2006).

A armazenagem adequada à baixas temperaturas, auxilia na manutenção da Vitamina C e no não escurecimento do suco. Quando mantidos em temperaturas entre 15 e 25°C ocorre a perda de Ácido Ascórbico significativo (NETO e FARIA, 1999).

Portanto, a degradação da Vitamina C, causa alterações tanto nutricionais quanto sensoriais, alterando os aspectos principais para os consumidores, como a cor, sabor e acidez.

#### 4.4 ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DA VITAMINA C

A Vitamina C é um composto orgânico, diante disso pode sofrer alterações físico-química, quando exposta a condições como: pH, temperatura, exposição à luz, umidade, entre outros. Esses fatores são capazes de alterar a estabilidade da vitamina e afetar a quantidade encontrada nos alimentos.

A interação da Vitamina C com o oxigênio é o principal fator de alterações físico-químicas, pois no momento do preparo (*in natura*) ou do processamento (industrializado), o suco fica exposto por um tempo necessário para que ocorra a interação com o oxigênio. Na homogeneização do suco industrializado essa exposição ocorre anteriormente ao processo de desaeração (SANCHO et al., 2007).

Sabe-se que diversos fatores alteram a característica da vitamina, porém na literatura é escasso os materiais que demonstram o que a exposição a cada um desses fatores causa na Vitamina C.

#### 4.5 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO PARA VITAMINA C

A determinação do ácido ascórbico pode ser realizada por diversos métodos químicos, biológicos e físicos, porém dentre essas, o mais utilizado são as análises químicas. Na literatura científica encontra-se uma ampla diversidade de métodos de análises, para determinar o teor de Vitamina C: titulométricos (volumétricos), fluorométricos, electroforéticos, quimiluminescentes, espectrofotométricos, enzimáticos e também cromatográficos.

Cada método apresenta suas vantagens e desvantagens, pois a matéria-prima a ser analisada possui uma alta instabilidade referente a aspectos de degradação. Dentre as técnicas utilizadas para a determinação de Vitamina C, duas das técnicas analíticas descritas na literatura possuem um destaque em relação a eficiência e custo e estão divididas em métodos: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e a Titulação por oxidorredução.

Desse modo, a Cromatografia Líquida é utilizada para análise de determinação do ácido ascórbico, por sua capacidade de separar os interferentes, não necessitando muitos preparos antes da análise, evitando que a degradação da vitamina aconteça, necessitando apenas da diluição e filtração da amostra. Quando comparado com o método de titulação de oxidorredução é possível avaliar a



diferença entre o custo das duas análises. Apesar de ser um dos métodos que possuem uma vantagem em relação ao baixo custo, são necessários alguns testes para determinar as quantidades utilizadas dos sucos e reagentes, para os métodos titulométricos buscando o melhor método de análise (DA ROSA et al., 2007).

#### 4.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

De acordo com Collins et al. (2006), dentre os métodos analíticos, a cromatografia ganha um papel de destaque nas análises, facilitando a identificação, quantificação e separação de espécies químicas.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), agora conhecida apenas como Cromatografia Líquida (CL), é uma das mais utilizadas de todas as técnicas de separação. Consiste em uma técnica onde existem duas fases, a fase móvel que é a passagem de uma solução e a fase estacionária que se constitui com partículas pequenas. O soluto é atraído por essas partículas (fase estacionária) e viajam vagarosamente pela coluna (FERNANDEZ e PATTISON, 2015).

Entretanto é um método com custo elevado, pois é necessário a utilização de uma coluna com recheio de tamanhos de 3 a 10  $\mu\text{m}$ , além da alta pressão necessária na análise, possui um custo elevado por ser um método mais complexo se comparado com outras análises (SKOOG et al., 2006).

Na cromatografia é utilizada uma coluna fechada que pode ser reaproveitável, para um grande número de amostras. Utilizam colunas de alta resolução que são mais eficazes, porém estas detêm de uma resistência à vazão da fase móvel. Por isso, adiciona-se uma bomba de alta pressão que realiza a função de que a fase móvel migre com uma certa velocidade através da coluna (COLLINS et al., 2006).

Os componentes do equipamento da cromatografia líquida são: reservatório de fase móvel e sistema de tratamento de solventes, sistemas de bombeamento, sistema de ingestão da amostra, colunas para cromatografia líquida e detectores.

Com a vasta gama de detectores para a CL, os detectores de absorvâncias no ultravioleta e no visível, possui diferentes faixas de comprimentos de onda. No espectrofotômetro UV-Vis a faixa vai de 190 a 800nm, por arranjo de diodos essa faixa vai de 256 até 1024 (COLLINS et al., 2006).

O detector de absorção no UV-Visível, com arranjo por fotodiodos, consiste em um detector de absorção com duplo feixe que um dos feixes passa por uma célula do eluente e o outro através da célula de referência. Esses feixes de luz são analisados através de detectores fotoelétricos em comparação com esses dois feixes, em conjunto com o fototransdutor. A partir dessa detecção, é gerado um gráfico da absorbância em função do tempo (HOLLER et al., 2009). O detector espectrofotométrico de arranjo de diodos é um ultravioleta eficiente:

Os dados espectrais para cada pico cromatográfico podem ser coletados e armazenados à medida que eles aparecem na saída da coluna. Uma forma de apresentação dos dados espectrais, útil na identificação das espécies e na escolha das para a determinação quantitativa (SKOOG et al., 2006).

Raimundo Jr. (1996), explica que esse detector “consiste em um circuito integrado único que possui um sensor de radiação, um elemento de armazenamento de carga e um elemento de leitura”. O detector é um cristal de silício que opera como um transdutor de intensidade luminosa.

Segundo Holler et al. (p. 823, 2009), “Na cromatografia de fase reversa, a fase estacionária é apolar, geralmente um hidrocarboneto, e a fase móvel é um solvente relativamente polar”. Uma das vantagens de utilizar a fase reversa é que a fase móvel pode ser a água, de baixo custo, com compatibilidade com diversos tipos de soluto e transparente no UV.

Para Collins et al. (p. 283, 2006), na CL a “fase estacionária está quimicamente ligada à superfície de um suporte”, assim o pode ser eliminado a questão da solubilidade da fase estacionária em fase móvel. A adsorção ocorre como parte da ação de grupos ativos polares.

Existem dois grupos de seletividade, os polares e os apolares. Faz parte do grupo polar o grupo nitrilo (-CN), no grupo apolar, dentre as fases estacionárias uma das mais utilizadas é a de Octadecilsilano (C18), uma fase estacionária de baixa polaridade, utilizada na fase reversa além dos grupos octil (-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>), fenil (-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) e outros (COLLINS et al, 2006).

Collins et al. (2006), confirma que os grupos apolares tem auxiliado na resolução de problemas relacionados as soluções, a técnica de fase reversa, contribui para a separação de algumas classes, como as das vitaminas, antibióticos, álcoois, dentre outras. Essa técnica também pode ser utilizada para separação de ácidos e bases, se anexados a uma fase móvel com pH de 2 a 8.

Maldaner et al. (2010) afirma que, a fase estacionária, além de auxiliar na resistência térmica fator diretamente ligado à degradação da Vitamina C, acontece em conformidade com o tamanho do analito e por possuir uma faixa pequena em relação a área superficial.

De acordo com Da Rosa et al. (2007), a análise da Vitamina C por CL “é utilizado atualmente devido a sua inerente capacidade de eliminação de interferentes e facilidade de preparo da amostra”

#### 4.5.1.1 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os Limites de Detecção e Limite de Quantificação, são utilizados na cromatografia líquida para a determinar a validação do método utilizado, além de enfatizar a sensibilidade.

O Limite de Detecção (LD), caracteriza a menor concentração do analito a ser detectada, mas não quantificada. O método da relação de sinal-ruído para determinar o LD pode ser utilizado apenas em metodologias analíticas que possuem o ruído na linha de base (BRITO et al, 2013).

Nesse método é realizada uma comparação entre um branco (sem presença de amostras) e a com as amostras com a menor concentração conhecida. Através do LD é detectado a menor concentração da substância a ser analisada. A relação do sinal-ruído é de 3:1, onde encontra-se aceitável para estimar esse limite (RIBANI et al., 2004).

O Limite de Quantificação (LQ), determina a menor concentração a ser quantificada da substância analisada. Assim como no LD, é utilizado por meio da concentração, porém no LQ exige a precisão e exatidão. Ao determinar a concentração através do LQ a medição se torna menos precisa, para uma melhor precisão é necessário aumentar a concentração registrada (BRITO et al, 2013).

O Limite de Quantificação utiliza os mesmos parâmetros que no método do LD, com a amostra de menor concentração encontrada do analito comparando com o branco, alterando apenas a relação. A relação do sinal-ruído em LQ é de 10:1 (RIBANI et al., 2004).

#### 4.5.2 Titulação

Dentre os métodos analíticos, a titulação é muito utilizada para determinar a concentração de um reagente desconhecido e por ser uma técnica de baixo custo.

Esse método de titulação volumétrica é baseado no volume medido de uma solução de amostra com concentração conhecida (solução padrão), que reage completamente com o analito. Consiste na adição de uma solução padrão em uma bureta e uma solução de analito, dosando a solução padrão até que a reação seja completa entre os dois (SKOOG et al., 2006).

Para as análises de Vitamina C, a mais utilizada é a titulação de oxidorredução, reação em que ocorre a transferência de elétrons e onde é necessário que o analito esteja apenas em um estado de oxidação. Porém, nos momentos que antecedem a titulação, alguns fatores convertem o analito em mais um estado de oxidação (SKOOG et al., 2006).

O processo de oxidação envolve a perda de elétrons por parte de uma substância, enquanto que a redução envolve um ganho de elétrons para a espécie química em consideração. Esta perda ou ganho de elétrons, formalmente, é indicada pela variação do número de oxidação de várias espécies envolvidas na reação (BACCAN et al, 2001).

Segundo Baccan et al. (2001), os métodos de análise volumétricos de oxidação-redução consistem em reações lentas que dependem dos processos e da semi-reações que estão envolvidas. A estabilidade dos agentes redutores e oxidantes devem permanecer estáveis no solvente (normalmente água) usado na análise, em que a substância a ser analisada deve estar em estado oxidado. Os reagentes não devem ter interferência no ponto final da análise, por isso são adicionados em excesso no meio reagente, com a função de oxidar ou reduzir a amostra.

Na volumetria de oxirredução, encontra-se a titulação de iodometria, que consiste na oxidação dos íons iodeto ou a redução de iodo. É uma reação reversível, que deve controlar o pH da solução, para que seja possível titular o iodo em sua forma reduzida e oxidada. O pH dessa reação encontra-se entre 4 e 9, com o decréscimo do pH a velocidade da reação aumenta e quando exposto a luz (BACCAN et al, 2001).

O iodo é utilizado para determinar os redutores fortes, porém é um oxidante fraco. A semi-reação tem a presença do  $I_3^-$  que é íon triiodeto, que são obtidas em

uma solução de iodeto de potássio concentrada através da dissolução do iodo. Segue a semi-reação energia padrão de 0,536 V (1) de acordo com Skoog et al. (2006):



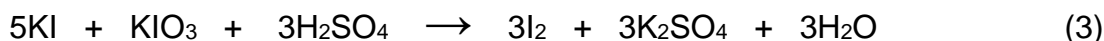
Skoog et al. (2006), explica que a solubilidade do iodo em água (0,001 mol L<sup>-1</sup>), não é adequada nas concentrações analíticas. O iodo tem uma solubilidade razoável em iodeto de potássio com constante eletrostática de 7,1x10<sup>2</sup> N·m<sup>2</sup>/C<sup>2</sup>, de acordo com a reação (2):



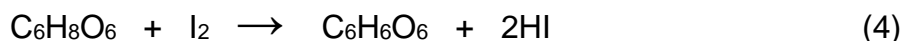
O iodo se dissolve lentamente em soluções de iodeto de potássio, particularmente se a concentração de iodeto for baixa. Para garantir a completa dissolução, o iodo sempre é dissolvido em um pequeno volume de uma solução concentrada de iodeto de potássio, tomando-se o cuidado de se evitar a diluição da solução concentrada até que o último traço de iodo sólido tenha desaparecido (SKOOG et al., 2006).

Para Skoog et al. (p. 530, 2006), as titulações que envolvem o iodo, utiliza-se uma suspensão do amido, como indicador. “A cor azul intensa que se desenvolve na presença de iodo é creditada à absorção do iodo pela cadeia helicoidal da β-amilose”. Isso indica a decomposição do amido quando em soluções com alta concentração de I<sub>2</sub>.

Na titulação por oxidorredução, é muito utilizado o iodato de potássio (KIO<sub>3</sub>), que possui propriedades de padrão primário, a ser obtido em alto grau de pureza por recristalização em água, utilizado como titulante. A sua reação é dada por (3) (VILLELA e PECCI, 1943):



O iodo molecular I<sub>2</sub> em presença do íon iodeto I<sup>-</sup> forma o íon I<sub>3</sub><sup>-</sup> (2). O triiodeto que foi gerado na solução é o reagente titulante que vai reagir com o ácido ascórbico (VILLELA e PECCI, 1943).



O iodo atua na reação (4) como oxidante, de maneira a oxidar o ácido ascórbico até ácido dehidroascórbico. A Vitamina C é rapidamente oxidada pelo próprio oxigênio dissolvido na solução, assim as amostras devem ser analisadas o mais rápido possível depois de dissolvidas (VILLELA e PECCI, 1943).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 MATERIAL

#### 5.1.1 Amostras

Foram utilizados para análise, sucos de fruta *in natura* e industrializados: laranja, limão e tangerina. Adquiridos no comércio local da cidade de Londrina/PR. Para os sucos *in natura* foram utilizadas laranjas pera, limões taiti e tangerinas nacionais e importadas. Os sucos industrializados foram sucos integrais, bebidas adoçadas e sucos em pó de marcas distintas.

#### 5.1.2 Reagentes

Para as análises foram utilizados os seguintes reagentes: água destilada, água ultra pura (Milli-Q), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), iodeto de potássio (KI), iodato de potássio ( $\text{KIO}_3$ ), amido ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ )<sub>n</sub>, padrão de ácido L-ascórbico (Vitamina C), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) grau HPLC.

#### 5.1.3 Vidrarias

Para as análises foram utilizadas as seguintes vidrarias: bureta 25 mL, béqueres 1000, 250, 100, 50 mL, Erlenmeyer 250 mL, pipetas volumétricas 1, 2 e 20 mL, funil, bastão de vidro e balão volumétrico com capacidade de 10, 50 e 500 mL.

#### 5.1.4 Consumíveis

Nos elementos consumíveis estão presentes os outros materiais utilizados: espátula, pera, papel filtro descartável, filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ , pipeta automática com ponteira capacidade de 100-1000 $\mu\text{L}$ , pipetas Pasteur, filtro de seringa de 13mm com partículas de 0,45 $\mu\text{m}$ , coluna de fase reversa C18 (250mm x 4,6mm com partículas de 5 $\mu\text{m}$ ) e C8 (250mm x 4,6mm com partículas de 5 $\mu\text{m}$ ).

### 5.1.5 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: freezer, estufa, balança analítica, pHmetro, Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000 – Thermo Scientific com detecção UV-Vis.

#### 5.1.5.1 Cromatógrafo Líquido

Para a obtenção dos cromatogramas, foi utilizada uma Estação de Trabalho Cromatográfica Ultimate 3000 da Thermo Scientific (Figura 4), com programa de gerenciamento Chromeleon contendo: bomba de pistão recíprocante com quatro vias; injetor automático com alça de amostragem de 20  $\mu\text{L}$ ; detector espectrofotométrico com arranjo de fotodiodos e coluna cromatográfica C18 (250mm x 4,6 mm com partículas de 5  $\mu\text{m}$ ) e C8 (250mm x 4,6mm com partículas de 5 $\mu\text{m}$ ), localizado no laboratório K13 da UTFPR, câmpus Londrina.

**Figura 4** – Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000.



**Fonte:** (Thermo Fischer Scientific).

## 5.2 MÉTODOS

### 5.2.1 Preparo das amostras

As análises foram realizadas por método cromatográfico em duplicata e titulométrico em triplicata, no qual foram analisados os sucos de laranja, limão e tangerina.

As amostras de sucos frescos *in natura* foram previamente preparados através de um espremedor de frutas caseiro, uma parte desta amostra foi batida em liquidificador para análise em cromatografia e para a titulação utilizou-se da amostra sem bater, as duas amostras não possuíam adição de água ou açúcar e foram armazenados em garrafas de vidro âmbar, já higienizadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

As amostras dos sucos industrializados, seguiram as recomendações de consumo da embalagem, que indicam que os sucos já estão prontos para consumo, necessitando apenas de agitação, essas embalagens foram abertas no primeiro dia de análise. Foram analisados dois sucos industrializados de marcas diferentes, em que um fornecia a informação de suco integral do sabor laranja e no outra a embalagem fornecia a informação de bebida adoçada do sabor limão e bebida adoçada sabor tangerina.

Os sucos em pó, foram preparados de acordo com as instruções da embalagem. Todos foram preparados para 1L de água destilada, sem adição de açúcar, agitando até sua completa dissolução.

Todas as amostras foram armazenadas em refrigerador e submetidas a análises de Vitamina C durante 21 dias, sendo analisadas em intervalos de tempo, no dia do preparo e aberturas das embalagens (dia 0), após 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias.

### 5.2.2 Preparo do padrão de ácido L-ascórbico

A preparação do padrão foi realizada em todos os dias de análise, através do Ácido Ascórbico padrão com a dissolução em água ultra pura, com concentrações de 5, 20, 30 e 50 mg.L<sup>-1</sup>.



### 5.2.3 Análises Físico-Químicas

As análises foram realizadas em cada uma das amostras, em todos os dias determinados para os testes, medindo o pH das amostras e a temperatura do refrigerador.

### 5.2.4 Determinação da Vitamina C – Titulação Iodométrica

Foi determinado o teor inicial de Ácido Ascórbico nos sucos *in natura* e industrializado, em todos os dias pré-estabelecidos. No suco *in natura* e em pó foi analisado imediatamente após o preparo, no suco industrializado foi determinado o teor de Vitamina C após a abertura da amostra, todas amostras foram analisadas em triplicata.

Anterior a análise titulométrica foi necessário o preparo da solução padrão de  $\text{KIO}_3$ . Em cada dia de análise foi preparado o indicador e a solução de iodeto de potássio, apresentados nos itens (5.2.4.1), (5.2.4.2) e (5.2.4.3).

Para a análise volumétrica, em um erlenmeyer 250 mL foi adicionado 20 mL de suco e 2 mL de ácido sulfúrico a 20% (v/v). Após acidificar a amostra foi adicionado 1 mL da solução de iodeto de potássio e 1 mL da solução de amido a 1%. Foi titulado imediatamente com uma solução de iodato de potássio  $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ . Ao final da titulação ocorreu o aparecimento da cor azul intenso ou marrom, levando em consideração a coloração natural do suco a ser analisado, de acordo com as reações (3) e (4) apresentadas anteriormente.

#### 5.2.4.1 Preparo da solução de amido 1% (m/v)

Foi adicionado um pouco de água destilada em temperatura ambiente em aproximadamente 0,5000g de amido solúvel previamente pesado, formando assim uma pasta. Após a formação da pasta, foi adicionado 50 mL de água em ebulição em agitação constante. Ao atingir a temperatura ambiente, essa solução foi inserida em um balão de 50 mL e foi acrescida água até atingir a linha do menisco.

#### 5.2.4.2 Preparo da solução de iodeto de potássio (KI)

Foi adicionado 3,0000g de KI p.a em um balão volumétrico de 50 mL, em seguida, adicionou-se água destilada para homogeneização e completou-se o volume do balão até atingir a linha do menisco.

#### 5.2.4.3 Preparo da solução padrão de iodato de potássio (KIO<sub>3</sub>)

Para o preparo da solução de iodato de potássio com concentração de 0,005 mol.L<sup>-1</sup>, foi pesado quantitativamente em um béquer de 50 mL, a quantidade de 0,5336g de KIO<sub>3</sub> a 99% sendo previamente seco em estufa a 180°C. Dissolveu-se em água destilada e transferiu-se para um balão volumétrico de 500 mL completando o volume com água até o menisco. Homogenizou-se a solução após o término, e transferiu-se para um frasco de vidro âmbar, limpo e seco.

#### 5.2.5 Preparo das amostras para a análise cromatográfica

As amostras foram centrifugadas duas vezes por 5 minutos em tubo falcon para obtenção de uma amostra mais límpida. As amostras do suco *in natura* e industrializado foram diluídas em água ultra pura 1:10 (v/v), apenas as amostras de suco em pó tiveram que ser diluídas 2:10 (v/v) em virtude do limite de detecção. Após a diluição passaram por filtros de seringa de 13mm com porosidade de 0,45µm. As amostras filtradas foram acondicionadas em vials e inseridas no cromatógrafo para análise.

#### 5.2.6 Determinação da Vitamina C – Cromatografia Líquida

A análise cromatográfica foi realizada utilizando duas colunas de fase reversa: uma coluna C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula) e a C8 (250mm x 4,6mm com partículas de 5µm), com um volume de injeção de 20 µL das amostras e da solução padrão com concentrações de: 5, 20, 30 e 50 mg L<sup>-1</sup>.

A vazão da fase móvel foi de  $0,5 \text{ mL minuto}^{-1}$ , com o comprimento de onda 254 nm na região do UV.

De acordo com Collins et al. (2006), a fase móvel utilizada para uma coluna reversa deve estar com o pH entre 2,0 a 8,0. A partir das informações coletadas, optamos por uma solução com o pH acima do que foi utilizado por Alves et al. (2001), em que utilizou-se uma fase com o pH 2,5. Posterior a estudos e testes realizados para determinação da escolha de uma fase móvel adequada para análise de Vitamina C, obteve-se um melhor resultado com uma eluição isocrática constituída de água ultra-pura (Mili-Q) com ajuste de pH para 3,0 com uma solução de ácido sulfúrico 1% (v/v).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados quatro tipos distintos para todos os sabores de suco: *in natura*, *in natura* batido, industrializado e o suco em pó.

Nas amostras do suco de todos os sabores *in natura* batido, foram homogeneizados as amostras do suco *in natura* no liquidificador por 2 min, pois com as análises por cromatografia foi possível observar a diferença de concentração com o suco *in natura*.

Os resultados foram obtidos por meio dos métodos de titulação iodométrica e cromatografia líquida.

Devido a um problema técnico com a coluna C8, as análises foram realizadas duas vezes em períodos distintos. No segundo período de análises, foi utilizado uma coluna C18 por motivo de que a Vitamina C possui maior interação com a coluna. Nesse segundo período as análises de titulação foram realizadas em apenas 4 dias aleatórios para delinear a concentração de Vitamina C, pois as amostras analisadas anteriormente já demonstravam o caráter de delineamento necessário para definição do decaimento da concentração.

Foram realizados análises físico-químicas para o controle de temperatura e pH, em que a temperatura do refrigerador manteve-se em 1<sup>o</sup> C durante os 21 dias e o resultado do controle de pH está disposto nos gráficos encontrados nas Figuras 5, 6 e 7.

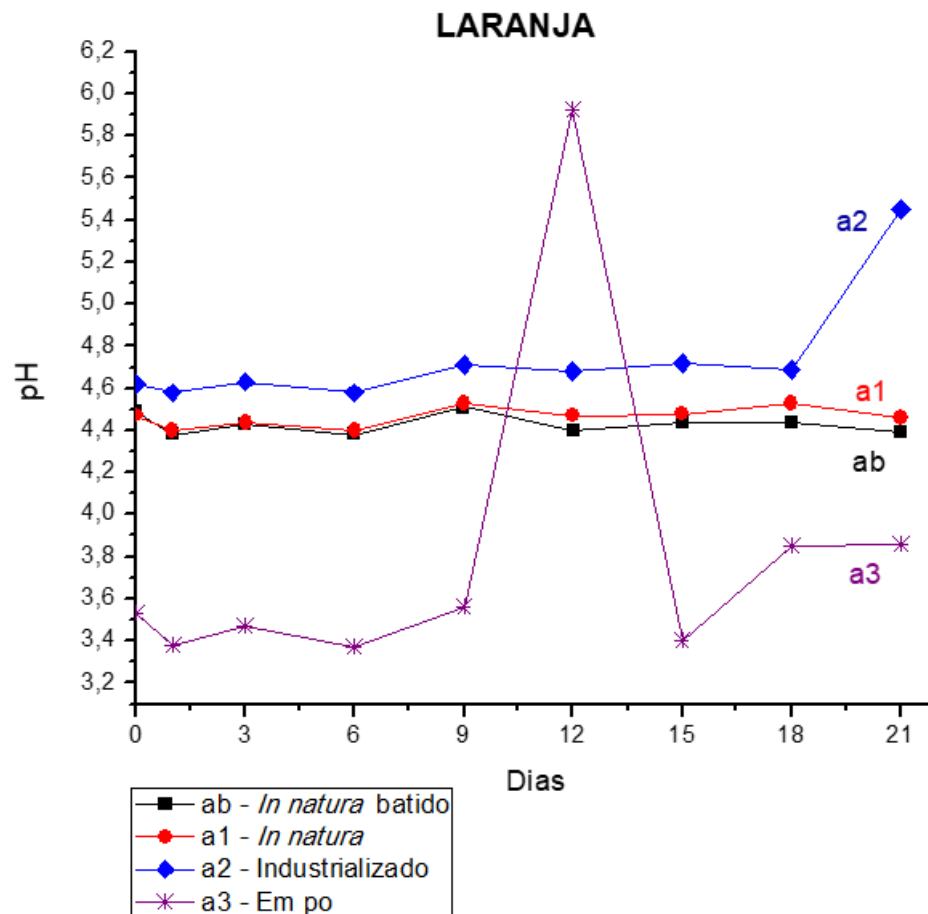
Através dos gráficos, é possível observar a alteração de pH do decorrer dos dias, para todos os tipos e sabores de suco delineamento do perfil de cada um dos sabores. Sabe-se que o pH é um dos fatores que auxiliam na degradação da Vitamina C.

De acordo com Lima et al (2007), a Vitamina C permanece mais estável em meio ácido e possui uma certa instabilidade em meio alcalino.

## 6.1 CONTROLE DE pH

O gráfico de controle de pH do suco de laranja demonstra os valores de pH entre os diferentes tipos de suco. É possível observar que os valores não apresentam variação substancial entre os sucos *in natura* e o industrializado. A Figura 5 demonstra o controle de pH do suco de laranja.

**Figura 5 – Gráfico de controle de pH suco de laranja.**



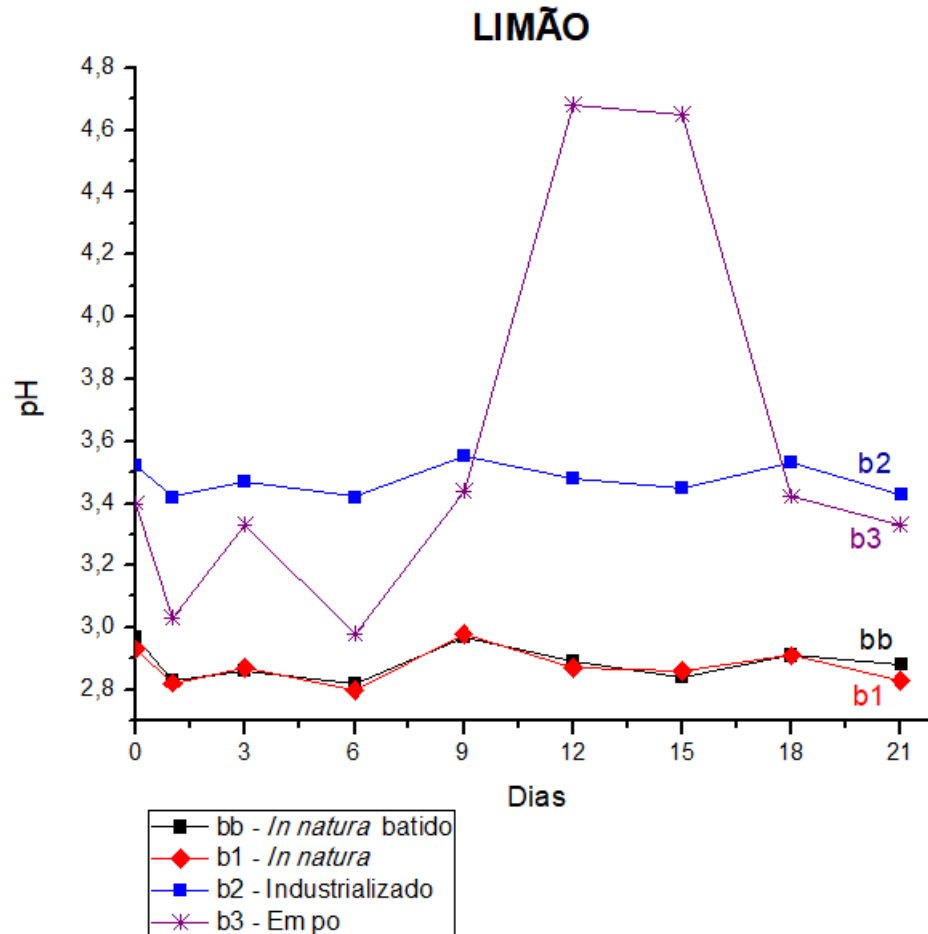
**Fonte:** Autora, (2018).

Apenas no dia 12 que ocorreu uma variação significativa do pH no suco em pó, variou de 3,6 para 6,0, porém no dia 15 observa-se que o pH voltou ao seu perfil anterior, finalizando um pouco acima do dia de preparo.

Observa-se que o suco industrializado analisado possui o pH próximo do *in natura*, a embalagem traz informações que indicam ser um suco integral e sem conservantes. Essa informação explica a proximidade dos valores de pH.

A variação do pH do suco de limão possui o mesmo perfil encontrado no suco de laranja, o suco em pó tem a mesma variação encontrada no suco de laranja em pó, o que constata uma característica encontra apenas para esse tipo de suco. Na Figura 6 verifica-se o controle de pH para o suco de limão.

**Figura 6 – Gráfico de controle de pH suco de limão.**

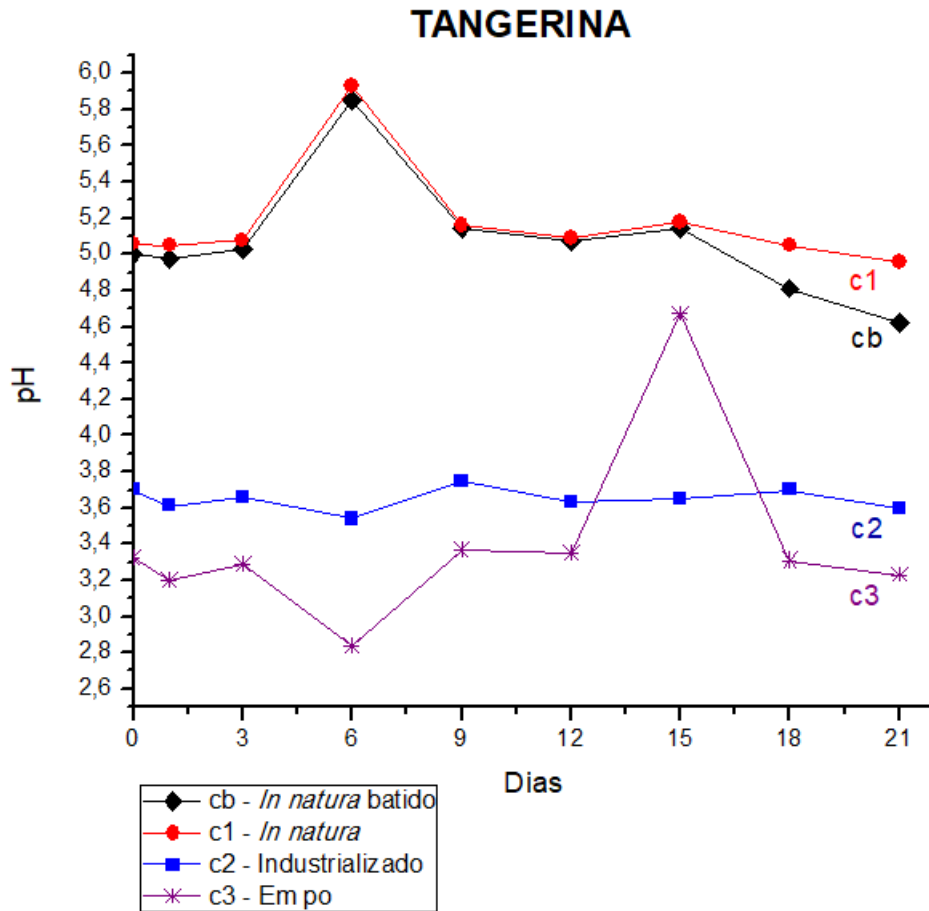


Fonte: Autora, (2018).

O pH das amostras variam de 2,8 a 3,6 com exceção da amostra b3 em que foi encontrada uma variação nos dias 12 e 15. Esses valores são abaixo dos valores encontrados no sabor de laranja demonstrando sua maior acidez.

Os valores de pH obtidos nas análises do suco de tangerina *in natura* variam consideravelmente em relação aos sucos industrializados e em pó. Essa variação ocorre entre 2,8 e 5,9. A Figura 7 apresenta o gráfico de controle do pH do suco de tangerina que demonstra um perfil semelhante para o suco da figura 5.

**Figura 7 – Gráfico de controle de pH suco de tangerina.**



**Fonte:** Autora, (2018).

As amostras cb e c1 possuem o mesmo perfil, assim como nos outros sabores de suco, evidenciando que independente da amostra ser batida ou não, o pH não altera significativamente.

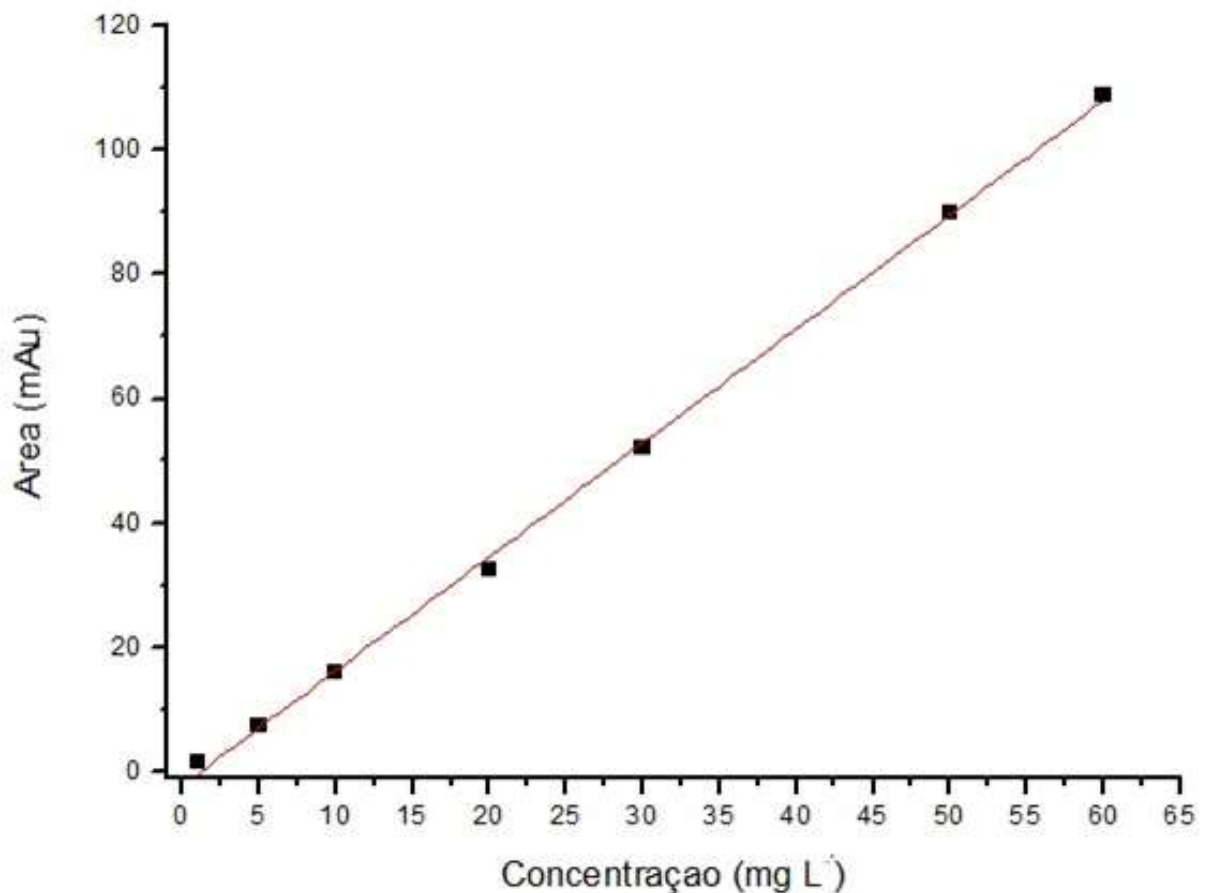
O suco em pó aumenta apenas do dia 15, mantendo o perfil encontrado em todos os suco em pó anteriores.

As amostras do suco industrializado de tangerina e limão possuem o mesmo perfil e valor de pH, essas amostras são da mesma marca e trazem em seus ingredientes que possuem conservantes que podem influenciar na demonstração da igualdade dos valores de pH independente dos sabores. Nos sucos em pó também observa-se os valores de pH aproximados independente da diferença de sabores.

## 6.2 CURVA ANALÍTICA DA VITAMINA C

A curva analítica (Figura 8) foi realizada com a Vitamina C padrão, os pontos foram determinados para as seguintes concentrações: 1, 5, 10, 20, 30, 50 e 60 mg.L<sup>-1</sup>.

**Figura 8** - Curva analítica da Vitamina C.



Fonte: Autora, (2018).

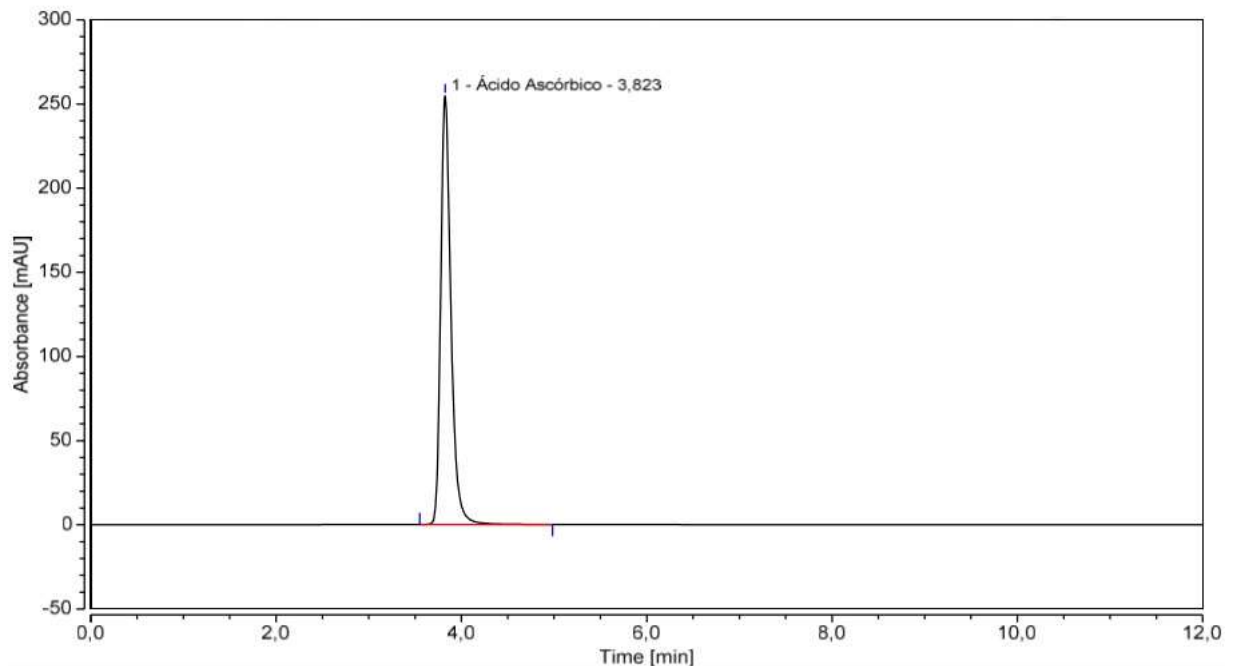
Para a construção da curva de calibração é necessário que os pontos de concentração a serem analisados passem o mais próximo possível da curva (PIMENTEL e BARROS, 1996). Na elaboração dessa curva se fez necessário medir a resposta do instrumento para sete amostras do padrão de Vitamina C com diferentes concentrações. A escolha dessas concentrações foi através do sinal encontrado nos testes realizados com as amostras anteriormente ao dias



determinados de análise. Para a curva analítica utilizou-se da determinação dos padrões nas concentrações estabelecidas obtendo a área relacionada para cada concentração determinada, atingindo com um valor de R de 0,9950, e com a equação da reta  $y=(-2,0)+1,82x$  e um limite de detecção de  $0,5\text{mg.L}^{-1}$  e de quantificação de  $2,5\text{mg.L}^{-1}$  confirmando o ajuste da equação da reta aos analisados experimentalmente. Através da equação da reta encontrada na curva de calibração é possível encontrar a concentração real da amostra.

A Figura 9 demonstra o cromatograma de um dos pontos utilizados para obtenção da curva de calibração.

**Figura 9** – Cromatograma do padrão de Vitamina C  $20\text{mg.L}^{-1}$ . Condições: Fase móvel água Milli-Q ajustado pH 3,0, injeção de  $20\ \mu\text{L}$  e coluna cromatográfica C18.



Fonte: Autora, (2018).

O cromatograma representa apenas um dos pontos obtidos para a curva de calibração, com uma concentração de  $20\text{mg.L}^{-1}$  do padrão de Vitamina C.

A partir da análise cromatográfica obteve-se o pico de Vitamina C com o tempo de retenção de 3,623.

### 6.3 LARANJA

Todos os resultados obtidos para a concentração de Vitamina C nos sucos de laranja estão dispostas nas Tabelas 3 a 6 e os cromatogramas do dia 0 e 21 estão na Figura 8 e 9.

Na Tabela 3 consta os dados de titulação encontrados no primeiro período de análise.

**Tabela 3** - Concentração de Vitamina C do suco de laranja em mg.L<sup>-1</sup> por titulação iodométrica.

Sucos Dias	<i>In Natura</i>	Industrializado	Em pó
0	380,76	332,62	80,53
1	363,26	329,12	73,53
3	354,50	308,11	73,53
6	341,37	299,00	63,02
9	328,24	281,85	52,52
12	315,11	269,59	40,26
15	304,17	262,59	29,76
18	299,79	252,09	10,50
21	299,79	245,09	10,50

Fonte: Autora, (2018).

A titulação no primeiro período de análises delineou o processo de oxidação da Vitamina C. As análises foram feitas nos mesmos dias das análises por cromatografia para efeito de comparação entre os resultados.

No segundo período de análises houve uma mudança em diversos tipo de suco, dentre eles o suco de laranja em pó foi alterado com a intenção em analisar outra marca, devido ao baixo teor de Vitamina C encontrado na marca analisada.

Ao analisar os dados obtidos, observa-se um declínio no suco *in natura* próximo ao encontrado no suco industrializados, se comparado com o suco em pó onde obteve-se a porcentagem declínio da Vitamina C de 21, 26 e 87%, respectivamente.

O suco industrializado por ser integral e sem conservantes, tem o mesmo declínio do *in natura* por meio do teste titulométrico.

A Tabela 4 traz informações obtidas na análise por cromatografia, em consequência de problemas encontrados na análise já esclarecido previamente, não obteve-se resultados de todos os dias de análise demonstrados por um asterisco (\*).

**Tabela 4 – Concentração de Vitamina C do suco de laranja em mg.L<sup>-1</sup> por CL.**

Sucos Dias	<i>In Natura</i> (batido)	<i>In Natura</i>	Industrializado	Em pó
0	*	*	*	*
1	417,78	440,35	362,36	171,23
3	441,32	461,39	362,79	120,05
6	430,03	452,84	336,31	107,23
9	427,92	432,96	315,73	58,39
12	363,69	373,26	265,66	16,22
15	*	*	*	*
18	*	*	*	*
21	*	*	*	*

**Fonte:** Autora, (2018).

Embora não seja possível analisar todos os dados, dentre os valores de concentração encontrados, obtém-se a porcentagem calculadas através dos dados do dia 1 ao dia 12, no suco *In natura* (batido), *In natura*, industrializado e em pó, foram encontradas as porcentagem de decaimento da Vitamina C de: 13, 15, 26 e 90%, respectivamente. Por meio cromatográfico também é possível observar a redução do teor de Vitamina C, apenas o dado do dia 1 do suco *in natura* obteve-se um valor não satisfatório quando comparado com os demais.

Nos métodos de titulação e de cromatografia encontra-se porcentagens próximas para o suco industrializado e em pó. O suco *in natura* encontra valores destoantes ao serem comparado com o método de titulação, com o total de 11% da diferença.

Na Tabela 5 observa-se dados obtidos no segundo período de análise.

**Tabela 5** - Concentração de Vitamina C do suco de laranja em mg.L<sup>-1</sup> por titulação iodométrica.

Sucos Dias	<i>In Natura</i>	Industrializado	Em pó
0	447,31	394,68	103,06
6	420,99	333,29	83,32
12	407,84	287,24	74,55
21	368,37	241,20	52,63

Fonte: Autora, (2018).

Nos dados obtidos por titulação que estão na Tabela 5, observa-se assim como por meio da titulação anterior Tabela 3, que a concentração possui o mesmo perfil e decai com o passar dos dias.

Entretanto, quando comparado com a Tabela 3 observa-se valores distintos para todos os tipos de sucos analisados, no suco *in natura* foi realizado com a mesma espécie de laranja, no industrializados também permaneceu com a mesma marca, apenas no suco em pó que houve a alteração de marca com a intenção de analisar um suco com uma maior concentração de Vitamina C.

A porcentagem de decaimento encontrado para os sucos de laranja foi de: 18% para o suco *in natura*, 39% para o suco industrializado e 49% para o suco em pó.

Sabe-se que Vitamina C oxida na presença de oxigênio e luz, com as análises em apenas quatro desses dias as vidrarias em que estavam armazenadas não foram abertas com tanta frequência como no primeiro período das análises, com isso os valores não possuem um valor significativo de declínio.

A Tabela 6 apresenta os resultados de cromatografia líquida do segundo período de análise, realizado com a coluna C18.

**Tabela 6** - Concentração de Vitamina C do suco de laranja em mg.L<sup>-1</sup> por CL.

Sucos Dias	<i>In Natura</i> (batido)	<i>In Natura</i>	Industrializado	Em pó
0	444,79	398,46	332,31	190,48
1	388,46	371,58	281,92	161,27
3	*	*	*	*
6	379,81	358,03	236,71	117,90
9	360,64	374,18	192,18	34,48
12	*	386,75	152,32	10,16
15	254,43	291,76	79,83	NQ
18	225,35	280,25	58,15	NQ
21	170,25	233,37	NQ	NQ

NQ – Não quantificado

Fonte: Autora (2018).

Os dados da Tabela 6, contém os dados que foram analisados dos sucos de laranja. No dia 3 de análise, não foram encontrados resultados aceitáveis devido a problemas técnicos no aparelho de cromatografia líquida, porém é possível observar que os resultados possuem um perfil de decaimento da concentração.

Os outros dados de concentração do suco industrializado e em pó que possuem asterisco (\*) são os valores que não foram possíveis serem detectados devido ao limite de detecção o equipamento.

Existe uma diferença na concentração dos sucos *in natura* e *in natura* (batido) no dia da abertura da amostra, mas o decaimento da concentração é observado na mesma proporção. Com o suco *in natura* é observa-se que esse valor de Vitamina C permanece por mais tempo com uma concentração maior. Diferença da concentração entre o suco batido e o *in natura*, deve-se a quebra da matriz da Vitamina C, diminuindo então a sua superfície de contato facilitando sua degradação através do processo de oxidação. O resultado do *in natura* (batido) do dia 12 não foi obtido, por alguma interferência na amostra não detectada.

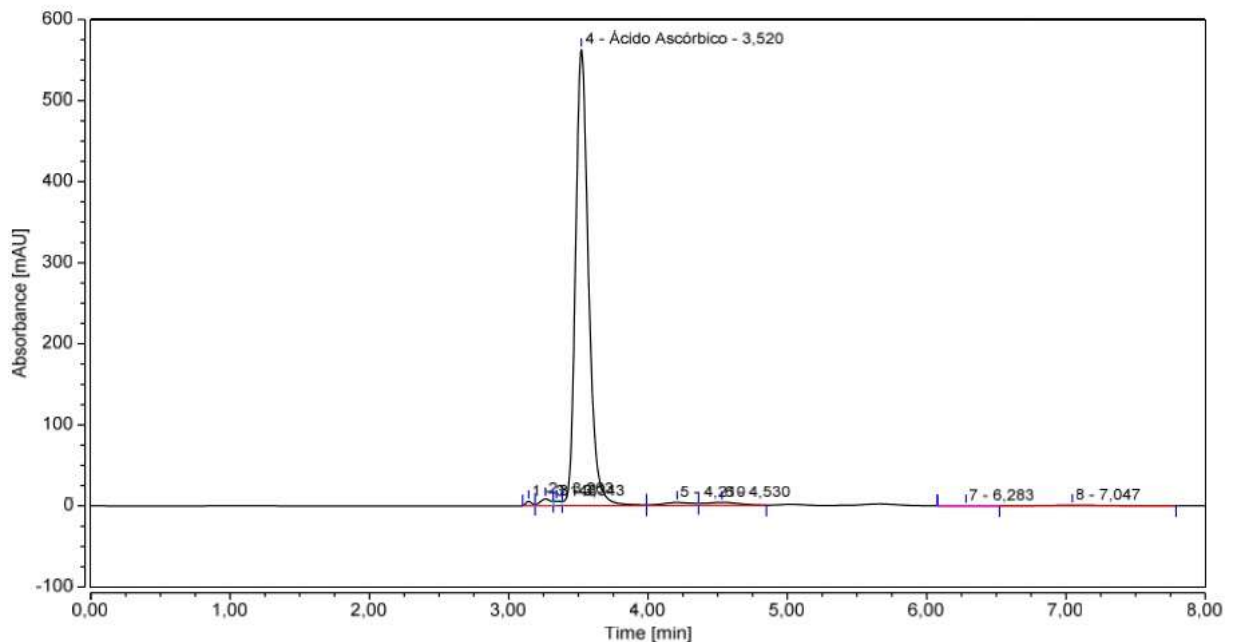
Os suco industrializados e em pó apresentam uma degradação significativa em um tempo menor. No industrializado, apesar da sua degradação a concentração permanece detectável até o 18º dia, sua concentração inicial é próxima do suco *in natura*, mas se degrada com maior facilidade em um pequeno período de dias, essa

diferença é analisada logo no dia 1. Já o suco em pó, não é mais detectável a partir do 12º dia, no dia da abertura da amostra é notável a diferença de concentração quando comparada com os outros sucos.

O decaimento da vitamina C encontrada para os sucos de laranja por cromatografia foram de: 62% no suco de *in natura* (batido), 37% para o suco *in natura*, 82% no suco industrializado e de 95% para o suco em pó.

Através das Figuras 10 e 11 é possível observar os cromatogramas obtidos através da análise em CL no segundo período analisado com a coluna C18.

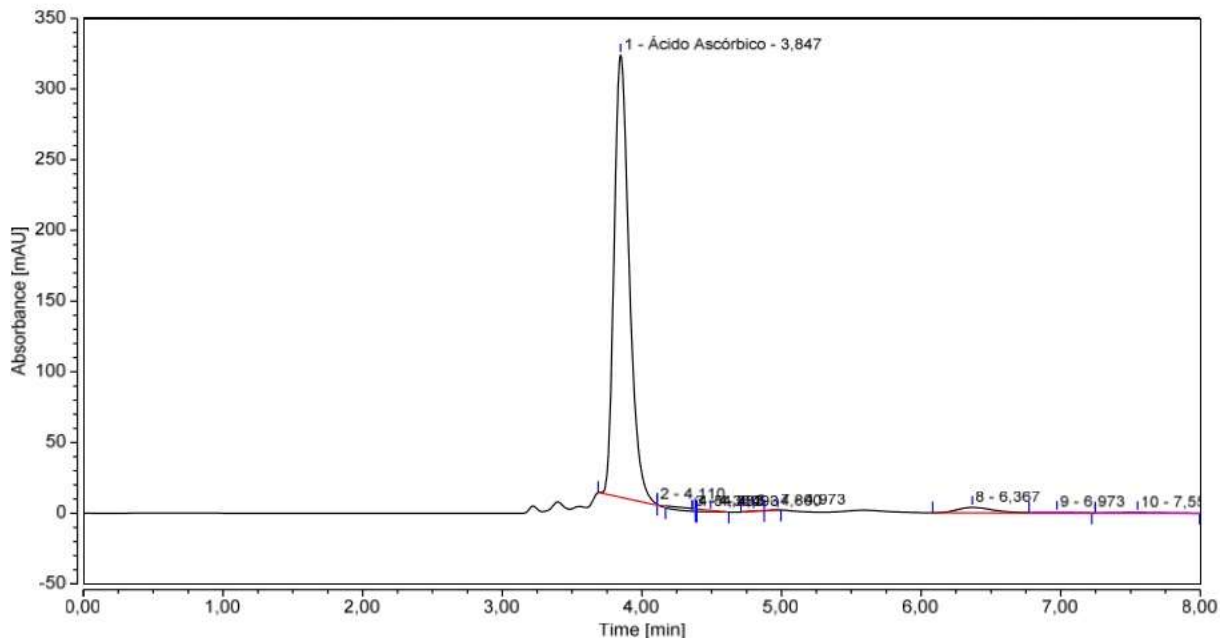
**Figura 10** – Cromatograma do suco de laranja *in natura* do primeiro dia de análise (dia 0). Condições: Fase móvel água Milli-Q ajustado pH 3,0, injeção de 20 µL e coluna cromatográfica C18.



Fonte: Autora, (2018).

O cromatograma do suco de laranja *in natura* demonstra o pico da concentração encontrada no dia do preparado da amostra. Esse pico possui uma área de 60,75 (mAU) e um tempo de retenção de 3,52 minutos.

**Figura 11** – Cromatograma do suco de laranja *in natura* do dia último de análise (dia 21). Condições: Fase móvel água Milli-Q ajustado pH 3,0, injeção de 20  $\mu$ L e coluna cromatográfica C18.



Fonte: Autora, (2018).

O cromatograma do suco de laranja *in natura* do último dia de análise demonstra o pico da concentração encontrada com uma área de 38,11 (mAU) e um tempo de retenção de 3,85 minutos, o que demonstra o decaimento do teor de vitamina C do suco de laranja.

#### 6.4 LIMÃO

Os dados obtidos para amostra de limão estão dispostos nas Tabelas 7 a 10 e nas Figuras 10 e 11 através dos cromatogramas.

A Tabela 7 demonstra os resultados de concentração da Vitamina C encontrados na primeira análise realizada.

**Tabela 7** – Concentração de Vitamina C do suco de limão em mg.L<sup>-1</sup> por titulação iodométrica.

Sucos Dias	<i>In Natura</i>	Industrializado	Em pó
0	315,11	N/Q	39,39
1	288,85	N/Q	N/Q
3	273,54	N/Q	N/Q
6	271,35	N/Q	N/Q
9	256,03	N/Q	N/Q
12	229,77	N/Q	N/Q
15	205,69	N/Q	N/Q
18	183,82	N/Q	N/Q
21	172,87	N/Q	N/Q

N/Q – Não quantificado

Fonte: Autora (2018).

Com os dados da Tabela 7 é possível observar que as concentrações de Vitamina C no suco limão *in natura* está abaixo da concentração encontrada nos alimentos descrita na tabela 2. A concentração menor pode ser avaliada pela espécie do limão que foi adquirido, visto que sua composição pode ser alterada de acordo com a região em que foi produzida.

Verifica-se que o valor do dia 0 para o dia 1 foi o que possui o declínio mais acentuado, após esse dia permanece com o declínio constante. O limão *in natura* confirma o declínio de concentração de Vitamina C, assim como no suco de laranja, com a diferença de porcentagem do declínio, onde no limão foi encontrado 45%, levando em consideração a acidez maior presente no limão.

Na primeira etapa de análise, no suco industrializado não foi alcançado uma concentração detectável por meio da técnica titulação, diante disso não existem dados para parâmetro com a cromatografia.

No suco em pó de sabor limão, também não foi possível obter dados, apenas no dia de abertura de amostra em que se obteve o valor 39,39 mg.L<sup>-1</sup>, após esse dia não foi possível observação a concentração por método de titulação.



A Tabela 8 demonstra os resultados de cromatografia do primeiro período de análise com a coluna C8.

**Tabela 8** - Concentração de Vitamina C do suco de limão em mg.L<sup>-1</sup> por CL.

Sucos Dias	<i>In Natura</i> (batido)	<i>In Natura</i>	Industrializado	Em pó
0	*	*	*	*
1	338,99	337,77	48,02	86,61
3	316,61	343,95	*	88,00
6	282,91	282,94	45,89	55,61
9	241,32	293,79	43,92	24,72
12	162,59	216,82	13,45	*
15	*	*	*	*
18	*	*	*	*
21	*	*	*	*

Fonte: Autora (2018).

Assim como no suco de laranja, não existem os dados do primeiro dia de análise e dos dias 15, 18 e 21, devido a problemas técnicos com a coluna.

Os resultados são satisfatórios quando comparados com o método titulométrico, a sensibilidade do método cromatográfico permitiu obter resultados para o industrializado e em pó que não foi obtido na titulação iodométrica.

O decaimento da concentração da Vitamina C nos sucos de limão *in natura* (batido), *in natura*, industrializado e em pó, são respectivamente: 52%, 36%, 72% e 71%. Não existem dados para efeito de comparação com a titulação para todos os tipos de suco, apenas do suco *in natura*, mas não deve-se levar em consideração pela falta de todos os resultados em CL.

A Tabela 9 apresenta os dados de concentração por titulação do suco de limão, nessa segunda etapa de análises os sucos industrializado e suco em pó foram diferentes da primeira etapa, com isso foram alcançados valor de concentração detectáveis.

**Tabela 9** – Concentração de Vitamina C do suco de limão em mg.L<sup>-1</sup> por titulação iodométrica.

Sucos Dias	<i>In Natura</i>	Industrializado	Em pó
0	317,94	210,49	89,90
6	278,47	201,73	74,55
12	212,69	195,15	54,82
21	89,90	195,15	26,31

Fonte: Autora, (2018).

Os dados de titulação do segundo período de análise foram distintos do primeiro período, pois houve alteração do suco *in natura* com a diferença de concentração, isso se deve a alteração da espécie e do produtor. Para o suco industrializado, a marca foi alterada, o suco trazia informações de ser uma bebida adoçada no sabor limão contendo Vitamina C em sua composição. A mudança do suco em pó ocorreu devido ao fato de não obter valores detectáveis para a titulação nas análises anteriores, o suco de marca diferente trazia em sua composição um valor de Vitamina C acima do encontrado no primeiro período de análise.

Para o suco de limão *in natura* espera-se um declínio da Vitamina C mais acentuado. Com a análise de pH observado na Figura 6 obtém valores de pH baixos para o suco de limão. O pH é um dos fatores que auxiliam na degradação da Vitamina C, houve um declínio de 72% da Vitamina C.

No suco industrializado obteve-se um declínio de apenas 7% provavelmente por apresentar em sua composição a presença de conservantes. No suco em pó um decaimento de 71%, porcentagem próxima a encontrada no suco *in natura*.

Na Tabela 10 encontra-se os resultados obtidos através do método de cromatografia líquida utilizando uma coluna C18, para efeito de comparação entre métodos.

**Tabela 10** – Concentração de Vitamina C do suco de limão em mg.L<sup>-1</sup> por CL.

Sucos Dias	<i>In Natura</i> (batido)	<i>In Natura</i>	Industrializado	Em pó
0	296,43	280,87	217,49	174,59
1	188,82	256,28	193,97	138,30
3	*	*	*	*
6	128,09	223,67	204,18	108,55
9	62,59	173,44	203,54	46,05
12	35,74	98,14	208,18	16,16
15	9,57*	34,49	174,53	*
18	18,58	26,91	173,76	13,54
21	7,58	10,15	181,84	3,26

Fonte: Autora, (2018).

Os dados de CL do suco de limão também não possuem os dados do dia 3, devido a problemas técnicos.

De acordo com os resultados encontrados não se obteve um decaimento contínuo, encontra-se resultados de até 60% entre as análises do dia 0 ao dia 1 e de 40% dos dias 18 e 21. Com isso, não é possível delinear o decaimento da Vitamina C para o suco de limão, pois o declínio não é constante entre os dias analisados.

O declínio da Vitamina C é observado em todos os tipos de suco, assim como os dados obtidos na titulação. O suco *in natura* (batido), *in natura*, industrializado e em pó, possuem um decaimento de Vitamina C de: 97, 96, 16 e 98%, respectivamente.

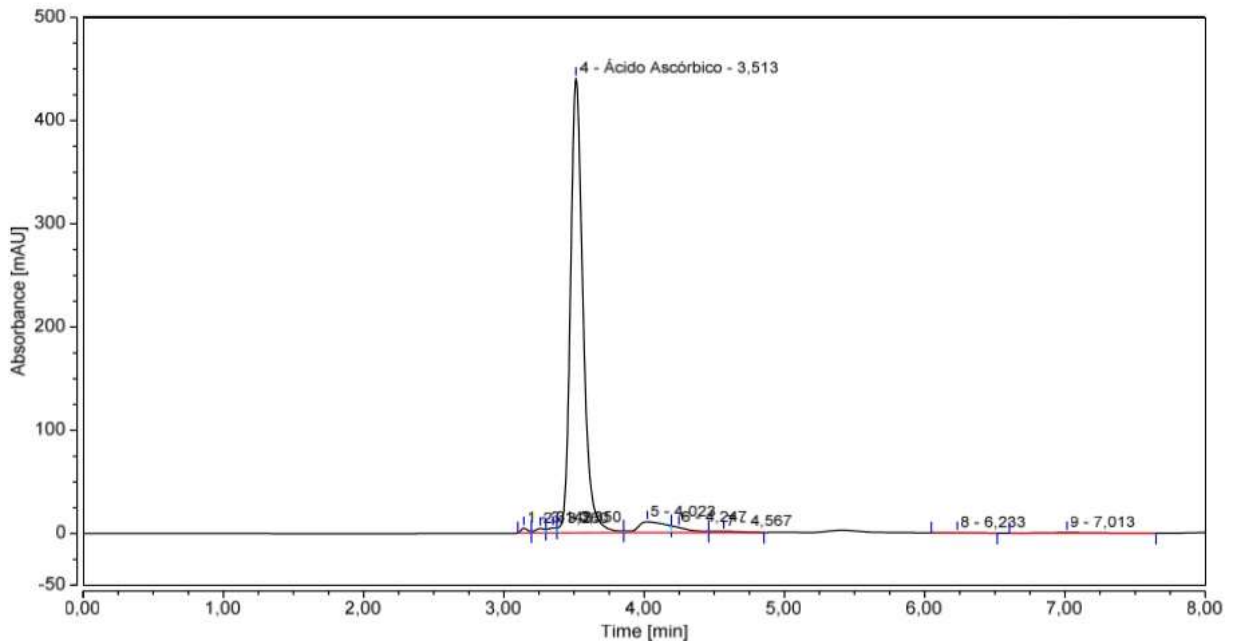
Nos dados do suco industrializado nota-se um declínio inconstante, por ser um suco industrializado necessita-se de agitação para consumo e as análises foram realizadas de acordo com as informações presentes na embalagem. Após realizar a agitação foi necessário um tempo para realização da análise que pode ter afetado os resultados possibilitando um declínio não constante.

A diferença da acidez entre o suco de limão encontrada na Figura 6 e do suco de laranja encontrado na Figura 5, explica esse decaimento mais acentuado para o suco de limão, em consequência do pH mais baixo que favorece a instabilidade da vitamina.

Para efeito de comparação com o método de titulação os resultados ficaram muito distantes, devido à sensibilidade da cromatografia é possível encontrar valores mais precisos. Nos sucos de limão a comparação entre os diferentes métodos de análise não deve ser considerada, levando em conta a dispersão dos resultados obtidos.

As Figuras 12 e 13 demonstram os cromatogramas encontrados para o suco de limão, para o primeiro dia de análise (dia 0) e para o último (dia 21), respectivamente.

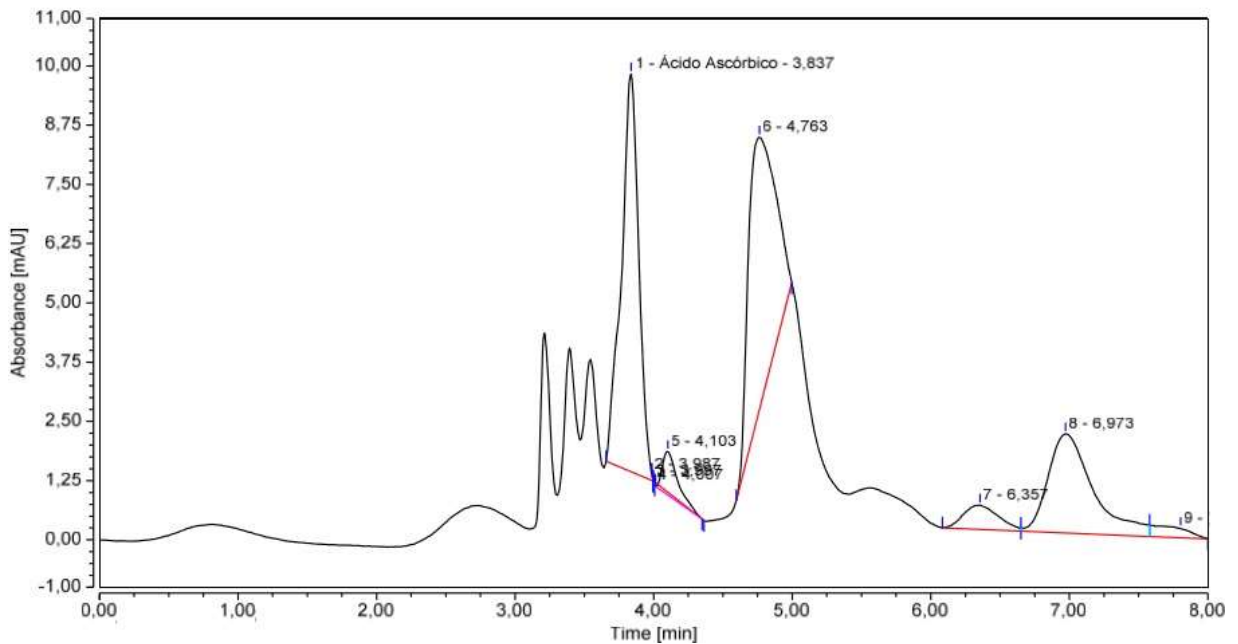
**Figura 12** – Cromatograma do suco de limão *in natura* do primeiro dia de análise (dia 0). Condições: Fase móvel água Milli-Q ajustado pH 3,0, injeção de 20  $\mu$ L e coluna cromatográfica C18.



Fonte: Autora, (2018).

O cromatograma do suco de limão *in natura* demonstra o pico da concentração encontrada no dia do preparado da amostra. Esse pico possui uma área de 45,45 (mAU) e um tempo de retenção de 3,51 minutos.

**Figura 13** – Cromatograma do suco de limão *in natura* do dia último de análise (dia 21). Condições: Fase móvel água Milli-Q ajustado pH 3,0, injeção de 20  $\mu$ L e coluna cromatográfica C18.



Fonte: Autora, (2018).

No cromatograma do suco de limão *in natura* do último dia de análise é possível verificar a degradação da Vitamina C e é notável que a concentração está abaixo da metade do primeiro dia de análise. Esse pico encontrado, levando em consideração o tempo de retenção, possui uma área de 1,22 (mAU) e um tempo de retenção de 3,84 minutos.

## 6.5 TANGERINA

A Tabela 11 contém os resultados das análises realizadas por titulação nos sucos de tangerina, do primeiro período de análise.

**Tabela 11** - Concentração de Vitamina C do suco de tangerina mg.L<sup>-1</sup> por titulação iodométrica.

Sucos Dias	<i>In Natura</i>	Industrializado	Pó
0	329,11	N/A	80,53
1	315,11	N/A	71,77
3	313,36	N/A	73,53
6	304,61	N/A	73,53
9	304,61	N/A	70,02
12	*	N/A	61,27
15	290,60	N/A	50,77
18	287,10	N/A	42,01
21	276,59	N/A	29,76

N/A – Não analisado

**Fonte:** Autora, (2018).

Os resultados encontrados para o suco de tangerina foram apenas para os sucos *in natura* e em pó, durante o primeiro período não foi encontrado nenhum suco que atendesse as características de suco industrializado do sabor de tangerina.

Nos resultados encontrados no suco de tangerina *in natura* é possível observar a redução da Vitamina C, assim como foi encontrado nos outros sabores que foram analisados. A tangerina utilizada foi de uma espécie importada, encontrada no mercado na cidade de Londrina/PR. A porcentagem de declínio até o 21º dia foi de 16%, dentre as frutas analisada foi a que possui a menor porcentagem de declínio e a que obteve uma linearidade no declínio.

Para os resultados do suco em pó, houve um declínio significativo de 63%. O suco em pó possui uma baixa concentração de Vitamina C e reduz com uma facilidade maior que no suco *in natura*.

A Tabela 12 demonstra os resultados obtidos através da cromatografia líquida no primeiro período de análise.

**Tabela 12** – Concentração de Vitamina C do suco de tangerina mg.L<sup>-1</sup> por CL.

Sucos Dias	<i>In Natura</i> (batido)	<i>In Natura</i>	Industrializado	Pó
0	*	*	N/A	*
1	380,27	368,05	N/A	187,57
3	396,34	396,18	N/A	159,45
6	385,83	396,07	N/A	140,08
9	384,18	386,36	N/A	103,2
12	353,31	318,97	N/A	55,37
15	*	*	N/A	*
18	*	*	N/A	*
21	*	*	N/A	*

N/A – Não analisado.

Fonte: Autora, (2018).

Assim como realizado nos outros sabores, na cromatografia não foi possível obter os resultados do dia 0 e a partir do dia 15, em que houve problemas técnicos.

A porcentagem de decaimento da Vitamina C encontrada nos sucos de tangerina do dia 1 ao dia 12 foi de: 7% no suco *in natura* (batido), 13% no suco *in natura* e 70% para o suco em pó.

Diferente dos resultados dos outros sucos, no suco *in natura* (batido) o decaimento foi menos acentuado que apenas no suco *in natura*. Porém o suco *in natura* possui uma porcentagem próxima da encontrada na titulação. Baseando-se apenas nos dados adquiridos, esses valores poderiam diferenciar caso houvesse os dados de todos os dias.

Assim como constatado na titulação o suco em pó tem um declínio acentuado ao ser comparado com o suco *in natura*.

Na Tabela 13, estão presentes os dados de titulação dos sucos de tangerina adquiridos no segundo período de análise.

**Tabela 13** – Concentração de Vitamina C do suco de tangerina mg.L<sup>-1</sup> por titulação iodométrica.

Sucos	Dias	<i>In Natura</i>	Industrializado	Pó
		0	162,56	162,26
6	110,51	155,68	61,39	
12	96,48	149,10	52,62	
21	78,93	149,10	28,50	

Fonte: Autora, (2018).

No segundo período de análise dos sucos de tangerina, todas as amostras foram trocadas. A tangerina foi de uma variedade nacional, ao alterar o meio em que a fruta é cultivada, pode ocorrer alterações em sua composição.

O suco industrializado do sabor de tangerina foi da mesma marca utilizada do suco industrializado sabor limão, bem como no suco em pó.

A declínio de Vitamina C não se demonstra muito acentuado nesse segundo período devido a quantidade de dias em que foi analisada. O decaimento da Vitamina C foi de: 51% para o suco *in natura*, 8% para o suco industrializado e 69% para o suco em pó.

O suco *in natura* possui um declínio mais intensificado quando comparado com o primeiro período de análise, em consequência da troca da espécie da fruta.

O suco industrializado adquirido possui um decaimento próximo ao de sabor de limão em que foi encontrado 7% de redução da Vitamina C, deve-se ao fato de ser da mesma e possuir as mesmas características.

Com a mudança das amostras foi possível obter resultados diferentes, com concentrações e declínios diferentes.

A Tabela 14 traz os resultados de concentração obtidos através do método cromatográfico para os suco de tangerina, do segundo período de análise, com a coluna C18.



**Tabela 14** - Concentração de Vitamina C do suco de tangerina mg.L<sup>-1</sup> por CL.

Sucos Dias	<i>In Natura</i> (batido)	<i>In Natura</i>	Industrializado	Pó
0	119,51	131,41	174,05	160,34
1	38,30	121,61	151,93	133,87
3	N/Q	*	*	116,59
6	N/Q	118,22	164,70	108,98
9	N/Q	94,45	160,40	45,15
12	N/Q	88,16	166,87	16,77
15	N/Q	60,26	130,91	N/Q
18	N/Q	63,66	136,20	N/Q
21	N/Q	56,55	134,27	N/Q

N/Q – Não quantificado

Fonte: Autora, (2018).

Nos dados obtidos por CL do suco de tangerina, não se obteve resultados satisfatórios para o suco *in natura* batido, não detectável a partir do 3º dia de análise. O teor de vitamina no suco em pó se manteve até o dia 15, apenas os sucos *in natura* e industrializados permaneceram até o 21º dia.

Apesar da vitamina no suco *in natura* ser conservada até o último de análise, nota-se que o valor de concentração da fruta importada disponível na Tabela 12 é quase três vezes maior que na fruta brasileira. O suco *in natura* possui um declínio de 56%.

De acordo com os resultados encontrados não se obteve um decaimento contínuo para o suco industrializado sendo que os valores variaram significativamente no decorrer dos dias. Ao analisar o dia 0 e o dia 21, obteve-se um declínio de 23%.

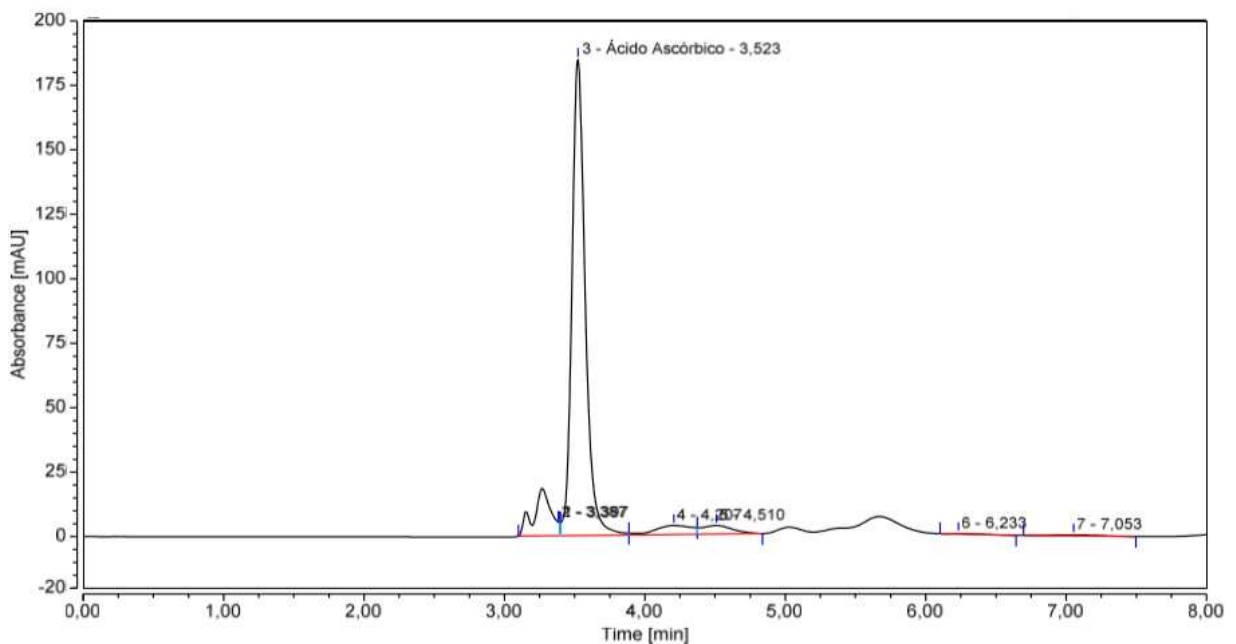
Nos dados do suco industrializado nota-se um declínio inconstante, por ser um suco industrializado necessita-se de agitação para consumo e as análises foram realizadas de acordo com as informações presentes na embalagem, após realizar a agitação foi necessário um tempo para realização da análise que pode ter afetado os resultados possibilitando um declínio não constante.

O suco em pó atingiu um decaimento de 90%, valor esperado, pois para todos os sucos em pó, a Vitamina C obteve uma degradação acentuada.

Os resultados quando comparados com o método de titulação não obtiveram valor satisfatórios, mantendo-se distantes.

As Figuras 14 e 15 demonstram os cromatogramas encontrados para o suco de tangerina.

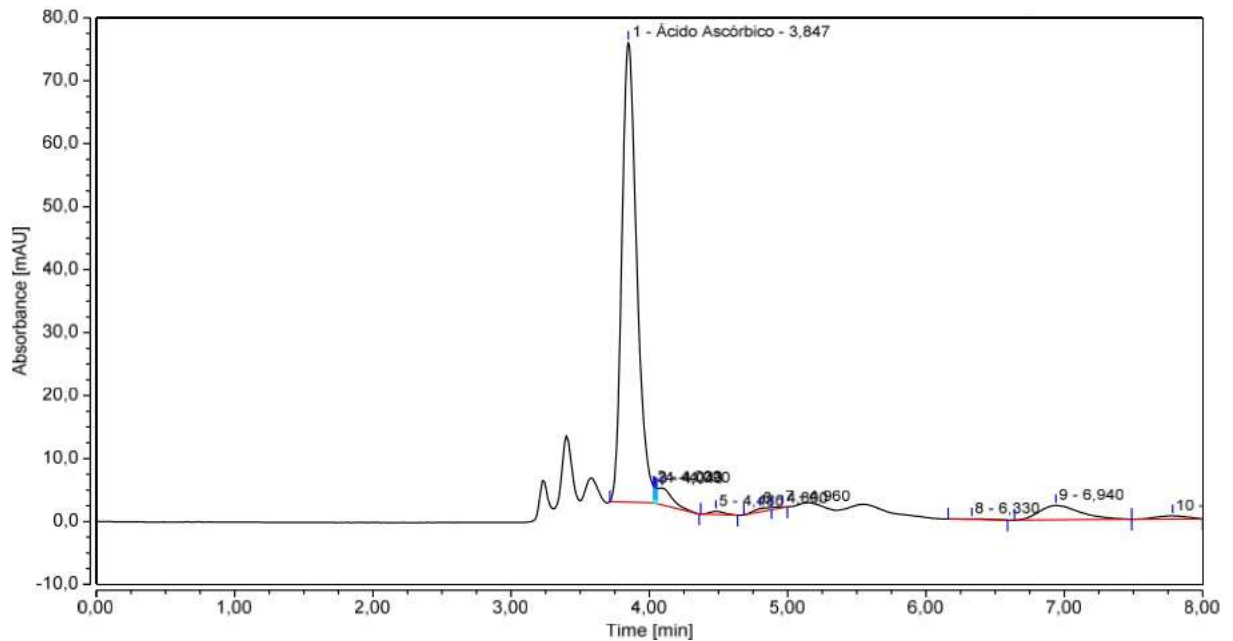
**Figura 14** – Cromatograma do suco de tangerina *in natura* do primeiro dia de análise (dia 0). Condições: Fase móvel água Milli-Q ajustado pH 3,0, injeção de 20  $\mu$ L e coluna cromatográfica C18.



Fonte: Autora, (2018).

O cromatograma do suco de tangerina *in natura* demonstra o pico da concentração encontrada no dia do preparado da amostra, sendo observado a presença de outros interferentes na amostra, ao lado do pico de Vitamina C. Esse pico possui uma área de 20,26 (mAU) e um tempo de retenção de 3,52 minutos.

**Figura 15** – Cromatograma do suco de tangerina *in natura* do dia último de análise (dia 21). Condições: Fase móvel água Milli-Q ajustado pH 3,0, injeção de 20  $\mu$ L e coluna cromatográfica C18.



Fonte: Autora, (2018).

No cromatograma do suco de tangerina *in natura* do último dia de análise da amostra é possível que se manteve o mesmo perfil encontrado desde a primeira análise. Esse pico possui uma área de 9,09 (mAU) e um tempo de retenção de 3,85 minutos.

## 6.6 COMPARAÇÃO ENTRE AS METODOLOGIAS UTILIZADAS

Através das análises de Vitaminas C realizadas por dois métodos distintos dentre eles o de Titulação por Iodometria e de Cromatografia Líquida, foi atingido o objetivo de distinguir a eficácia de cada método.

A escolha de um método simples como a Titulação por Iodometria, realizou-se com a intenção de viabilizar a importância da análise de mais baixo custo. Apesar da simplicidade, a técnica demanda uma grande parte do tempo para o preparo de solução utilizadas durante o método além do tempo de análise por gotejamento que deve ser realizado com atenção e cautela. Apesar de ser considerado um método simples, exige muito de quem está manipulando a técnica que deve ser realizada por uma mesma pessoa afim de evitar erros.

Outra dificuldade encontrada na titulação foi coloração dos sucos analisados que dificultavam a visualização de cor azul de acordo com a literatura, apenas o suco de limão atingiram essa coloração. Os sucos de laranja e tangerina por possuírem uma cor alaranjada obtiveram a coloração final de cor marrom, não sendo possível a visualização da coloração azul.

Na Cromatografia Líquida de alta eficiência, a alta sensibilidade da técnica auxiliou em resultados esperados para a degradação da Vitamina C. Essa técnica também demanda de tempo para a preparação prévia das amostras, porém a quantidade de amostra é de até 80% menor que a utilizada para a titulação.

É possível observar que a maior parte dos dados da titulação foram discrepantes quando comparados com o método cromatográfico, onde obteve-se resultados mais detalhados e facilmente quantificáveis.

## 7 CONCLUSÃO

As análises de degradação da Vitamina C por dois métodos analíticos distintos permitiu a comparação de valores encontrados na concentração da Vitamina C, determinando assim a eficácia do melhor método.

Esperava-se uma degradação mais acelerada para os sucos *in natura*, porém ao final dos 21 dias obteve-se a porcentagem de declínio da vitamina, onde encontrou-se os resultados de: 18% em titulação e 37% em cromatografia para os sucos de laranja, 72% em titulação e 96% em cromatografia para os sucos de limão e 51% em titulação e 56% em cromatografia para os sucos de tangerina.

O suco de limão possui uma degradação mais acelerada para os sucos *in natura*, devido a acidez do limão ser mais baixa, facilitando a degradação da Vitamina C.

Além dos sucos de limão possuírem uma facilidade de degradação, os sucos em pó apesar de possuírem uma pequena quantidade de vitamina, degrada-se facilmente nos três sabores de suco, chegando a 98% de degradação no suco de limão em pó.

Todas as amostras foram preparadas nas mesmas condições para análise por meio dos métodos de Titulação Iodométrica e Cromatografia Líquida, afim de minimizar erros sistemáticos e aleatórios. Através da verificação de resultados encontrados, obteve-se resultados detectáveis por mais tempo para a concentração de Vitamina C mediante as análises realizada por CL. A cromatografia mostrou-se mais viável e confiável para quantificar a degradação da vitamina.

Portando, obteve-se resultados satisfatórios para o segundo período de análise para os dois métodos analíticos, porém levando em consideração a viabilidade e vantagens significativas para a Cromatografia Líquida.

## REFERÊNCIAS

ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária Gerência - Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005.** Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12\\_78.pdf](http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12_78.pdf)> Acesso em: 11/06/2018

ALVES S. T.; SOUZA, M. C. C; BENASSI, M.T. **Desenvolvimento de metodologia para determinação de ácidos orgânicos por CLAE.** Projeto de pesquisa. Londrina, 2001.

BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S. & BARONE, J. S., **Química analítica quantitativa elementar**, 3ª ed., São Paulo, Campinas: Editora Blücher, 2001.

BAIERLE, Marília; BAIROS, André Valle de; MOREIRA, Ana Paula L.; et al. **Quantificação sérica de vitamina C por CLAE-UV e estudo de estabilidade.** Química nova. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1978-. Vol. 35, n. 2,(2012), p. 403-407, 2012.

BENDICH, Adrienne. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids institute of medicine washington, DC: National Academy Press, 2000 ISBN: 0-309-06935-1. **Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 364, 2001.

BIELEMANN, Renata M.; MOTTA, Janaína V. S.; MINTEN, Gicele C.; HORTA, Bernardo L.; GIGANTE, Denise P.. Consumo de alimentos ultraprocessados e impacto na dieta de adultos jovens. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, 2015.

BOBBIO, Florinda.; BOBBIO, Paulo A.. **Introdução à química de alimentos.** 2ed. São Paulo, SP: Varela, 1989. 223p.

BRITO, Natilene Mesquita; et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003.

CARMO, Mônica Cristina Lopes do; DANTAS, Maria Inês de Souza; RIBEIRO, Sônia Machado Rocha. Caracterização do mercado consumidor de sucos prontos para o consumo. **Brazilian Journal Of Food Technology**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.305-309, dez. 2014.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Fundamentos de cromatografia.** Campina: Unicamp, 2006. 453p.

CORREIA, Laura Fernandes Melo; FARAONI, Aurelia Santos; PINHEIRO-SANT'ANA, Helena Maria. **Efeitos do processamento industrial de alimentos sobre a estabilidade de vitaminas.** Alimentos e Nutrição Araraquara, v. 19, n. 1, p. 83-95, 2008.

COUTO, Meylene Aparecida Luzia; GUIDOLIN, Solange Canniatti-Brazaca. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, 2010.

COZZOLINO, Silvia M. Franciscato. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 4ª edição. São Paulo: Manole, 2012. 1334 p.

DANIELI, Flávia; COSTA, Luiz Roberto Lourena Gomes da; SILVA, Lidiane Correia da; HARA, Andressa Suemi Schiavinato; SILVA, Andressa Araújo. Determinação de vitamina C em amostras de suco de laranja in natura e amostras comerciais de suco de laranja pasteurizado e envasado em embalagem Tetra Pak. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 27, n. 4, p. 361-5, 2009.

DA ROSA, Jeane Santos, GODOY, Ronel L. de O.; NETO, João O.; et al. Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, 2007.

DOUGLAS, Carlos Roberto. **Fisiologia Aplicada à Nutrição**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1074 p.

FERNANDEZ, Timea Gerczei; PATTISON, Scott. **Biochemistry Laboratory Manual for Undergraduates: An Inquiry-based Approach**. Walter de Gruyter GmbH & Co KG, 2015.

HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de análise instrumental**. Bookman, 2009.

LAVARDA, Liziane. **Determinação da cinética de degradação térmica da vitamina C em polpa de acerola via aquecimento ôhmico**. 2011. 44 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, UFRGS, Rio Grande do Sul, 2011. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/36905>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

LIMA, E. S. et al. Redução de vitamina C em suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) industrializado e cajuína. **Química Nova**. São Paulo, n.5, v.30, p. 1143-1146, 2007.

MALDANER, Liane; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C.S.F.. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, 2010.

MANSUR, Luciana Muller. **Vitaminas Hidrossolúveis no metabolismo**. Apresentação de seminário sobre a disciplina Bioquímica do Tecido Animal, no programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Apresentado no 1º semestre de 2009. Disponível em <[http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/vitaminas\\_hidro.pdf](http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/vitaminas_hidro.pdf)>. Acesso em 10/10/2017.

MARSHALL, William J.; BANGERT, Stephen K.; LAPSLEY, Márta. **Química clínica**. Elsevier Brasil, 2013.

MARSHALL, William J.; LAPSLEY, Marta; DAY, Andrew P., AYLING, Ruth M. **Bioquímica Clínica: aspectos clínicos e metabólicos**; tradução Fabrizio Grandi... [et al.]. - 3. ed.- Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo Baptista. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, 2000.** Disponível em: <[www2.agricultura.rs.gov.br/uploads/126989581629.03\\_enol\\_in\\_1\\_00\\_mapa.doc](http://www2.agricultura.rs.gov.br/uploads/126989581629.03_enol_in_1_00_mapa.doc)> Acesso em: 12 de Outubro de 2017.

**National Nutrient Database.** Standard Reference Release 28 slightly revised May, 2016. Basic Report:12119, Nuts, coconut water (liquid from coconuts). Disponível em: <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3665?fgcd=&manu=&facet=&format=&count=&max=50&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=12119&ds=&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=>>> Acesso em: 14/11/2017.

NETO, Randolpho. da Silva Corrêa; FARIA, José de Assis Fonseca. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, 1999.

Pimentel, M. F., & Barros Neto, B. (1996). CALIBRAÇÃO: UMA REVISÃO PARA QUÍMICOS ANALÍTICOS. **Química Nova**, pp. 268-277.

PINHERO, Denise Maria; PORTO, Karla Rejane de Andrade; MENEZES, Maria Emília da Silva. **A química dos alimentos: carboidratos, lipídios, proteínas e minerais**. Maceió: EDUFAL, 2005.

**PUBCHEM – L-ACID ASCORBIC.** Disponível em: <[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ascorbic\\_acid#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ascorbic_acid#section=Top)> Acesso em 18/10/2017.

RAIMUNDO JR, Ivo M.; PASQUINI, Celio. Espectrofotometria multicanal e arranjos de fotodiodos. **Química Nova**, v. 20, n. 1, p. 83, 1997.

RIBANI, Marcelo, BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**. 2004.

RODWELL, Victor W.; BENDER, D. A., BOTHAM, K. M., KENNELLY, P. J.;WEIL, P. A. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. McGraw Hill Brasil, 2016.

SARNI, Roseli O. S; SOUZA, Fabíola I. S.; COCCO, Renata R; et al. Micronutrientes e sistema imunológico. **Rev Bras Alerg Immunopatol**, v. 33, n. 1, p. 8-13, 2010.

SANCHO, Soraya de Oliveira; MAIA, Geraldo Arraes; FIGUEIREDO, Raimundo Wilane de; RODRIGUES, Sueli; SOUSA, Paulo Henrique Machado de, et al. Alterações químicas e físico-químicas no processamento de suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, 2007. SILVA, PT da; LOPES, Maria Lúcia Mendes; VALENTE-MESQUITA, Vera Lúcia. Efeito de diferentes processamentos sobre o teor de ácido ascórbico em suco de laranja utilizado na elaboração de bolo, pudim e geléia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 678-682, 2006.



SKOOG, Douglas. A.; WEST, Donald. M.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R.. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª edição norte-americana. São Paulo: Thomson Learning, 2006.

SUGAI, A. Y., SHIGEOKA, D. S., BADOLATO, G. G., & TADINI, C. C. Análise físico-química e microbiológica do suco de laranja minimamente processado armazenado em lata de alumínio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 233-238, 2002.

TEIXEIRA, Mirella; MONTEIRO, Magali. Degradação da vitamina C em suco de fruta. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 219-227, 2006.

**Thermo Fisher Scientific**. Disponível em:

< <https://www.thermofisher.com/br/en/home/industrial/chromatography/liquid-chromatography-lc/hplc-uhplc-systems/ultimate-3000-hplc-uhplc-systems/rapid-separation-rs-hplc-systems.html> > Acesso em 16/11/2017

VILLELA, Gilberto G.; PECCI, José Danilo. Iodometric determination of vitamin C in citrus fruit juices. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 39, n. 3, p. 291-295, 1943.