



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



**ESTUDO DA FOTOESTABILIDADE E QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO L-
ASCÓRBICO E D-ISOASCÓRBICO EM PRODUTOS PROCESSADOS A BASE
DE FRUTAS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

JOÃO FELIPE SANTIAGO NETO

Recife
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

JOÃO FELIPE SANTIAGO NETO

**ESTUDO DA FOTOESTABILIDADE E QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO L-
ASCÓRBICO E D-ISOASCÓRBICO EM PRODUTOS PROCESSADOS A BASE
DE FRUTAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, da
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como requisito para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Emmanuela Prado de Paiva Azevedo

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Antônio Gomes de Castro Neto

Recife

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S235e Santiago Neto, João Felipe
Estudo da fotoestabilidade e quantificação do ácido L-ascórbico e D-isoascórbico em produtos processados a base de frutas por cromatografia líquida de alta eficiência / João Felipe Santiago Neto. – 2019.
68 f. : il.

Orientadora: Emmanuela Prado de Paiva Azevedo.
Coorientador: Antônio Gomes de Castro Neto.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências.

1. Vitamina C 2. Cromatografia a líquido de alta eficiência
3. Radiação ultravioleta 4. Oxidação I. Azevedo, Emmanuela Prado de Paiva, orient. II. Castro Neto, Antônio Gomes de, coorient.
III. Título

CDD 664

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**ESTUDO DA FOTOESTABILIDADE E QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO L-
ASCÓRBICO E D-ISOASCÓRBICO EM PRODUTOS PROCESSADOS A BASE
DE FRUTAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Por João Felipe Santiago Neto

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em 28/02/2019 pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Maria Inês Sucupira Maciel
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Vera Lucia Arroxelas Galvão de Lima
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Clayton Anderson de Azevedo Filho
Associação Caruaruense de Ensino Superior

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família, minha mãe Maricelia, meu pai José e minha irmã Fernanda, que não puderam estar presentes nesta importante etapa de minha carreira acadêmica. Mesmo não estando presentes, principalmente minha mãe que sempre lutou por mim a ter todas as oportunidades que ela não teve em sua juventude, sempre me incentivou, sempre me apoiou e me ensinou que o estudo é a coisa mais importante que devemos ter, a ela dedico todas as minhas horas, meus dias, meus anos de estudos, e irei dar a ela o retorno por tudo que fez e faz por mim.

Agradecer ainda a minha família, nas pessoas de Humberto, Juracy, Fábio e família, que me auxiliaram no início de minha chegada em Recife. Agradecer a Cristina, Rejane, Abreu, Melissa, que me deram abrigo até que eu pudesse me estabilizar, além de serem meu porto seguro para todos os momentos, muito obrigado.

Agradeço a minha orientadora, Emmanuela Paiva, que me acolheu como seu pupilo, sempre estando disposta a ajudar, com bom humor e sinceridade. Não me ensinando somente sobre a ciência, mas sobre a vida, com ela aprendi o valor da honestidade, que sempre deve nos guiar a frente de nossa jornada, muito obrigado.

Ao meu co-orientador Antônio Gomes, um dos profissionais mais excelentes que conheci em minha jornada no Mestrado, sua dedicação a vida acadêmica me serve de exemplo, desejo a você todo sucesso do mundo, vida longa e próspera.

A Jamicelly Rayanna, um dos tesouros que encontrei enterrados por este mundo, por ter me dado apoio, por sempre estar presente mesmo que distante, por confiar em mim, também me dando muito orgulho por suas conquistas acadêmicas. Como citado uma vez, minha ligação covalente.

A Samuel Khan por ter me ajudado no experimento, e pode ter certeza que se precisar de ajuda, estarei à disposição.

Agradecer aos funcionários do LEAAL/Dnut/UFPE.

Agradecer a Prof. Beate do Departamento de Farmácia por dispor o LINSO, para meu experimento.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Muito obrigado a todos que de certa forma me ajudaram.

RESUMO

A vitamina C é uma das mais importantes vitaminas hidrossolúveis, é muito empregada em produtos processados à base de frutas, para enriquecimento ou como antioxidante. Os isômeros geralmente encontrados da vitamina C em produtos processados são o ácido L-ascórbico e D-isoascórbico, sendo facilmente degradados na presença de diversos fatores, como luz, oxigênio e calor. Estudos de fotoestabilidade se fazem necessários para confirmar que produtos expostos a luz e que contenham vitamina C, possam manter sua integridade durante toda vida de prateleira. O objetivo deste trabalho foi avaliar a fotoestabilidade e desenvolver uma metodologia para determinação dos isômeros ácido L-ascórbico e D-isoascórbico em produtos processados de frutas. Foi realizada a adequação a partir da metodologia de Bui-Nguyên (1980) para quantificação do ácido L-ascórbico e D-isoascórbico por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por DAD. A extração foi do tipo líquido-sólido e/ou líquido-líquido utilizando solução de ácido fosfórico à 3%, centrifugação e filtração. Foi utilizada uma coluna de fase normal NH₂ (150 x 4,6 mm) 3 µm, com eluição isocrática utilizando acetonitrila e tampão fosfato de potássio monobásico (0,005 mol.L⁻¹) pH 4,8 e temperatura de 30°C na proporção 80:20 v/v, respectivamente. Para avaliação da fotoestabilidade foi utilizada uma câmara não comercial qualificada, onde as amostras foram expostas segundo RDC nº 45/2012 da ANVISA. Foi realizada análise de espectrofotometria UV/VIS para embalagens PET e espectroscopia vibracional na região do infravermelho para embalagens PET e vidro. O método proposto se mostrou sensível quanto aos padrões apresentando LD 0,0092 µg.mL⁻¹ e 0,0131 µg.mL⁻¹, e LQ 0,0278 µg.mL⁻¹ e 0,0397 µg.mL⁻¹ para ácido D-isoascórbico e L-ascórbico, respectivamente. Foi quantificado o ácido L-ascórbico na faixa de 0,29 a 12,01 mg.mL⁻¹ nas amostras, não sendo detectada a presença do ácido D-isoascórbico. A exposição à luz visível não levou a degradação do ácido L-ascórbico, entretanto na exposição à radiação UV o ácido L-ascórbico foi completamente degradado, mesmo os produtos estando envasados em embalagens seguras, permitindo repensar as diretrizes quanto a fortificação de alimentos.

Palavras-chave: Vitamina C, CLAE, Radiação UV-Vis, oxidação

ABSTRACT

Vitamin C is one of the most important water soluble vitamins, it is widely used in processed fruits, for enrichment or as an antioxidant. The generally found isomers of vitamin C in processed products are L-ascorbic acid and D-isoascorbic acid, being easily degraded in the presence of various factors such as light and oxygen. Photo-stability studies are needed to confirm that products exposed to light and containing vitamin C can maintain their integrity throughout shelf life. The objective of this work was to evaluate photostability and to develop a methodology for the determination of the L-ascorbic and D-isoascorbic acid isomers in processed fruit products. Adaptation was performed using the Bui-Nguyen (1980) methodology for quantification of L-ascorbic and D-isoascorbic acid by high performance liquid chromatography and DAD detection. The extraction was of liquid-solid and / or liquid-liquid type using 3% phosphoric acid solution, centrifugation and filtration. A NH2 (150 x 4.6 mm) 3 μ m normal phase column was used with isocratic elution using acetonitrile and monobasic potassium phosphate buffer (0.005 mol.L⁻¹) pH 4.8 and temperature of 30°C in the ratio 80:20 v/v, respectively. For the evaluation of the photostability a non-commercial chamber was used, where the samples were exposed according to RDC n° 45/2012 of ANVISA. UV/VIS spectrophotometry analysis was performed for PET packaging and infrared vibration spectroscopy for PET and glass packaging. The proposed method showed to be sensitive to the standards presenting LD 0.0092 μ g.mL⁻¹ and 0.0131 μ g.mL⁻¹, and LQ 0.0278 μ g.mL⁻¹ and 0.0397 μ g.mL⁻¹ for acid D-isoascorbic and L-ascorbic, respectively. L-ascorbic acid was measured in the range of 0.29 to 12.01 mg.mL⁻¹ in the samples, and the presence of D-isoascorbic acid was not detected. Exposure to visible light did not lead to degradation of L-ascorbic acid. However, in the exposure to UV radiation L-ascorbic acid was completely degraded, even the products were packed in safe packaging, allowing rethinking of guidelines for food fortification.

Key words: Vitamin C, HPLC, UV-Vis radiation, oxidation

Listas de Figuras

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Isômeros do ácido ascórbico 13
- Figura 2** – Reação de oxidação do ácido L-ascórbico para ácido dehidroascórbico e conversão em ácido 2,3-dicetogulônico 14

ARTIGO 1

- Figura 1** – Cromatogramas dos padrões ácido ascórbico e ácido D-isoascórbico em três condições de temperatura da fase móvel e do forno de coluna: 30°C (ADIA tr 6,72; AA tr 8,34), 45°C (ADIA tr 6,93; AA tr 8,94) e 60°C (ADIA tr 5,05; AA tr 6,49). Eluição isocrática, 80% acetonitrila e 20% tampão fosfato de potássio monobásico (0,005 mol.L⁻¹) pH 4,80, coluna NH₂ 150 x 4,6 mm, 03 µm. tr = tempo de retenção 42
- Figura 2** – Cromatogramas de bebida mista de frutas cítricas de ácido L-ascórbico (AA). Linha contínua, amostra submetida à centrifugação + filtração, AA (tr=9,39); Linha pontilhada, amostra submetida à filtração, AA (tr=10,03). Eluição isocrática, 80% acetonitrila e 20% tampão fosfato de potássio monobásico (0,005 mol.L⁻¹) pH 4,80 e temperatura de 30°C, coluna NH₂ 150 x 4,6 mm, 3 µm. tr = tempo de retenção 45

ARTIGO 2

- Figura 1** – Amostras de bebida mista de frutas cítricas e geleia de goiaba dispostas na câmara de fotoestabilidade..... 57
- Figura 2** – Varredura espectral das embalagem PET da bebida mista de frutas cítricas 1, submetida à incidência de luz branca 59
- Figura 3** - Varredura espectral das embalagem PET da bebida mista de frutas cítricas 2, submetida à incidência de luz branca 60
- Figura 4** – Cromatogramas e espectros de absorção no UV-Vis de bebida mista de frutas cítricas e geleia de goiaba submetidas a incidência de radiação UV 61
- Figura 5** – Espectroscopia na região do infravermelho de garrafas PET de bebidas mistas de frutas cítricas 62
- Figura 6** - Espectroscopia na região do infravermelho de garrafas PET dos sucos integrais 62
- Figura 7** - Espectroscopia na região do infravermelho de garrafas de vidro de concentrado de caju 63
- Figura 8** - Espectroscopia na região do infravermelho garrafas de vidro de geleia de goiaba..... 64

Listas de Tabelas

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – Métodos de separação de isômeros da vitamina C disponíveis na literatura..... 23

ARTIGO 1

Tabela 1 – Desempenho cromatográfico das temperaturas empregadas no forno e testadas na coluna NH₂ (150 x 4,6 mm) 3 µm 43

Tabela 2 – Características analíticas do método cromatográfico empregado 44

Tabela 3 – Teor de ácido D-isoascórbico e ácido L-ascórbico em produtos processados a base de frutas..... 47

ARTIGO 2

Tabela 1 – Teor de ácido L-ascórbico das bebidas mista de frutas cítricas submetidas a incidência de luz branca 58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 Ácido ascórbico (AA)	12
3.2 Ácido dehidroascórbico (ADHA)	13
3.3 Ácido D-isoascórbico (ADIA)	14
3.4 Legislação do processamento de frutas no brasil	15
3.5 Embalagens para alimentos	16
3.5.1 Vidro.....	16
3.5.2 Polietileno tereftalato (PET)	18
3.6 Fotoestabilidade	19
3.7 Determinação de vitamina C.....	20
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
5. RESULTADOS	34
ARTIGO 1 - CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO DE ISÔMEROS DA VITAMINA C (ÁCIDO D-ISOASCÓRBICO E ÁCIDO L-ASCÓRBICO) POR CLAE-DAD	34
INTRODUÇÃO.....	35
MATERIAL E MÉTODOS	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ARTIGO 2 - ESTUDO DA FOTOESTABILIDADE DO ÁCIDO L-ASCÓRBICO E D-ISOASCÓRBICO EM PRODUTOS PROCESSADOS A BASE DE FRUTAS POR CLAE	52
INTRODUÇÃO.....	53
MATERIAL E MÉTODOS	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68

1. INTRODUÇÃO

A elaboração de produtos processados à base de frutas tem como foco manter as características nutricionais, e os atributos de qualidade como cor, sabor e aroma, além de agregar valor e manter uma maior variedade de produtos oriundos de um único tipo de fruto. A disseminação crescente de informações acerca dos benefícios dos alimentos com relação a sua composição, tem tornado os consumidores cada vez mais conscientes da importância do valor nutritivo e composição dos produtos processados. Vitaminas e antioxidantes são alguns dos principais componentes alimentares que as indústrias de alimentos buscam conservar nestes produtos, que são procurados pelos consumidores (SPINOLA et al., 2014).

Devido à crescente demanda por produtos com alto valor nutricional, a indústria alimentícia desenvolve sucos enriquecidos com vitaminas para contrabalançar as perdas durante o processamento e o armazenamento. De fato, os tratamentos térmicos induzem mudanças indesejáveis, como perdas de micronutrientes por reações químicas, como oxidações e isomerizações (BACIGALUPI et al., 2016).

Uma das vitaminas mais comuns nas frutas é a vitamina C, seu isômero encontrado naturalmente em frutas é o ácido L-ascórbico, o qual é utilizado pelos organismos vivos em diversas funções biológicas (WANG et al., 2000). Outro de seus isômeros é o ácido D-isoascórbico mais frequentemente adicionado como antioxidante em produtos processados. A quantificação do ácido ascórbico total nos produtos processados indica a qualidade nutricional e estado da conservação dos mesmos.

A ingestão diária recomendada de vitamina C é de 25 mg para crianças, 75 mg para mulheres e de 90 mg para homens. Entretanto, há relatos de que o consumo de dosagens mais altas pode proporcionar diversos benefícios à saúde, como eficiência contra o estresse, combate ao envelhecimento, aumento da absorção de ferro (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000; TARRAGO-TRANI et al., 2012). De acordo com a RDC nº 269/05 da ANVISA, a ingestão diária recomendada (IDR) é de 45 mg para adultos (BRASIL, 2005).

As embalagens dos alimentos industrializados à base de frutas geralmente utilizam vidro transparente ou material polimérico adicionado ou não de

absorventes ultravioleta (UV), limitando certa quantidade da incidência de luz sobre o produto. Na RDC nº 45/2012 da ANVISA não há parâmetros da incidência de luz para os quais os alimentos possam ser submetidos, com objetivo de avaliar a degradação de nutrientes importantes como o ácido ascórbico (BRASIL, 2012).

A degradação do ácido ascórbico nos alimentos é acelerada pela exposição à luz visível e à radiação ultravioleta (UV) policromática, particularmente quando estão presentes agentes fotossensibilizantes (VAID et al., 2005). Durante a fotodegradação da vitamina C, são formados subprodutos tóxicos que reagem com componentes presentes no meio, resultando na formação de derivados potenciais formadores de radicais peróxidos ($RO_2\cdot$) que são nocivos à saúde (LAVOIE et al., 2004).

O estudo das propriedades de fotoestabilidade dos alimentos é parte integrante no desenvolvimento de formulações que garantam a eficácia nutricional, prevendo a vida útil do produto final. Para confirmação de que os nutrientes não são degradados ao longo da exposição a luz na prateleira, métodos de investigação analítica devem ser empregados (SHUKLA et al., 2016).

O uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais empregada na análise de compostos quando se busca resultados com alta sensibilidade, simplicidade e especificidade (BOONPANGRAK et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2012; CHEBROLU et al., 2012), empregando colunas de fase reversa com pareamento iônico ou não, amina ligada, colunas amino poliméricas ou, mais frequentemente, C_{18} . A detecção pode ser feita por técnica eletroquímica, fluorescente ou por arranjo de diodos (DAD) (SANCHEZ-MATA, 2000).

A necessidade de se garantir a integridade da vitamina C em produtos processados a base de frutas durante todo o período de exposição do produto na prateleira, suscitou este trabalho a apresentar o desenvolvimento de uma metodologia analítica baseada em CLAE/DAD, para o monitoramento da fotodegradação induzida em uma câmara de fotoestabilidade, dos isômeros ácido L-ascórbico e D-isoascórbico.

2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE

O ácido ascórbico e seus isômeros estão presentes em frutos e seus produtos derivados, contudo são substâncias sensíveis a luz, oxigênio e calor, podendo sofrer degradação no período de exposição à venda. O ácido D-isoascórbico é o isômero mais empregado na substituição do ácido ascórbico. Contudo pouco se relata sobre a fotoestabilidade de ambos no prazo de validade de sucos, geleias entre outros produtos comercializados em embalagens de vidro e poliméricas. Sendo assim, surgem os seguintes questionamentos:

- O ácido L-ascórbico e o ácido D-isoascórbico são fotoestáveis quando presentes em alimentos acondicionados em embalagens de vidro e/ou poliméricas?
- A luz é de fato um agente degradador, e o vidro e polímeros utilizados na maioria das embalagens incapaz (es) de controlar as perdas do ácido L-ascórbico e D-isoascórbico?
- A cromatografia líquida de alta eficiência pode ser considerada uma técnica eficiente para determinação dos isômeros da vitamina C avaliados para este estudo?

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ácido ascórbico (AA)

O ácido ascórbico (AA) é uma vitamina hidrossolúvel que possui diversas funções no corpo humano. Entretanto, devido à falta da enzima L-gulonolactona oxidase no final da síntese de vitamina C, o ser humano e algumas espécies de primatas não são capazes de sintetizá-la (MANDL et al., 2009).

A importância do AA está estabelecida há muito tempo, pois sabe-se que sua deficiência causa escorbuto, enfermidade caracterizada pelo sangramento da gengiva, fadiga, anemia e dificuldade na cicatrização de feridas, podendo ser fatal (PHILLIPS et al., 2010).

Segundo Tarrago-Trani (2012), o AA é um cofator em diversos processos fisiológicos, incluindo a hidroxilação de prolina e lisina na síntese de colágeno e outras proteínas do tecido conjuntivo, a síntese de norepinefrina, carnitina e de hormônios adrenais, e a ativação de hormônios peptídicos. O AA facilita a absorção intestinal de ferro e atua na manutenção do íon ferro no plasma sanguíneo, além de atuar como antioxidante.

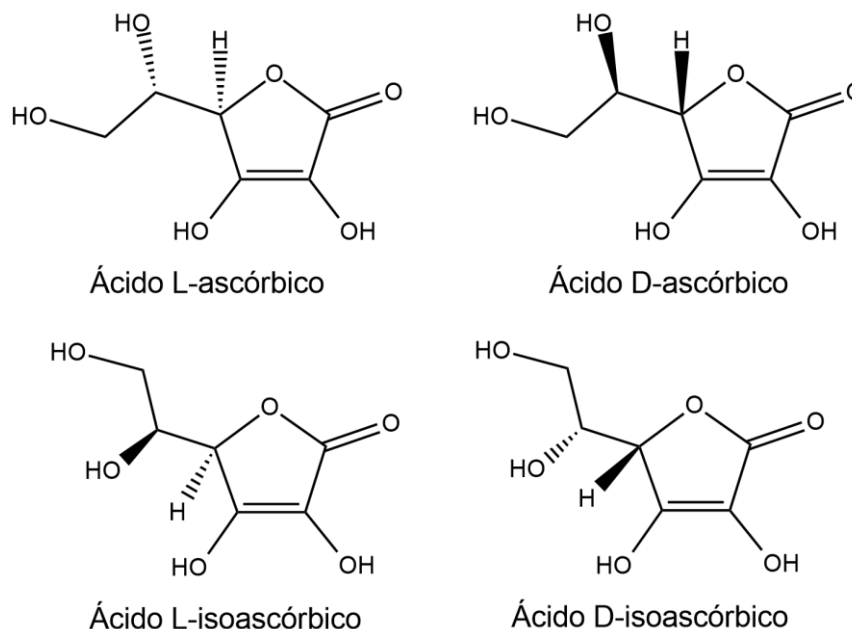
Louarme e Billaud (2012) explicam que o AA é um antioxidante natural e um aditivo alimentar comum na indústria alimentícia, usado para melhorar a qualidade do produto prevenindo o escurecimento e aumentando a vida de prateleira. Sua atividade antioxidante envolve a inversão temporária de quinonas em fenólicos junto à uma reação de oxido-redução, formando o ácido dehidroascórbico.

O AA é extremamente lábil à ação de altas temperaturas, cátions como cobre e ferro, oxigênio, pH alcalino, luz e enzimas (ODRIOZOLA-SERRANO, 2007). Contudo, com procedimentos de estabilização apropriados e condições de armazenamento adequadas (por exemplo, luz e temperatura), o AA pode ser estável por longos períodos (VALENTE et al., 2014).

O oxigênio é provavelmente o fator mais determinante na degradação do AA: a relação molar das concentrações iniciais de AA e oxigênio desempenha um papel importante na sua estabilidade (OEY et al., 2008). Enquanto o oxigênio estiver presente, a degradação do AA é causada principalmente por oxidação, na qual a degradação anaeróbica ocorre principalmente quando há o esgotamento do oxigênio (ROIG et al., 1995; OEY et al., 2006).

O AA pode ser encontrado na forma dos isômeros (Figura 1): ácido L-ascórbico, ácido D-ascórbico, ácido L-isoascórbico e ácido D-isoascórbico (OLIVEIRA et al., 2012).

Figura 1 – Isômeros do ácido ascórbico



Fonte: Autor

Infelizmente devido a sua instabilidade, o AA presente em sucos preparados frescos sofre degradação durante o processamento e armazenamento. Além disso a perda do valor nutritivo e os produtos da degradação do AA podem formar cor indesejável nos sucos, devido a reações de escurecimento e, portanto, diminuir sua qualidade (BHARATE E BHARATE, 2014).

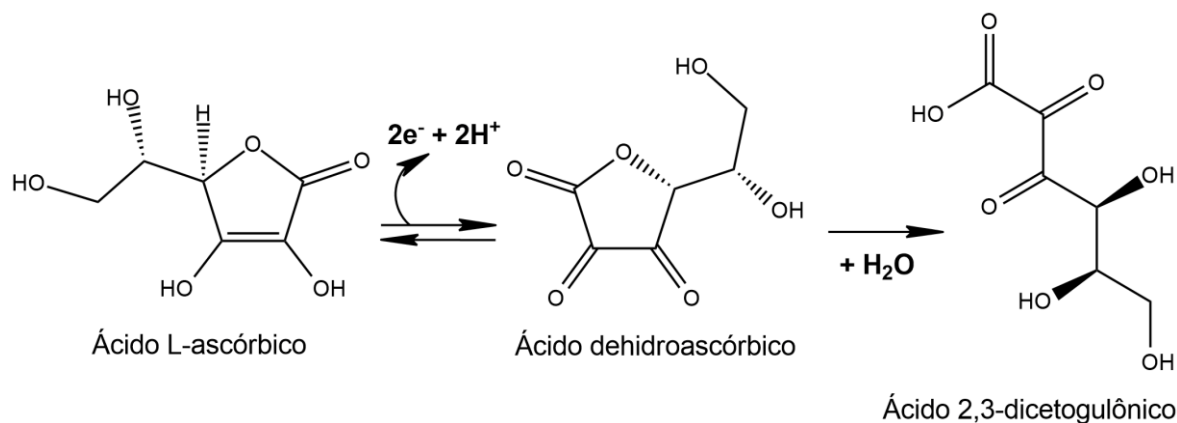
Portanto, o AA e ácido D-isoascórbico, muitas vezes são adicionados aos produtos promovendo enriquecimento ou ação antioxidante (BARROS et al., 2010).

3.2 Ácido dehidroascórbico (ADHA)

O ácido dehidroascórbico (ADHA) é formado em condições oxidativas (na presença de oxigênio, catalisadores metálicos e luz), dois prótons são liberados a partir da molécula de AA levando a produção de ADHA (DEUTSCH, 1998). O ADHA é uma molécula instável sendo rapidamente convertida em ácido 2,3-dicetogulônico, e outros subprodutos que não têm propriedades biológicas da

vitamina C (RUSSELL, 2004; JOHNSTON et al., 2007). No entanto, o ADHA pode ser revertido para AA pela ação da enzima dehidroascorbato redutase, que é encontrada em vários tipos de células (hepatócitos, hemoglobinas, células musculares lisas) (WILSON, 2002).

Figura 2 – Reação de oxidação do ácido L-ascórbico para ácido dehidroascórbico e conversão em ácido 2,3-dicetogulônico



Fonte: Autor

O ADHA exibe uma atividade biológica equivalente ao isômero ácido L-ascórbico, por isso, é importante determinar ambas as moléculas, ácido ascórbico total ou conteúdo total de vitamina C em gêneros alimentícios. O equilíbrio entre o ácido L-ascórbico e ADHA é dependente das condições pré-colheita e tipo de amostra (origem, práticas de cultura, o estágio de maturação) e das condições pós-colheita (movimentação e armazenagem da amostra). O ADHA representa menos de 10% do ácido ascórbico total em produtos hortícolas frescos, mas o seu conteúdo tende a aumentar durante a armazenagem devido a oxidação (LEE, 2000).

3.3 Ácido D-isoascórbico (ADIA)

Ácido D-isoascórbico (ADIA) ou ácido eritórbrico é um estereoisômero do AA, que possui as mesmas propriedades químicas do AA (SCHACHTNER, 1996; GRAVIER-PELLETIER, 1995). O ADIA não ocorre naturalmente nos alimentos (DRIVELOS et al., 2010), mas tem sido utilizado como conservante em vários

produtos alimentares devido às suas propriedades antioxidantes (WALKER, 1991; REHWOLDT, 1986).

Devido à propriedade forte de redução, o ADIA pode ser rapidamente oxidado, sendo largamente utilizado como um antioxidante em vários produtos alimentícios à base de carne, peixe e bebidas (MARGOHS, 1997; KALL, 1999). Além disso, em produtos cárneos, a combinação entre ADIA e nitrato, além de evitar a oxidação da carne, também reduz a produção de nitrosaminas (VERSARI, 2004).

3.4 Legislação do processamento de frutas no Brasil

A indústria de bebidas não alcoólicas, obteve no ano de 2017 referente a néctares e sucos uma produção de 1.101.985 litros, para sucos concentrados foram produzidos 511.385 litros, com consumo per capita de 5,31 e 2,46 litros, respectivamente, segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas (ABIR, 2017).

No Brasil a regulamentação de bebidas não alcoólicas a base de frutas se dá pelo Decreto nº 6871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a Lei nº 8918, de 14 de julho de 1994, se dispõe a padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização das bebidas, havendo ainda outros regulamentos técnicos para bebidas. Entre as atribuições é dito que suco é a bebida não fermentada, não concentrada e não diluída destinada ao consumo, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem por processamento tecnológico adequado. A designação integral será privativa ao suco sem adição de açúcares e na sua concentração natural, sendo vedada tal designação para sucos reconstituídos. O néctar é a bebida não fermentada, obtida da diluição em água potável da parte comestível do vegetal ou de seu extrato, adicionado de açúcares. Refresco ou bebida de fruta ou de vegetal é a bebida não fermentada obtida pela diluição em água potável do suco de fruta, polpa ou extrato vegetal, com ou sem adição de açúcares (BRASIL, 2009; BRASIL, 1994).

A Instrução Normativa nº 12 de 4 de setembro de 2003, determina que o néctar deve conter de 30 a 50% em média da polpa da fruta. O néctar contém água, açúcar, aditivos permitidos para categoria, entre eles corante e aroma natural,

conforme a RDC nº 8 de 6 de março de 2013. O néctar produzido a partir de mais de uma fruta deve ser designado como misto (BRASIL, 2003; BRASIL, 2013a).

A Instrução Normativa nº 19 de 19 de junho de 2013, estabelece que a bebida mista deve conter no mínimo 10% de polpa de fruta, sendo que os valores expressos para cada fruta podem variar de acordo com sua acidez, podendo conter 5, 20 até 30% de polpa de fruta (BRASIL, 2013b).

A legislação brasileira para geleia de fruta se dá através da Resolução Normativa nº 15/78, que é o produto preparado com frutas e/ou sucos ou extratos aquosos das mesmas podendo apresentar frutas inteiras, partes e/ou pedaços sob variadas formas, devendo tais ingredientes ser misturados com açúcares, com ou sem adição de água, pectina, ácidos e outros ingredientes permitidos, tais misturas serão convenientemente processadas até uma consistência semissólida adequada e, finalmente, acondicionada de forma a assegurar sua perfeita conservação (BRASIL, 1978).

Nos últimos anos no Brasil, houve uma grande revisão sobre o uso de aditivos e rotulagem nos alimentos. A RDC nº 8/2013 (BRASIL, 2013a) revogou várias outras legislações, no que diz respeito a aditivos em alimentos para os produtos processados a base de frutas. Foi retirado o uso do ácido D-isoascórbico como antioxidante, o qual poderia ser utilizado em substituição ao ácido L-ascórbico e indicar presença de vitamina C nos produtos. Recentemente a Anvisa aprovou a revisão de regras para rotulagem de alimentos, facilitando a escolha consciente dos produtos.

3.5 Embalagens para alimentos

3.5.1 Vidro

O termo "vidro" é uma palavra geral usada para descrever sólidos amorfos. Materiais constituídos de vidro são sólidos amorfos que muitas vezes contêm múltiplos componentes que foram derretidos e resfriados de uma maneira que impediu a cristalização. O vidro é composto principalmente do elemento silício. O silício não existe sozinho na natureza, existindo como sílica ou silicatos. A sílica é o dióxido de silício (SiO_2), comumente encontrado em areia e quartzo. Um silicato

é um composto feito de silício, oxigênio e pelo menos um metal, às vezes com hidrogênio (SACHA et al., 2016).

O vidro utilizado na produção de embalagens para alimentos é o vidro de soda-cal, contendo tipicamente 68%-73% de SiO_2 , 12%-15% de Na_2O , 10%-13% de CaO , e outros óxidos em menor proporção (ROBERTSON, 1993). O vidro borossilicato também pode ser usado para contato com alimentos, sendo composto principalmente de dióxido de silício (81%) e óxido bórico (13%), com baixos níveis de óxidos não formadores de rede (como óxidos de sódio e alumínio) (SACHA et al., 2016).

As vantagens do vidro como material de embalagem são a transparência, a inércia, a impermeabilidade, a rigidez, a resistência térmica (quando devidamente aquecido), e o apelo geral do consumidor. Suas desvantagens são fragilidade, peso e custo. Os recipientes de vidro são padronizados em um grau menor do que as latas de metal, onde a maioria das garrafas e frascos de vidro são feitas sob medida e especificamente para diferentes produtos ou fabricante. Por outro lado, as tampas para recipientes de vidro são mais padronizadas. Os recipientes de vidro também podem ser reutilizados ou reciclados (BERK, 2018).

Embora a maioria dos recipientes de vidro para alimentos seja transparente, a cor pode distinguir o recipiente de vidro, protegendo seu conteúdo de raios ultravioletas indesejados. A cor pode ser obtida simplesmente adicionando pequenas quantidades de diferentes óxidos, tais como cromo (para verde), cobalto (para azul), níquel (para violeta/marrom) ou selênio (para vermelho) (ROBERTSON, 2013).

Uma das vantagens dos recipientes de vidro é a transparência que o material apresenta, permitindo que os consumidores visualizem o produto antes de comprá-lo, o que pode, às vezes, impactar na escolha do consumidor. No entanto, uma das preocupações na embalagem de vidro para alimentos é a proteção contra a luz (visível, infravermelho e ultravioleta). Vários estudos demonstraram que, em geral, o vidro transparente carece de proteção dos alimentos a luz, o que pode facilitar a ocorrência de algumas reações deteriorantes, reduzindo a vida útil dos produtos. Apesar deste fato, as propriedades protetoras dos vidros claros podem ser melhoradas pela adição de vários óxidos metálicos e corantes fortes, embora os custos possam ser desafiadores às vezes. Em geral, estudos mostram que vidros

claros podem bloquear apenas 10% da luz nociva, enquanto vidros verdes e âmbar são capazes de bloquear 50% e 90%, respectivamente (KOBAYASHI, 2016).

3.5.2 Polietileno tereftalato (PET)

Entre os materiais de embalagem de alimentos, os plásticos são os mais utilizados: polietileno de baixa densidade (PEBD), polipropileno, polietileno tereftalato (PET), polietileno de alta densidade, poliestireno e poliestireno expandido. Os bioplásticos, como o ácido polilático, também são usados para embalagens de alimentos, mas atualmente representam menos de 1% do consumo mundial de plásticos. Alguns plásticos também estão sendo feitos em pequena escala a partir de materiais renováveis, como o PEBD e PET, em que a química permanece idêntica, independentemente de os plásticos serem feitos de recursos renováveis ou fósseis (GEUEKE, 2014).

O PET é produzido por polimerização do ácido tereftálico (TPA) e etilenoglicol (EG) em uma reação de condensação. Um catalisador é usado para conduzir a reação para um alto peso molecular, sendo os compostos de antimônio os mais comuns. Acredita-se que os compostos de germânio usados como catalisador produzem PET com melhor cor e claridade. Estabilizadores térmicos são implantados para evitar a degradação e a formação de cores durante a alta temperatura da reação. O elevado vácuo deve ser aplicado pelo menos até o final do processo, para remover a água e outros voláteis e facilitar o acúmulo de peso molecular (WEISSMANN, 2017).

Plásticos, incluindo o polietileno tereftalato (PET), possuem baixa permeabilidade a gases. A taxa de permeação dos gases depende da estrutura química do gás particular e do material da embalagem. Apesar da barreira do PET ser melhor e ter aumento da cristalinidade comparado a muitos outros materiais plásticos, a barreira à transmissão de oxigênio, CO₂, luz UV, e vapor de água, é limitada em muitos casos para embalagens de alimentos. Para contornar essa limitação, são utilizados vários materiais e composições para o aumento da barreira (KUTZ, 2017).

Por se tratar de um material que naturalmente não apresenta coloração, a garrafa PET apresenta algumas vantagens e desvantagens. Produtos embalados em PET transparente não possuem proteção adequada contra os raios ultravioleta,

sendo as vitaminas e corantes, os ingredientes mais afetados. Os comprimentos de onda absorvidos pelo PET estão na faixa de até 320 nm (radiação ultravioleta B), em comprimentos de onda mais longos, com faixas entre 320 e 400nm (radiação ultravioleta A). O PET não é capaz de absorver a radiação, sendo necessária a utilização de absorvedores UV (COUGHLIN; SCHAMBONY, 2008).

A indústria alimentícia está constantemente buscando novas tecnologias no desenvolvimento de embalagens que melhorem ainda mais os parâmetros críticos, como qualidade, segurança, rastreabilidade e prazo de validade dos alimentos. Nos últimos anos, há um esforço para melhorar as propriedades dos materiais de embalagens existentes, sendo utilizada a nanotecnologia na indústria de embalagem de alimentos (TSAGKARIS et al., 2018).

Diversos estudos realizados na área de embalagens para alimentos mostram o desenvolvimento de nanomateriais, que são frequentemente apresentados na forma de encapsulados, filmes e biofilmes, sendo combinados com antibacterianos como óleos essenciais, polissacarídeos, óxido de zinco e prata (AZLIN-HASIM et al., 2018; KAEWPRACHU, 2018; KAO et al., 2018; LIN et al., 2018; LUCHESE et al., 2018; NASKAR et al., 2018; NIU, et al., 2018).

Aplicações de embalagens nanoestruturadas já fazem parte do mercado dos Estados Unidos e países asiáticos, contudo, por falta de métodos de referência, materiais de referência e protocolos padronizados para análise de nanopartículas em matrizes alimentares, as aplicações de embalagens nanoestruturadas não foram aceitas pelo mercado europeu (TSAGKARIS et al., 2018).

No Brasil inexistente legislação específica para nanotecnologia, necessitando de especialistas para integração de esforços que viabilizem a criação de uma regulação sobre sua utilização, manuseio e difusão de nanomateriais, e sobre a minimização de possíveis riscos aos seres humanos e meio ambiente (CALAÇA, 2015).

3.6 Fotoestabilidade

O estudo de fotoestabilidade tem por objetivo demonstrar que a exposição à luz resultará ou não, em alterações significativas na molécula. Deve ser constituído em duas etapas: degradação forçada e teste confirmatório. Quando o teste não é realizado deve-se apresentar uma justificativa técnica com evidência científica de

que o composto não sofre degradação na presença da luz, sendo este modelo aplicado especificamente a medicamentos e insumos farmacêuticos (BRASIL, 2012).

No guia de fotoestabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é descrito que o procedimento de exposição à luz dos produtos é feito em sua embalagem primária, dentro de uma câmara isolada com controle de ventilação, temperatura e incidência luminosa mínima de 1,2 milhões de Lux horas, integrados à energia da radiação UV próxima de não menos que 200 watts horas/m² para estudos de confirmação. Sendo assim, recomenda-se utilizar câmaras com lâmpada branca fluorescente fria combinada com lâmpada fluorescente UV com espectro distribuído entre 320 nm e 400 nm, e emissão máxima de energia entre 350 nm e 370 nm (BRASIL, 2012).

A radiação ultravioleta (UV) se encontra entre os comprimentos de onda de 200 a 380 nm, tendo as classificações de UV-B de 280 a 315 nm e UV-A de 315 a 380 nm (SILVERSTEIN et al., 1987; GUGUMUS, 2001).

Apesar de que os comprimentos de onda correspondente à radiação ultravioleta comparativamente sejam baixos, de 200 a 300 nm, a radiação emitida nessa região tem maior energia que o comprimento emitido no espectro visível, entre 380 e 780 nm, sendo a energia diretamente proporcional à frequência e inversamente proporcional ao comprimento de onda da radiação (SILVERSTEIN et al., 1987).

Estudo realizado por Ogi et al. (2018), analisando a exposição da luz em sucos de frutas cítricas acondicionados em garrafa PET, demonstraram que há um composto que surge durante a exposição e armazenamento dos sucos cítricos, identificado como feruloiputrescina (C₁₄H₂₀N₂O₃), sendo este composto identificado utilizando CLAE – MS. Concluindo que este composto pode ser usado para indicar o nível de exposição à luz em produtos cítricos. São escassos dados referentes a estudos de fotoestabilidade de alimentos processados, sendo este um dos únicos estudos recentes.

3.7 Determinação de vitamina C

Para determinação do AA em alimentos, geralmente é utilizado o método oficial da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), que consiste em uma

titulação envolvendo o 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFI), conhecido como Reagente de Tillmans (AOAC, 2007), sendo utilizado na análise em sucos de frutas e outros alimentos, e incapaz de diferenciar a vitamina C de outras substâncias que também reagem com o DCFI, apresentando ponto de viragem de difícil visualização para amostras coloridas, dificultando sua aplicação em sucos de frutas (CUNHA et al., 2014; ARYA et al., 2000).

Há também a utilização de outros métodos de análise do AA, incluindo métodos eletroquímicos (YANG et al., 2014; LIAN et al., 2014), espectrofotométricos (MALASHIKHINA; PAVLOV, 2012; LIU et al., 2015), cromatográficos (BOONPANGRAK et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2012; CHEBROLU et al., 2012; MAZUREK; JAMROZ, 2015; SPÍNOLA et al., 2013; SPÍNOLA; LLORENT-MARTÍNEZ; CASTILHO, 2014; CUNHA-SANTOS et al., 2018) e colorimétricos (PENG et al., 2015), os quais têm sido amplamente desenvolvidos nos últimos anos. Dentre estes métodos, o colorimétrico por observação a olho nu é simples, rápido e eficaz em termos de custos, o qual tem um grande potencial para a detecção rápida do ácido ascórbico (PENG et al., 2015).

Para a determinação de ácido ascórbico em soluções aquosas, foi desenvolvido um novo método espectrofotométrico, baseado em sua capacidade de reduzir as cores de permanganato de potássio (KMnO_4) e dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (FADHE, 2012). Por este método, o intervalo de concentração de AA detectável é na ordem de partes por milhão (ppm).

Uma metodologia colorimétrica recente para análise de traços de AA é baseada na técnica de impressão a jato de tinta usando como reagente o complexo 2,20-bipiridil- $\text{Fe}\beta_3$ (bipy- $\text{Fe}\beta_3$), immobilizado em uma matriz de Nafion (DONATO et al., 2015). O AA também foi detectado utilizando flores de grafeno (DU et al., 2014), nanopartículas de carbono altamente fotoluminescentes dopadas com nitrogênio fornecendo excelente sensibilidade e seletividade de 0,2 a 150 mM (ZHU et al., 2015), e em sensores eletroquímicos radiométricos (CHENG, WANG, WEI, 2015).

Diversos métodos são empregados na quantificação do AA em alimentos, porém, há dificuldade na discriminação de seus isômeros o que pode levar a falhas na sua real estimativa e atividade vitamínica (OLIVEIRA et al., 2012).

A principal vantagem dos métodos cromatográficos é sua adequabilidade a vários detectores, permitindo a identificação e quantificação dos constituintes das amostras com alta sensibilidade e exatidão (EITENMILLER et al., 2008; QUIRÓS;

FERNÁNDEZ-ARIAS; LÓPEZ- HERNÁNDEZ, 2009). Em estudo realizado por Boonpangrak et al., (2016), foi utilizado um cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massa para analisar os ácidos ascórbico e D-isoascórbico em sucos de laranja e goiaba, com uma coluna C₁₈, com condição isocrática (0,1% de ácido fórmico como fase móvel, fluxo de 0,1 mL min⁻¹ durante 12 min, e uma temperatura da coluna de 10°C). O espectrômetro de massa foi operado no modo de ionização por electrospray (ESI) negativo. Estes autores concluíram que o método desenvolvido possui um baixo custo de reagentes e rápida detecção, podendo ser utilizado em análises de rotina para quantificação do ácido ascórbico e D-isoascórbico.

Oliveira et al. (2012), quantificaram os isômeros L-ascórbico e D-isoascórbico em amostras de geleias de frutas, utilizando coluna C₁₈ com fase reversa, a fase móvel consistiu em 2,3 mmol L⁻¹ de brometo de hexadecil trimetil amônio, 2,5 mmol L⁻¹ de Na₂ EDTA, 80 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio anidro e 20 mmol L⁻¹ de acetato de sódio, ajustando a pH 4,5 com ácido orto-fosfórico sendo aplicada eluição isocrática a 0,8 mL min⁻¹. O detector utilizado foi um arranjo de diodos acoplado (DAD) a 265 nm. Os autores concluíram que o método identificou e quantificou os isômeros, ácido L-ascórbico e D-isoascórbico, sendo seletivo, linear, repetitivo e com elevado grau de recuperação.

A importância do consumo da vitamina C na dieta humana, e o seu largo uso em produtos processados a base de frutas, principalmente bebidas acondicionadas em grande maioria em embalagens de vidro e PET, que não possuem total proteção à radiação visível e UV, fortalece a necessidade de estudos relacionados a fotodegradação deste nutriente, garantindo que o consumidor ao adquirir o produto tenha a suplementação indicada em seu rótulo.

Estudos de fotoestabilidade são recorrentes em fármacos, mas pouco explorados quando se trata de produtos alimentícios expostos à venda, uma área que se deixa de explorar. A identificação e quantificação do AA e ADIA se torna dificultosa devido a sua estereoisomeria, exigindo ainda mais dos métodos de determinação o que aumenta a necessidade de utilização de métodos analíticos sensíveis e seletivos, como CLAE.

A Tabela 1, apresenta métodos cromatográficos utilizados na separação de isômeros da vitamina C.

Tabela 1 – Métodos de separação de isômeros da vitamina C disponíveis na literatura

Composto	Amostra	Extração	Fase estacionária	Fase móvel	Detector	Referência
AAT, ADIA	Produtos fortificados: cereais, sopas, sucos, compotas	Diluição com a fase móvel, filtração	Ion-pair LiChrospher RP-18	ACN, acetato de sódio (pH 5,4), ducilamina, TCEP	DAD	Fontanna z et al., 2006
AA, ADIA	Sucos de frutas	Diluição com 6,25% de PA; 2.5 mM TCEP; 2.5 mM EDTA	TSK gel Amide-80	ACN:0,1% TFA	DAD	Barros et al., 2010
AA, ADIA	Geleia de frutas	PA 1%	Waters Spherisorb ODS-2	BHTA, EDTA, fosfato de sódio anidro, acetato de sódio	DAD	Oliveira et al., 2012
AA, ADHA, AAT	Frutas e hortaliças	PA 3%, ácido acético 8%, EDTA 1mM	Acquity HSS C ₁₈	Ácido fórmico 0,1%, água (v/v)	DAD	Spínola et al., 2012
AA, ADHA, AAT	Suco de frutas	PA 5%	LiChrospher C ₁₈	Metanol, TFPM (0,005 M)	DAD	Klimczak et al., 2015

ACN = Acetonitrila; TCEP = Cloridrato de Tri - [2-carboxietil] fosfina; BHTA = Brometo hexadecil trimetil amônio; TFA = Ácido trifluoroacético; PA = Ácido fosfórico; TFPM = Tampão fosfato de potássio monobásico; EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético; AAT = ácido ascórbico total; ADIA = ácido D-isoascórbico; AA = ácido ascórbico; ADHA = ácido dehidroascórbico

As principais convergências da tabela 1 são quanto a extração dos isômeros da vitamina C, o reagente mais utilizado trata-se do ácido fosfórico, auxiliando na estabilização da vitamina C durante a análise. A fase estacionária que é mais utilizada são colunas de fase reversa C₁₈ devido à natureza não volátil e hidrofílica da vitamina C, também sendo usado coluna de fase normal NH₂. A forte absorção da vitamina C na região ultravioleta faz com que detectores como, detector de arranjo de diodos (DAD) seja um dos mais populares.

Percebe-se a grande versatilidade de métodos para análise de vitamina C na classe das técnicas instrumentais, entretanto são escassos os estudos que utilizem as ferramentas analíticas para apresentar dados sobre a fotodegradação induzida de alimentos processados contendo vitamina C.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR. Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não Alcoólicas. Dados do Setor. 2017. Disponível em: <https://abir.org.br/o-setor/dados/>. Acesso em: 12/04/2019.

AOAC. Vitamin C (ascorbic acid) in vitamin preparation and juices: 2,6 dichloroindophenol titrimetric method final reaction, Ch. 45.1.14. In W. Horwitz, & G. W. Latimer (Eds.), **Officials Methods of Analysis**. Association of official analytical chemist (Maryland US), 2007.

ARYA, S. P.; MAHAJAN, M.; JAIN, P. Non-Spectrophotometric Methods for the Determination of Vitamin C. **Analytica Chimica Acta**, New York, v. 417, n. 1, p. 1-14, 2000.

AZLIN-HASIM, S.; CRUZ-ROMERO, M. C.; MORRIS, M. A.; CUMMINS, E.; KERRY, J. P. Spray coating application for the development of nanocoated antimicrobial low-density polyethylene films to increase the shelf life of chicken breast fillets. **Food Science and Technology International**, p. 1082013218789224, 2018.

BACIGALUPI, C.; MAUREY, A.; BOUTROY, N.; PEYRON, S.; AVALLONE, S.; CHALIER, P. Changes in nutritional value of a multi-vitamins fortified juice packed in glass and standard PET bottles. **Food Control**, v. 60, p. 256-262, 2016.

BARROS, A. I.; SILVA, A. P.; GONÇALVES, B.; NUNES, F. M. A fast, simple, and reliable hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of ascorbic and isoascorbic acids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 5, p. 1863-1875, 2010.

BERK, Z. **Food Process Engineering and Technology**. 3. ed. Londres: Academic Press, 2018.

BHARATE, Sonali S.; BHARATE, Sandip B. Non-enzymatic browning in citrus juice: chemical markers, their detection and ways to improve product quality. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2271-2288, 2014.

BOONPANGRAK, S.; LALITMANAT, S; SUWANWONG, Y; PRACHAYASITTIKUL, S; PRACHAYASITTIKU, V. Analysis of ascorbic acid and isoascorbic acid in orange

and guava fruit juices distributed in Thailand by LC-IT-MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 6, p. 1616-1626, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC N° 45, de 9 de agosto de 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0045_09_08_2012.htm>. Acesso em: 18/08/2018.

BRASIL. Casa Civil. Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Intersectorial de Bebidas e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 14, de julho de 1994.

BRASIL. Casa Civil. Decreto nº 6871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 04, de junho de 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 19 de 19 de junho de 2013. Estabelece em todo território nacional a complementação dos padrões de identidade e qualidade para as seguintes bebidas, refresco, refrigerante, bebida composta, chá pronto para consumo e soda. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 20, de junho de 2013b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Estabelecer as presentes normas, que têm por objetivo fixar a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer às geleias de frutas. Câmara Técnica de Alimentos, do Conselho Nacional de Saúde, Brasília, 04, de maio de 1978.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. RDC nº 8 de 6 de março de 2013. Dispõe sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares para produtos de frutas e de vegetais e geleia de mocotó. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 8, de março de 2013a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 269 de 22 de setembro de 2005. O "Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de setembro de 2005.

BRASIL. Ministério de Estado, Interino, da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 12 de 4 de setembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical; os Padrões de Identidade e Qualidade dos Sucos Tropicais de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Mangaba, Maracujá e Pitanga; e os Padrões de Identidade e Qualidade dos Néctares de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Maracujá, Pêssego e Pitanga. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 4, de setembro de 2003.

CALAÇA, I. NANOTECNOLOGIA: subsídios para o acompanhamento do tema. **Revista Brasileira de Inteligência**. Brasília: Abin, n. 9, p. 39-50, 2015.

CHEBROLU, K. K.; JAYAPRAKASHA, G. K.; YOO, K. S.; JIFON, J. L.; PATIL, B. S. An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC. **LWT-Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 443-449, 2012.

CHENG, Hanjun; WANG, Xiaoyu; WEI, Hui. Ratiometric electrochemical sensor for effective and reliable detection of ascorbic acid in living brains. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 17, p. 8889-8895, 2015.

COUGHLIN, Greg; SCHAMBONY, Simon. New UV absorber for PET packaging: better protection with less discoloration. **Journal of Plastic Film & Sheeting**, v. 24, n. 3-4, p. 227-238, 2008.

CUNHA, K. D.; SILVA, P. R.; COSTA, A. L. F. S. F.; TEODORO, A. J. Estabilidade de ácido ascórbico em sucos de frutas frescos sob diferentes formas de armazenamento. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 17, n. 2, p. 139-145, 2014.

CUNHA-SANTOS, E. C. E.; VIGANÓ, J.; NEVES, D. A.; MARTÍNEZ, J.; GODOY, H. T. Vitamin C in camu-camu [*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh]: evaluation of extraction and analytical methods. **Food Research International**, 2018.

DE QUIRÓS, A. Rodríguez-Bernaldo; FERNÁNDEZ-ARIAS, M.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks. **Food Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 509-512, 2009.

DEUTSCH, John C. Spontaneous hydrolysis and dehydration of dehydroascorbic acid in aqueous solution. **Analytical Biochemistry**, v. 260, n. 2, p. 223-229, 1998.

DONATO, N.; ALOISIO, D.; LEONARDI, S. G.; LATINO, M.; NERI, G. On paper colorimetric sensor for ascorbic acid detection. In: **AISEM Annual Conference, 2015 XVIII**. IEEE, 2015. p. 1-3

DRIVELOS, Spyros; DASENAKI, Marilena E.; THOMAIDIS, Nikolaos S. Determination of isoascorbic acid in fish tissue by hydrophilic interaction liquid chromatography–ultraviolet detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 6, p. 2199-2210, 2010.

DU, J.; YUE, R.; REN, F.; YAO, Z.; JIANG, F.; YANG, P.; DU, Y. Novel graphene flowers modified carbon fibers for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 53, p. 220-224, 2014.

EITENMILLER, R. R.; YE, L.; LANDEN J. R. W. O. Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences, 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.

FADHEL, D. H. Spectrophotometric determination of ascorbic acid in aqueous solutions. **Journal of Al-Nahrain University-Science**, v. 15, n. 3, p. 88-94, 2012.

GEUEKE, B. Bioplastics as food contact materials. In: GEUEKE, B. (Ed.), Dossiers. **Food Packaging Forum Foundation**, Zurich, 2014.

GRAVIER-PELLETIER, C.; LE MERRER, Y.; DEPEZAY, J. Enantiopure hydroxylactones from L-ascorbic and D-isoascorbic acids. Part II. Synthesis of (–)-(5R, 6S)-6-acetoxy-5-hexadecanolide and its diastereomers. **Tetrahedron**, v. 51, n. 6, p. 1663-1674, 1995.

GUGUMUS, F. Light stabilizers. In: ZWEIFEL, H. editor. **Plastics Additives Handbook**. 5th. ed. Munich: Hanser, p.141-425, 2001.

INSTITUTE OF MEDICINE. Food and Nutrition Board: Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. National Academies Press, Washington, DC, USA, 2000. Disponível em: http://www.iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs//media/Files/Activity%20Fies/Nutrition/DRIs/5_Sum-mary%20Table%20Tables%201-4.pdf. Acessado em 17/03/2019.

JOHNSTON, C. S.; STEINBERG, F. M.; RUCKER, R. B. Ascorbic acid. In: ZEMPLENI J.; RUCKER, R. B.; MCCORMICK, D. B.; SUTTIE, J. W. **Handbook of Vitamins**, 4 ed., Florida: CRC Press, Boca Raton, p. 489–520, 2007.

KAEWPRACHU, Pimonpan; OSAKO, Kazufumi; RAWDKUEN, Saroat. Effects of plasticizers on the properties of fish myofibrillar protein film. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 8, p. 3046-3055, 2018.

KALL, Morten A.; ANDERSEN, Carina. Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 730, n. 1, p. 101-111, 1999.

KAO, C. Y.; HUANG, Y. C.; CHIU, S. Y.; KUO, K. L.; HWANG, P. A. Bacteriostatic Effect of a Calcined Waste Clamshell-Activated Plastic Film for Food Packaging. **Materials (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 8, 2018.

KLIMCZAK, I., & GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A. (2015). Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. **Food Chemistry**, 175, 100 –105.

KOBAYASHI, M. L. Glass Packaging Properties and Attributes. In: **Reference Module in Food Science**. Londrina: Elsevier, 2016.

KUTZ, M. **Applied Plastics Engineering Handbook: Processing, Materials, and Applications**. 2. ed. Londres: Academic Press, 2017.

LAVOIE, J. C.; CHESSEX, P.; ROULEAU, T.; MIGNEAULT, D.; COMTE, B. Light-induced byproducts of vitamin C in multivitamin solutions. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 135-40, 2004.

LEE, Seung K.; KADER, Adel A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, n. 3, p. 207-220, 2000.

LIAN, Q.; HE, Z.; HE, Q.; LUO, A.; YAN, K.; ZHANG, D.; ZHOU, X. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid based on tryptophan functionalized graphene. **Analytica Chimica Acta**, v. 823, p. 32-39, 2014.

LIN, L.; ZHU, Y.; LI, C.; LIU, L.; SURENDHIRAN, D.; CUI, H. Antibacterial activity of PEO nanofibers incorporating polysaccharide from dandelion and its derivative. **Carbohydrate Polymers**, 2018.

LIU, J. J.; CHEN, Z. T.; TANG, D. S.; WANG, Y. B.; KANG, L. T.; YAO, J. N. Graphene quantum dots-based fluorescent probe for turn-on sensing of ascorbic acid. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 212, p. 214-219, 2015.

LOUARME, Loïc; BILLAUD, Catherine. Evaluation of ascorbic acid and sugar degradation products during fruit dessert processing under conventional or ohmic heating treatment. **LWT-Food Science and Technology**, v. 49, n. 2, p. 184-187, 2012.

LUCHESE, C. L.; PAVONI, J. M. F.; DOS SANTOS, N. Z.; QUINES, L. K.; POLLO, L. D.; SPADA, J. C.; TESSARO, I. C. Effect of chitosan addition on the properties of films prepared with corn and cassava starches. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 8, p. 2963-2973, 2018.

MALASHIKHINA, Natalia; PAVLOV, Valeri. DNA-decorated nanoparticles as nanosensors for rapid detection of ascorbic acid. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 33, n. 1, p. 241-246, 2012.

MANDL, J.; SZARKA, A.; BANHEGYI, G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 7, p. 1097-1110, 2009.

MARGOLIS, Sam A.; SCHAPIRA, Ralph M. Liquid chromatographic measurement of L-ascorbic acid and D-ascorbic acid in biological samples. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 690, n. 1-2, p. 25-33, 1997.

MAZUREK, Artur; JAMROZ, Jerzy. Precision of dehydroascorbic acid quantitation with the use of the subtraction method—Validation of HPLC–DAD method for determination of total vitamin C in food. **Food Chemistry**, v. 173, p. 543-550, 2015.

MAZUREK, Artur; PANKIEWICZ, Urszula. Changes of dehydroascorbic acid content in relation to total content of vitamin C in selected fruits and vegetables. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 11, n. 6, p. 169-177, 2012.

NASKAR, A.; KHAN, H.; SARKAR, R.; KUMAR, S.; HALDER, D.; JANA, S. Antibiofilm activity and food packaging application of room temperature solution process based polyethylene glycol capped Ag-ZnO-graphene nanocomposite. **Materials Science and Engineering: C**, v. 91, p. 743-753, 2018.

NIU, B.; YAN, Z.; SHAO, P.; KANG, J.; CHEN, H. Encapsulation of Cinnamon Essential Oil for Active Food Packaging Film with Synergistic Antimicrobial Activity. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 8, 2018.

ODRIOZOLA-SERRANO, Isabel; HERNÁNDEZ-JOVER, Teresa; MARTÍN-BELLOSO, Olga. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1151-1158, 2007.

OEY, I., VAN DER PLANCKEN, I., VAN LOEY, A., & HENDRICKX, M. Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems? **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 6, p. 300-308, 2008.

OEY, I., VERLINDE, P., HENDRICKX, M., & VAN LOEY, A. Temperature and pressure stability of L-ascorbic acid and/or [6s] 5-methyltetrahydrofolic acid: A kinetic study. **European Food Research and Technology**, v. 223, n. 1, p. 71-77, 2006.

OGI, Kayako; OTSUKA, Takako; SUMITANI, Hidenobu. Isomerization of feruloylputrescine in orange juice by light exposure. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 127-134, 2018.

OLIVEIRA, Raquel Grando; GODOY, Helena Teixeira; PRADO, Marcelo Alexandre. Quantificação dos isômeros ácido L-ascórbico e ácido D-iso-ascórbico em geleias

de frutas por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1020-1024, 2012.

PENG, J., LING, J., ZHANG, X. Q., ZHANG, L. Y., CAO, Q. E., & DING, Z. T. A rapid, sensitive and selective colorimetric method for detection of ascorbic acid. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 221, p. 708-716, 2015.

PHILLIPS, K. M.; TARRAGO-TRANI, M. T.; GEBHARDT, S. E.; EXLER, J.; PATTERSON, K. Y.; HAYTOWITZ, D. B.; PEHRSSON, P. R.; HOLDEN, J. M. Stability of Vitamin C in Frozen Raw Fruit and Vegetable Homogenates. **Journal of Food Composition and Analysis**, London, v. 23, p. 253-259, 2010.

REHWOLDT, R. Tracking the use of antioxidants through industry surveys. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 10-11, p. 1039-1041, 1986.

ROBERTSON, G.L. **Food Packaging: Principles and Practice**. 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 2013.

ROBERTSON, Gordon L. **Food Packaging, Principles and Practice**, first ed. Marcel Dekker, New York. 1993.

ROIG, M. G.; RIVERA, Z. S.; KENNEDY, J. F. A model study on rate of degradation of L-ascorbic acid during processing using home-produced juice concentrates. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 46, n. 2, p. 107-115, 1995.

RUSSELL, L. F. Water-soluble vitamins. In: NOLLET, L. M. L. **Handbook of Food Analysis: physical characterization and nutrient analysis**. Marcel Dekker, New York, p. 487–571, 2004.

SACHA, G. A.; MILLER, R.; SAFFELL-CLEMMER, W; ABRAM, K; AKERS, M. J. Practical Fundamentals of Glass Packaging. In: **Reference Module in Food Science**. Londres: Elsevier, 2016.

SANCHEZ-MATA, M. C.; CAMARA-HURTADO, M.; DIEZ-MARQUES, C.; ESPERANZA, M.; TORIJA-ISASA. Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **European Food Research and Technology**, 210, 220, 2000.

SCHACHTNER, Josef; STACHEL, Hans-Dietrich. Organoalane-mediated isomerization of ascorbic and isoascorbic acid derivatives. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 7, n. 11, p. 3263-3276, 1996.

SEBARCHIEVICI, I.; LASCU, A.; FAGADAR-COSMA, G.; PALADE, A.; FRINGU, I.; BIRDEANU, M.; FAGADAR-COSMA, E. Optical and electrochemical-mediated detection of ascorbic acid using manganese porphyrin and its gold hybrids. **Comptes Rendus Chimie**, v. 21, n. 3-4, p. 327-338, 2018.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; NORRIL, T. C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: Guanabara; p.203, 1987.

SPINOLA, V.; LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; CASTILHO, P. C. Determination of vitamin C in foods: Current state of method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1369, p. 2–17, 2014.

SPÍNOLA, V.; MENDES, B.; CÂMARA, J. S.; CASTILHO, P. C. Effect of time and temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC-PDA vs iodometric titration as analytical methods. **LWT-Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 489-495, 2013.

SHUKLA, R.; SINGH, R.; ARFI, S.; TIWARI, R.; TIWARI, G. Degradation and its forced effect: A trenchant tool for stability studies. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, v. 7, n. 4, 2016.

TARRAGO-TRANI, M. T.; PHILLIPS, K. M.; COTTY, M. Matrix-Specific Method Validation for Quantitative Analysis of Vitamin C in Diverse Foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, London, v. 26, n. 1-2, p. 12-25, 2012.

TSAGKARIS, Aristeidis S.; TZEGKAS, Spyros G.; DANEZIS, Georgios P. Nanomaterials in food packaging: state of the art and analysis. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1-9, 2018.

VAID, F. H. M.; SHAIKH, R. H.; ANSARI, I. A.; AHMAD, I. Spectral study of the photolysis of aqueous thiamine hydrochloride and ascorbic acid solutions in the presence and absence of riboflavin. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 27 (3), p. 227–232, 2005.

VALENTE, A.; SANCHES-SILVA, A.; ALBUQUERQUE, T.G.; COSTA, H. S. Development of an orange juice in-house reference material and its application to

guarantee the quality of vitamin C determination in fruits, juices and fruit pulps. **Food Chemistry**, v. 154, p. 71-77, 2014.

VERSARI, Andrea et al. Rapid analysis of ascorbic and isoascorbic acids in fruit juice by capillary electrophoresis. **Food Control**, v. 15, n. 5, p. 355-358, 2004.

WALKER, R. Erythorbic acid and its sodium salt. In: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA). **Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants**. World Health Organization, Geneva, p. 27–60, 1991.

WANG, Y.; MACKENZIE, B.; TSUKAGUCHI, H.; WEREMOWICZ, S.; MORTON, C. C.; HEDIGER, M. A. Human vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1. **Biochemical Biophysical Research Communications**, 267 (2), 488-94, 2000.

WEISSMANN, Dan. PET Use in Blow Molded Rigid Packaging. In: **Applied Plastics Engineering Handbook**, 2 ed., Londres: Elsevier, p. 717-741, 2017.

WILLS, Ron BH; WIMALASIRI, Pushparani; GREENFIELD, Heather. Dehydroascorbic acid levels in fresh fruit and vegetables in relation to total vitamin C activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 836-838, 1984.

WILSON, John X. The physiological role of dehydroascorbic acid. **FEBS Letters**, v. 527, n. 1-3, p. 5-9, 2002.

YANG, Fengchun et al. A highly sensitive ascorbic acid sensor based on carbon-supported CoPd nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 205, p. 20-25, 2014.

ZHU, X.; ZHAO, T.; NIE, Z.; LIU, Y.; YAO, S. Non-redox modulated fluorescence strategy for sensitive and selective ascorbic acid detection with highly photoluminescent nitrogen-doped carbon nanoparticles via solid-state synthesis. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 16, p. 8524-8530, 2015.

5. RESULTADOS

ARTIGO 1 - CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO DE ISÔMEROS DA VITAMINA C (ÁCIDO D-ISOASCÓRBICO E ÁCIDO L-ASCÓRBICO) POR CLAE-DAD

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da temperatura empregada na fase móvel, observando os parâmetros cromatográficos: fator de capacidade (k), fator de separação (α), resolução (R_s), número dos pratos teóricos (N) e altura dos pratos teóricos (h), na determinação dos ácidos D-isoascórbico e L-ascórbico, avaliando produtos processados a base de frutas. Foi realizada adequação da metodologia de Bui-Nguyên (1980), a extração foi do tipo líquido-sólido e/ou líquido-líquido utilizando solução de ácido fosfórico à 3%, com filtração e, centrifugação seguida de filtração. Foi utilizada uma coluna de fase normal NH_2 (150 x 4,6 mm) 3 μm , em eluição isocrática utilizando acetonitrila e tampão fosfato de potássio monobásico (0,005 mol.L⁻¹) pH 4,8 na proporção 80:20 v/v e temperaturas de 30, 45 e 60°C. A temperatura de 30°C foi escolhida apresentando resultados satisfatórios para os parâmetros cromatográficos na separação dos isômeros ácido D-isoascórbico e ácido L-ascórbico. O método proposto se mostrou sensível quanto aos padrões apresentando LD 0,0092 $\mu g.mL^{-1}$ e 0,0131 $\mu g.mL^{-1}$, e LQ 0,0278 $\mu g.mL^{-1}$ e 0,0397 $\mu g.mL^{-1}$ para ácido D-isoascórbico e L-ascórbico, respectivamente, com satisfatória linearidade e valores de R apresentando condições adequadas para quantificação. Valores quantificados nas amostras variaram de 0,29 a 12,01 mg.100mL⁻¹ de ácido L-ascórbico, os quais estão abaixo dos apresentados nos rótulos, não sendo detectada a presença do ácido D-isoascórbico nas amostras. Os valores para taxa de recuperação foram baixos, necessitando estudo quanto ao protocolo de extração.

Palavras-chave: Vitamina C, CLAE, Otimização

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the influence of the temperature used in the mobile phase, observing the chromatographic parameters: capacity factor (k), separation factor (α), resolution (R_s), number of theoretical plates (N) height of the theoretical plates (h) in the determination of D-isoascorbic and L-ascorbic acids, evaluating processed fruit products. The Bui-Nguyên (1980) methodology was adequate, liquid-solid and / or liquid-liquid extraction using 3% phosphoric acid solution with filtration and centrifugation followed by filtration. A standard 3mM NH_2 (150 x 4.6 mm) 3 μm phase column was used in isocratic elution using acetonitrile and monobasic potassium phosphate buffer (0.005 mol.L⁻¹) pH 4.8 in the ratio 80:20 v / v temperatures of 30, 45 and 60 ° C. The temperature of 30 ° C was chosen with satisfactory results for the chromatographic parameters in the separation of the isomers D-isoascorbic acid and L-ascorbic acid. The proposed method showed to be sensitive to the standards presenting LD 0.0092 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 0.0131 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, and LQ 0.0278 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 0.0397 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for acid D-isoascorbic and L-ascorbic acid, respectively, with satisfactory linearity and R values presenting adequate conditions for quantification. Quantified values in the samples varied from 0.29 to 12.01 mg.100mL⁻¹ of L-ascorbic acid, which are below those presented on the labels, and the presence of D-isoascorbic acid in the samples was not detected. Values for recovery rate were low, requiring study of the extraction protocol.

Key words: Vitamin C, HPLC, Optimization

INTRODUÇÃO

A denominação vitamina C refere-se a todos os compostos que exibem atividade biológica equivalente ao ácido L-ascórbico, incluindo produtos de oxidação (ácido dehidroascórbico), isômeros (ácido isoascórbico), ésteres (palmitato de acorbila), e formas sintéticas (6-deoxi-ácido-L-ascórbico, 2-fosfato-ácido-L-ascórbico). O ácido ascórbico é formado por uma estrutura com seis carbonos, podendo ser encontrado em algumas formas isoméricas: ácido L-ascórbico (AA), ácido D-ascórbico, ácido L-isoascórbico e ácido D-isoascórbico (ADIA) (ZEMPLINI, 2007; OLIVEIRA et al., 2012).

Entretanto, o AA também é uma das vitaminas mais susceptíveis a degradação, sofrendo rápidas alterações na presença de luz, oxigênio, pH do meio,

íons metálicos e temperatura. O AA está sujeito a perdas durante o processamento e armazenamento dos produtos processados, com sua oxidação à ácido dehidroascórbico, que ainda apresenta atividade vitamínica, mas é menos estável que o AA e pode ser novamente oxidado formando ácido dicetogulônico, que pode ser degradado à ácido oxálico, xilose e ácido xilônico, os quais não possuem atividade biológica da vitamina C (TARRAGO-TRANI et al., 2012; SPINOLA et al., 2013).

As técnicas utilizadas para quantificação do AA geralmente determinam o conteúdo de ácido ascórbico total (AAT) no alimento. Para tal utiliza-se o método padrão da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), que consiste em uma titulação envolvendo o 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFI), conhecido como Reagente de Tillmans (AOAC, 2007). Os isômeros AA e ADIA possuem estruturas químicas e propriedades físicas similares, não sendo possível a determinação por métodos tradicionais. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detectores universais como DAD e MS (WALKER, 1991; BOONPANGRAK et al. 2016; OLIVEIRA et al., 2012; CHEBROLU, 2012) atualmente é uma estratégia para tal determinação.

A CLAE é preferida na análise de vitamina C, pois permite maior seletividade que os métodos espectrofotométricos, titulométrico e enzimáticos. A sensibilidade da CLAE depende em grande parte da seleção de um detector adequado. Sendo mais comumente usados os detectores ultravioleta (UV) e arranjo de diodos (DAD). O AA apresenta uma forte absorção nas regiões ultravioleta entre 245-270 nm, tornando a absorbância UV a mais popular (NOVAKOVA et al., 2008; EITENMILLER et al., 2008; NYSSÖNEN, 2000).

Entretanto, a absorbância é fortemente dependente do pH, e esse aspecto deve ser levado em consideração. O pH da fase móvel é geralmente ajustado abaixo do pKa (4,17) do AA para estabilizar a absorbância, além de evitar sua degradação (SPINOLA, 2014).

Para a extração da vitamina C, a amostra é agitada com solução ácida, seguida de centrifugação, uma vez que as soluções ácidas ajudam a estabilizar a vitamina C. Os ácidos mais frequentemente utilizados são o ácido oxálico, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), ácido sulfúrico e ácido fosfórico (KLIMCZAK, 2015; ROSA et al., 2007; CAMPOS, RIBEIRO, DELLA LUCIA, & SANT'ANA, 2009; BOONPANGRAK et al. 2016).

Considerando as demandas para determinação de vitamina C por CLAE, o foco deste estudo foi avaliar a influência da temperatura empregada na fase móvel e condições de extração na determinação de isômeros da vitamina C (ácido D-isoascórbico e ácido L-ascórbico). A otimização da metodologia foi monitorada através dos parâmetros cromatográficos (k , α , R_s , N e h) e o método foi testado em produtos processados a base de frutas, avaliando a seletividade, identificação e quantificação por detecção DAD em sistema de fase normal.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório Multiusuário do Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL) situado no Departamento de Nutrição, na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Padrões e Reagentes

Para o preparo da fase móvel foram utilizados o fosfato de potássio monobásico (Sigma-Aldrich, Alemanha), ácido fosfórico (Fluka, Suíça) e acetonitrila (Merck, Alemanha), todos grau HPLC.

Padrões de ácido L-ascórbico, ácido D-isoascórbico, com grau de pureza superior a 99% foram obtidos de Sigma-Aldrich (EUA). Água ultra-pura obtida através do sistema de purificação do laboratório com resistividade da água produzida de até $18 \text{ m}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$.

Preparo dos padrões

O preparo dos padrões, ácido L-ascórbico e D-isoascórbico, seguiu-se pesando 2,0 mg de cada padrão, sendo diluídos em 2,0 mL de ácido fosfórico à 3% e completado o volume com água ultra-pura em um balão de 100 mL. Todos os padrões foram preparados no dia e protegidos da luz com papel alumínio durante o preparo e o uso.

Amostras e protocolo de extração

As amostras utilizadas neste estudo foram de duas marcas diferentes de bebida mista de frutas cítricas (laranja, limão e tangerina) (BM), geleia de goiaba (GE), concentrado líquido de fruta acerola e caju (CO), e suco integral de laranja (SI). Em todas as embalagens constavam na tabela nutricional e no rótulo a presença de vitamina C. As amostras foram adquiridas em quantidade de três cada, com diferentes lotes de fabricação, nos supermercados locais da região metropolitana do Recife no período de novembro de 2018 e abril de 2019.

As extrações das amostras foram realizadas pesando 1,0 g para sólidos e líquidos, diluídas em 40,0 mL de solução extratora de ácido fosfórico a 3%. Posteriormente agitadas em vórtex (Labnet) por 1 minuto, seguida de centrifugação em centrífuga refrigerada (Eppendorf) a 5000 rpm a 4°C, por 15 minutos, retirando o sobrenadante e filtrando em filtros para seringa de 0.20 µm (Chromafil). Para as amostras de BM foram realizadas duas formas de extrações, utilizando somente a filtração simples em filtro qualitativo e a centrifugação seguida de nova filtração simples em filtro qualitativo (Chromafil). Foram transferidos 1,0 mL de cada amostra para vials âmbar, seguindo para posterior análise em CLAE.

Equipamento

As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu, Japão), composto pelos seguintes módulos: sistema controlador modelo CBM-20A, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-20AV, bomba quaternária modelo LC - 20 AT, forno para coluna modelo CTO-20AC, amostrador automático modelo SIL-20AC. Todos os comandos foram realizados utilizando software *LC Solution* (versão 1.25, Shimadzu, Japão), e as detecções foram feitas pelo detector de arranjo de diodo com comprimento de onda na faixa de 200-400 nm.

Condições cromatográficas

Foi realizada uma adequação da metodologia Bui-Nguyên (1980), utilizando coluna cromatográfica NH₂ (150 x 4,6 mm) 3 µm. As soluções que entraram na composição da fase móvel foram: acetonitrila e tampão fosfato de potássio monobásico (0,005 mol.L⁻¹) filtradas em filtros Millipore com 0,22 µm de diâmetro. O tampão fosfato de potássio monobásico foi preparado com faixa de pH entre 4,2

e 4,8, quando necessário foi utilizado ácido fosfórico a 0,005 mol.L⁻¹ para ajuste do pH. O fluxo da fase móvel foi de 1,5 mL.min⁻¹ com temperatura da coluna em 30, 45 e 60±2°C e volume injetado de 20 µL para análise de padrões e amostras. A eluição foi realizada no modo isocrático, na proporção de 80:20 v/v acetonitrila:tampão fosfato de potássio monobásico 0,005 mol.L⁻¹ pré-aquecido a temperatura de 30, 45 e 60°C, e com o tempo de corrida total de 15 minutos por vial com amostra. O comprimento de onda de varredura foi fixado na faixa de 268 nm, com abertura da fenda de 8nm.

Estudo de adequação das condições cromatográficas

O estudo de adequação da metodologia foi realizado por meio de uma mistura de padrões de ácido D-isoascórbico e ácido L-ascórbico a uma concentração de trabalho 2,0 mg.mL⁻¹. Foram testadas temperaturas de 30, 45 e 60±2°C para o forno da coluna e para o tampão fosfato de potássio monobásico 0,005 mol.L⁻¹.

Para adequação da metodologia, foram monitoradas a temperatura do forno e do tampão fosfato de potássio monobásico 0,005 mol.L⁻¹ na avaliação do desempenho da separação cromatográfica. As temperaturas foram testadas utilizando uma coluna NH₂ (150 x 4,6 mm) 3 µm com taxa de fluxo 1,5 mL.min⁻¹.

Os parâmetros cromatográficos foram utilizados para interpretação dos resultados de desempenho de separação e calculados de acordo com a Eq. 1, para o fator de capacidade (k), em que t_0 representa o tempo de retenção do solvente não retido, enquanto t_r é o tempo de retenção do analito.

$$k = (t_r - t_0) \times (t_0)^{-1} \quad (1)$$

A resolução (R_s) e fator de separação (α) foram calculados usando Eqs. 2 e 3, respectivamente (Snyder et al. 1997), onde w é a largura do pico:

$$R_s = (t_2 - t_1) \times [0,5 \times (w_2 + w_1)]^{-1} \quad (2)$$

$$\alpha = (k_2) \times (k_1)^{-1} \quad (3)$$

Para o melhor desempenho em cromatografia clássica, o fator de capacidade deve estar entre $0,5 \leq k \leq 20$ enquanto $R_s \geq 1,5$ e $\alpha \geq 1,2$.

Os parâmetros monitorados durante o estudo da coluna foram o número de pratos teóricos (N), altura do prato teórico (h) e fator de cauda (T_f), calculados como descrito nas Eqs. 4, 5 e 6, respectivamente, onde L é o comprimento da coluna, e a e b são a meia largura frontal e posterior a 10% da altura do pico (Snyder et al. 1997):

$$N = 5,54 \times [t_r \times (w_{0,5})^{-1}]^2 \quad (4)$$

$$h = L \times N^{-1} \quad (5)$$

Identificação e quantificação

A identificação dos picos foi realizada por similaridade espectral (recurso do equipamento que permite a comparação dos espectros de padrões e amostras), e por comparação dos tempos de retenção de padrões e amostras.

A quantificação foi realizada por padronização externa através da construção de uma curva de calibração com 5 diferentes concentrações com 0,1; 0,08; 0,01; 0,05; 0,0008 mg.mL⁻¹ de ácido D-isoascórbico e ácido L-ascórbico. As soluções utilizadas para traçar a curva de calibração foram preparadas individualmente por diluição da solução estoque (2,0 mg.mL⁻¹ de ácido D-isoascórbico e ácido L-ascórbico) com 2,0 mL de ácido fosfórico 3% a partir do padrão individual, transferindo para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água ultra pura.

O limite de quantificação teórico (LQ) foi definido como a menor concentração do analito que alcançou um sinal 10 vezes acima da linha de ruído (ICH, 1994), utilizando a Equação 7:

$$LQ = \frac{(DP \times 10)}{IC}$$

O limite de detecção teórico (LD) foi definido como a menor concentração do analito que alcançou um sinal 3 vezes acima da linha de ruído (ICH, 1994), utilizando a Equação 8:

$$LD = \frac{(DP \times 3)}{IC}$$

DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo “y” de no mínimo três curvas analíticas e IC é a inclinação da curva de calibração.

Etapas de extração em matrizes complexas podem levar a perdas do analito, tendo o resultado final da análise inferior à concentração real do analito na amostra. Desta forma, a quantificação do analito pode ser estimada com a análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo, etapa conhecida como taxa de recuperação, utilizando a Equação 8 (RELACRE, 2000; INMETRO, 2007).

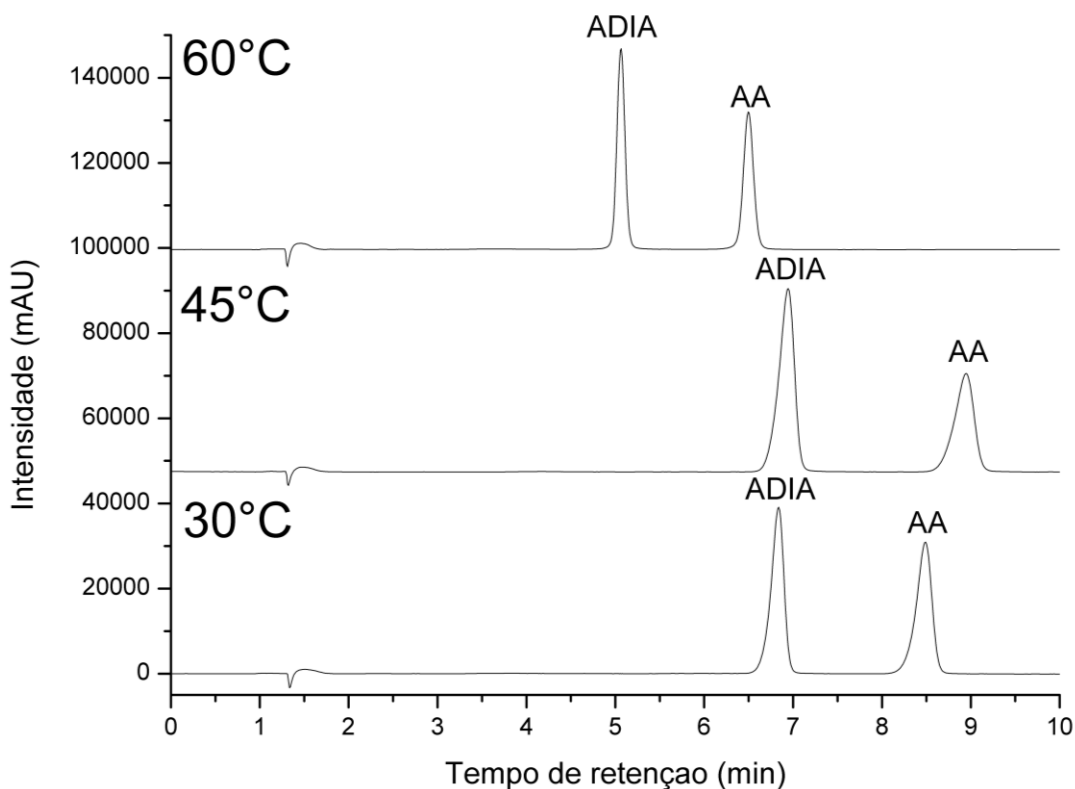
$$\text{Taxa de recuperação (\%)} = \frac{C_{fortificada} - C_{matriz}}{C_{adicionada}} \times 100$$

$C_{fortificada}$ sendo a concentração da amostra fortificada, C_{matriz} a concentração da amostra não fortificada e $C_{adicionada}$ a concentração adicionada de analito.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cromatogramas de separação dos picos dos padrões ADIA e AA para as diferentes temperaturas testadas, podem ser observados na Figura 1. O emprego do aquecimento da fase móvel foi proposta por Bui-Nguyên (1980), e apesar da maioria dos equipamentos oferecer aquecimento no forno da coluna nenhum equipamento dispõem de suporte para aquecimento da fase móvel antes de chegar ao forno. Para alcançarmos a separação dos isômeros pela metodologia citada se fez necessária a utilização de uma chapa aquecedora para o tampão fosfato de potássio monobásico.

Figura 1 – Cromatogramas dos padrões ácido ascórbico e ácido D-isoascórbico em três condições de temperatura da fase móvel e do forno de coluna: 30°C (ADIA tr 6,72; AA tr 8,34), 45°C (ADIA tr 6,93; AA tr 8,94) e 60°C (ADIA tr 5,05; AA tr 6,49). Eluição isocrática, 80% acetonitrila e 20% tampão fosfato de potássio monobásico (0,005 mol.L⁻¹) pH 4,80, coluna NH₂ 150 x 4,6 mm, 03 µm. tr = tempo de retenção



ADIA = ácido D-isoascórbico; AA = ácido L-áscorbico

Ao repetir a metodologia proposta por Bui-Nguyên (1980) na separação dos isômeros ADIA e AA, utilizando a temperatura de 60°C, foi observado melhores valores quanto aos parâmetros cromatográficos frente as temperaturas de 30 e 45°C. Entretanto, a reprodutibilidade da análise a 60 °C se tornou inviável ao longo do tempo devido aos riscos de degradação da coluna e do tampão empregado na fase móvel, sendo escolhida a temperatura de 30°C para as análises com tempos de retenção para o ADIA de 6,72 e AA com 8,34 (Figura 1), mostrando melhor desempenho quanto aos valores de N , h (Tabela 1) e tempo de retenção.

A Tabela 1 apresenta os resultados de desempenho cromatográfico frente a variação de temperatura do tampão fosfato de potássio monobásico (0,005 mol.L⁻¹) e forno de coluna.

Tabela 1 – Desempenho cromatográfico das temperaturas empregadas no forno e testadas na coluna NH₂ (150 x 4,6 mm) 3 μm

Temperatura (°C)	Padrões	Tempo de retenção (min)	Parâmetros cromatográficos				
			<i>k</i>	α	<i>R_s</i>	<i>N</i>	<i>h</i>
30	ADIA	6,93	5,11	-	13,35	8988,51	16,69
	AA	8,94	6,57	1,28	5,19	9796,04	15,31
45	ADIA	6,72	5,02	-	13,74	6616,59	22,67
	AA	8,34	6,76	1,34	5,22	7055,76	21,26
60	ADIA	5,05	3,13	-	8,02	11094,09	13,52
	AA	6,49	4,29	1,37	6,67	12322,87	12,18

ADIA = ácido D-isoascórbico; AA = ácido L-ascórbico

Os valores de *k* para as temperaturas de 30 e 45°C foram similares quanto aos padrões ADIA e AA. O aumento da temperatura para 60°C mostrou diminuição no tempo de retenção das duas substâncias. Apesar da diminuição no tempo de retenção com a temperatura 60°C, todas as temperaturas mostraram viabilidade no tempo de corrida da análise.

Todas as temperaturas utilizadas provaram possuir separação satisfatória do ADIA e AA, e o valor de $\alpha \geq 1,2$ mostra o indicativo de separação. A resolução cromatográfica (*R_s*) apresentou os melhores resultados para a temperatura de 60°C.

O desempenho cromatográfico através do número de pratos teóricos e a altura dos pratos teóricos foi testado. A relação inversa entre *N* e *h* foi observada em todas as temperaturas, sendo mais favorável na temperatura de 60°C para os padrões ADIA e AA.

Na adequação da metodologia, a fase móvel empregada na separação dos isômeros da vitamina C foi uma mistura de solvente orgânico e tampão, que juntamente com os detectores de UV-Vis, são a combinação analítica mais

empregada para determinação da vitamina C (FONTANNAZ, 2006; BARROS, 2010; OLIVEIRA et al., 2012; SPÍNOLA et al., 2012; KLIMCZAK, 2015).

A fase estacionária mais utilizada na literatura é a coluna de fase reversa C₁₈, entretanto sua utilização resulta em um tempo de retenção do ácido L-ascórbico muito próximo ao volume morto da coluna por este motivo optou-se pelo uso de uma coluna de fase normal de amina (NH₂).

O presente estudo testou o uso de solução tampão fosfato de potássio monobásico, uma vez que o controle do estado iônico de um composto é de fundamental importância na separação cromatográfica e na estabilização de um método analítico empregado para substâncias passíveis de oxirredução, assim um tampão ácido ou base, permite o controle do pH (OLIVEIRA et al. 2012).

Considerando as dificuldades em separar isômeros, o método analítico empregado permitiu uma completa separação dos picos, os quais foram monitorados pelos tempos de retenção e pela avaliação espectral. Os espectros de absorção das amostras analisadas se mantiveram similares aos padrões em seus tempos de retenção, indicando pureza dos picos.

A Tabela 2 apresenta os dados das características analíticas para o método cromatográfico empregado.

Tabela 2 – Características analíticas do método cromatográfico empregado

Padrões	LD	LQ	Eq. Curva	R ²	R
ADIA	0,0092	0,0278	y = 46.609.184,56x + 29.373,44	0,9951	0,9975
AA	0,0131	0,0397	y = 50.023.224,81x - 199.322,79	0,9876	0,9937

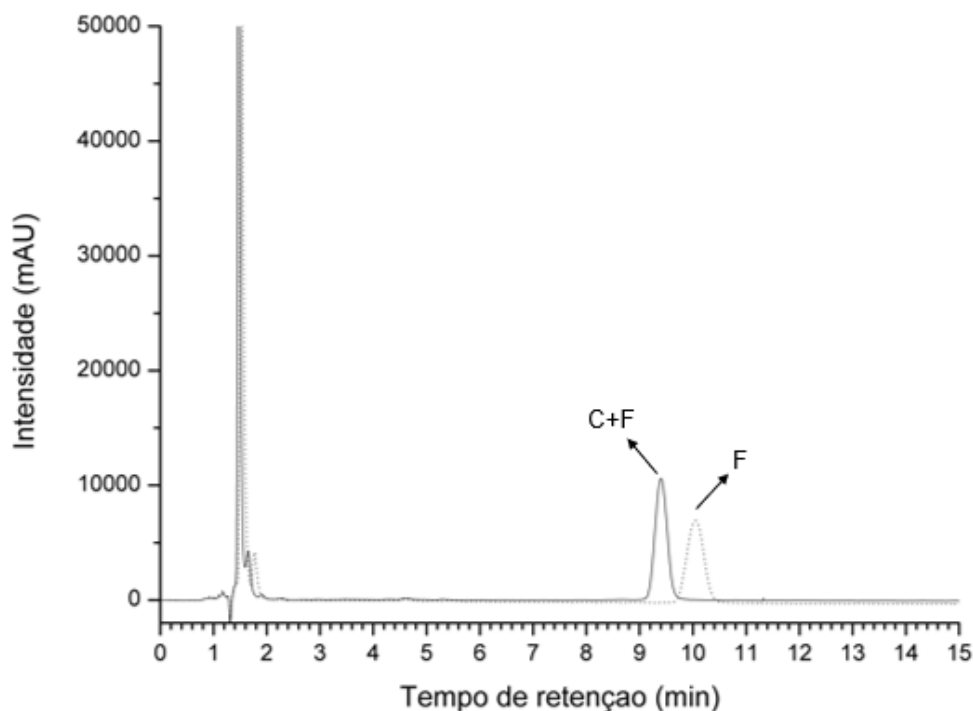
ADIA = ácido D-isoascórbico; AA = ácido L-ascórbico. LD (limite de detecção) e LQ (limite de quantificação), ambos em µg.mL⁻¹

Construiu-se uma curva analítica a linearidade foi verificada. Os dois isômeros tiveram satisfatória linearidade nos intervalos avaliados, com valores de R para os padrões ADIA e AA oferecendo condições adequadas para quantificação nas amostras de produtos processados de frutas. Entretanto, em estudo desenvolvido por Oliveira et al. (2012) os limites de detecção e quantificação para o ADIA foram de 5 e 14 µg.mL⁻¹, e do AA de 7 e 21 µg.mL⁻¹, sendo o método deste

autor mais sensível. Acredita-se que a utilização de estabilizadores junto a fase móvel como citado por Oliveira e colaboradores tenha contribuído para melhor detecção e quantificação dos isômeros da vitamina C.

A Figura 2 apresenta os cromatogramas de ácido L-ascórbico em bebidas mistas de frutas cítricas submetidas a filtração e centrifugação com filtração.

Figura 2 – Cromatogramas de bebida mista de frutas cítricas de ácido L-ascórbico (AA). *Linha contínua*, amostra submetida à centrifugação + filtração, AA ($tr=9,39$); *Linha pontilhada*, amostra submetida à filtração, AA ($tr=10,03$). Eluição isocrática, 80% acetonitrila e 20% tampão fosfato de potássio monobásico ($0,005 \text{ mol.L}^{-1}$) pH 4,80 e temperatura de 30°C , coluna NH_2 150 x 4,6 mm, 3 μm . tr = tempo de retenção



C+F = centrifugação + filtração; F = filtração

A utilização da centrifugação com filtração apresentou um cromatograma com tempo de retenção (9,39) menor e maior intensidade no pico do AA, quando comparado com a utilização apenas da filtração na extração da bebida mista de frutas cítricas. O ácido D-isoascórbico não foi detectado, e a concentração do ácido L-ascórbico variou de 0,54 a 0,58 mg.100mL^{-1} , com filtração, e centrifugação seguida de filtração, respectivamente.

O procedimento extrativo foi adaptado do método oficial indicado pela AOAC (2007), que utiliza ácido fosfórico 3% e solução de ácido acético a 8%, sendo utilizado apenas o ácido fosfórico 3%. O ácido fosfórico desempenha papel de extrator e estabilizador, inibindo a catálise da ascorbato oxidase e metais, precipitando proteínas, processo que auxilia na clarificação dos extratos. O ácido fosfórico também pode ser combinado com modificadores orgânicos (metanol, acetonitrila) ou ácidos (ácido acético, ácido tricloroacético, ácido cítrico) e estabilizadores como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A adição de ácido fosfórico de 3 a 6%, limita a oxidação do ácido L-ascórbico (RUSSELL, 2000; EITENMILLER, 2008; NYSSÖNEN, 2000).

A homogeneização das amostras com ácido fosfórico foi realizada utilizando agitação em vórtex e posterior centrifugação e filtração, tanto para as amostras líquidas, quanto para as amostras pastosas e com sólidos suspensos.

As concentrações de ADIA e AA juntamente com seu desvio padrão, podem ser verificadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Teor de ácido D-isoascórbico e ácido L-ascórbico em produtos processados a base de frutas

Amostra	mg.100mL ⁻¹				Informação do Rótulo	Taxa de recuperação (%)
	NOV/2018		ABR/2019			
	ADIA	AA	ADIA	AA		
Bebida mista frutas cítricas marca 1	nd	0,38±0,01	nd	0,60±0,002	9	30,59
Bebida mista frutas cítricas marca 2	nd	0,50±0,03	-	-	11,21	30,59
Concentrado de fruta acerola	nd	12,01±2,64	-	-	238	31,04
Concentrado de fruta caju	-	-	nd	1,18±0,05	27,58	31,04
Suco integral laranja	nd	0,31±0,01	nd	2,32±0,18	3,33	16,65
Geleia de goiaba	nd	0,29±0,005	nd	0,42±0,004	16	26,03

ADIA = ácido D-isoascórbico; AA = ácido L-ascórbico. nd = não detectado. Valores obtidos a partir da média de 3 amostras

A quantificação dos produtos processados a base de frutas mostraram resultados de AA variando de 0,29 mg.100mL⁻¹ para a geleia de goiaba, a 12,01 mg.100mL⁻¹ para o concentrado de fruta acerola. O isômero ADIA não foi encontrado em nenhuma amostra analisada. Valores maiores de 22,7 mg.100mL⁻¹ de AA para suco de laranja foi obtido em estudo de Klimczak et al.(2015) realizado na Polônia, utilizando CLAE-DAD com fase estacionária C₁₈ e fase móvel gradiente com metanol e tampão fosfato de potássio monobásico. Em estudo realizado por Oliveira et al. (2012), foi relatada quantidade de 161 mg.100mL⁻¹ de AA em geleia de goiaba com hibisco.

Neste estudo foram encontrados valores inferiores aos indicados no rótulo do produto, estes resultados estão de acordo com estudo anterior de Ullah et al. (2012) e Boonpangrak et al. (2016) sobre a subestimação e superestimativa de vitamina C em sucos embalados locais no Paquistão e Tailândia, nos quais a adição de vitamina C aos sucos de frutas variou ou mostrou falta de monitoramento do processo para os ingredientes. O ácido D-isoascórbico não foi detectado. Boonpangrak et al. (2016) detectaram a presença do ácido D-isoascórbico em sucos de laranja e goiaba distribuídos na Tailândia, sendo está prática proibida. No Brasil a RDC nº 8/2013 (BRASIL, 2013) não permite a adição do ácido D-isoascórbico como aditivo alimentar em sucos, entretanto permite sua adição em geleias de fruta.

Foram obtidos baixos valores para taxa de recuperação, variando de 16,65 a 31,04%, sendo o menor valor referente ao suco integral e o maior ao concentrado de fruta. O protocolo de extração e as diferentes matrizes utilizadas no estudo necessitam de maior aprofundamento quanto sua eficiência, também sendo necessário estudo da viabilidade da coluna utilizada frente as diferentes metodologias a serem propostas em estudos futuros.

CONCLUSÃO

A temperatura de 60°C apresentou melhores resultados na quantificação dos isômeros D-isoascórbico e L-ascórbico, entretanto, foi observada redução da vida útil da coluna, optando-se pela temperatura de 30°C que se mostrou satisfatória. Os valores para taxa de recuperação foram baixos, necessitando estudo mais aprofundado quanto ao protocolo de extração, tendo em vista que as principais perdas analíticas acontecem na extração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE A INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA (IDR) DE PROTEÍNA, VITAMINAS E MINERAIS. Brasília, DF. 2005.

BACIGALUPI, C.; MAUREY, A.; BOUTROY, N.; PEYRON, S.; AVALLONE, S.; CHALIER, P. Changes in nutritional value of a multi-vitamins fortified juice packed in glass and standard PET bottles. **Food Control**, v. 60, p. 256-262, 2016.

BOONPANGRAK, S.; LALITMANAT, S.; SUWANWONG, Y.; PRACHAYASITTIKUL, S.; PRACHAYASITTIKU, V. Analysis of ascorbic acid and isoascorbic acid in orange and guava fruit juices distributed in Thailand by LC-IT-MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 6, p. 1616-1626, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº8, de 06 de março de 2013. Regulamento sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares para produtos de frutas e de vegetais e geleia de mocotó. Brasília, DF, 2013.

BUI-NGUYÊN, Mai Huong. Application of high-performance liquid chromatography to the separation of ascorbic acid from isoascorbic acid. **Journal of Chromatography A**, v. 196, n. 1, p. 163-165, 1980.

CAMPOS, F. M., RIBEIRO, S. M. R., DELLA LUCIA, C. M., & SANT'ANA, H. M. P. Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. **Quimica Nova**, 32,87 –91, 2009.

CHEBROLU, K. K.; JAYAPRAKASHA, G. K.; YOO, K. S.; JIFON, J. L.; PATIL, B. S. An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC. **LWT-Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 443-449, 2012.

ICH. - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**, p.11-12, 1994.

INMETRO. **Normalização e Qualidade Industrial – Orientação sobre a validação de métodos de ensaios químicos**, Instituto Nacional de Metrologia, DOQCGCCRE-008, 2007.

KLIMCZAK, I., & GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A. Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. **Food Chemistry**, 175, 100 –105, 2015.

LOUARME, L.; BILLAUD, C. Evaluation of ascorbic acid and sugar degradation products during fruit dessert processing under conventional or ohmic heating treatment. **LWT-Food Science and Technology**, v. 49, n. 2, p. 184-187, 2012.

OLIVEIRA, Raquel Grando; GODOY, Helena Teixeira; PRADO, Marcelo Alexandre. Quantificação dos isômeros ácido L-ascórbico e ácido D-iso-ascórbico em geleias de frutas por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1020-1024, 2012.

PHILLIPS, K. M.; TARRAGO-TRANI, M. T.; GEBHARDT, S. E.; EXLER, J.; PATTERSON, K. Y.; HAYTOWITZ, D. B.; PEHRSSON, P. R.; HOLDEN, J. M. Stability of Vitamin C in Frozen Raw Fruit and Vegetable Homogenates. **Journal of Food Composition and Analysis**, London, v. 23, p. 253-259, 2010.

PRACHAYASITTIKUL, S; PRACHAYASITTIKU, V. Analysis of ascorbic acid and isoascorbic acid in orange and guava fruit juices distributed in Thailand by LC-IT-MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 6, p. 1616-1626, 2016.

RELACRE, Guia Relacre 13. Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química, Instituto Português da Qualidade, Portugal, 2000.

ROSA, J. S., GODOY, R. L. O., NETO, J. O., CAMPOS, R. S., MATTA, V. M., FREIRE, C. A.; SOUZA, R. S. Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, v. 27 n. 4, p. 837 –846, 2007.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J.L. Practical HPLC method development. Wiley, New York, 1997.

SPINOLA, V.; BERTA, B.; CÂMARA, J. S.; CASTILHO, P. C. Effect of Time and Temperature on Vitamin C Stability in Horticultural Extracts. UHPLC-PDA vs. Iodometric Titration as Analytical Methods. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 50, n. 2, p. 489-495, 2013.

TARRAGO-TRANI, M. T.; PHILLIPS, K. M.; COTTY, M. Matrix-Specific Method Validation for Quantitative Analysis of Vitamin C in Diverse Foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, London, v. 26, n. 1-2, p. 12-25, 2012.

ULLAH, S., HUSSAIN, A., ALI, J., ULLAH, K. A., & ULLAH, A. A simple and rapid HPLC method for analysis of vitamin-C in local packed juices of Pakistan. **Middle East Journal Science Research**, v. 12, p. 1085e91, 2012.

WALKER, R. Erythorbic acid and its sodium salt. In: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA) (ed) Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. World Health Organization, Geneva, pp 27–60, 1991.

ZEMPLINI, J.; RUCKER, R. B.; MCCORMICK, D. B.; SUTTIE, J. W. Handbook of Vitamins, 14. ed., CRC Press, Boca Raton, 2007.

ARTIGO 2 - ESTUDO DA FOTOESTABILIDADE DO ÁCIDO L-ASCÓRBICO E D-ISOASCÓRBICO EM PRODUTOS PROCESSADOS A BASE DE FRUTAS POR CLAE

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a fotoestabilidade do ácido D-isoascórbico e L-ascórbico em produtos processados a base de frutas, em uma câmara de fotoestabilidade não comercial qualificada, e quantificar os isômeros através da cromatografia líquida de alta eficiência-DAD. As amostras foram expostas a radiação visível e radiação UV, seguida por análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência para o ácido D-isoascórbico e L-ascórbico. Foram realizadas análises de espectrofotometria UV/Vis e Espectroscopia vibracional na região do infravermelho nas embalagens de PET e vidro. As amostras expostas a radiação visível não sofreram degradação do ácido L-ascórbico, sendo possível quantificar na faixa de 0,39 a 0,48 mg.100mL⁻¹, o ácido D-isoascórbico não foi detectado nas amostras. Todas as amostras expostas a radiação UV sofreram degradação do ácido L-ascórbico, mesmo as embalagens PET e de vidro apresentarem segurança ao alimento frente a luz UV. A varredura espectral mostrou alta taxa de transmitância na região da luz visível para as embalagens PET e vidro. OS resultados são inéditos e permitem repensar as diretrizes para fortificação de alimentos.

Palavras-chave: Vitamina C, vidro, polietileno, exposição a luz UV/Vis

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the photostability of D-isoascorbic and L-ascorbic acid in fruit-based products in a qualified non-commercial photostability chamber and to quantify the isomers through high performance liquid chromatography-DAD. The samples were exposed to visible radiation and UV radiation, followed by high efficiency liquid chromatograph analysis for D-isoascorbic acid and L-ascorbic acid. UV/Vis spectrophotometry and Vibrational spectroscopy were performed in the infrared region in PET and glass containers. The samples exposed to visible radiation did not suffer degradation of L-ascorbic

acid, being possible to quantify in the range of 0.39 to 0.48 mg.100mL⁻¹, D-isoascorbic acid was not detected in the samples. All samples exposed to UV radiation have undergone degradation of L-ascorbic acid, even if PET and glass packaging have food safety against UV light. The spectral scan showed a high transmittance rate in the visible light region for PET and glass containers. Unprecedented results that allow us to rethink the guidelines for food fortification.

Keywords: Vitamin C, glass, polyethylene, light exposure UV/Vis

INTRODUÇÃO

A indústria alimentícia atuando no desenvolvimento de derivados de frutas busca por produtos com alto valor nutricional, sendo o enriquecimento de vitaminas e uso de antioxidantes alguns dos principais componentes para contrabalancear as perdas durante o processamento e o armazenamento, uma vez que há perdas de micronutrientes por reações químicas e mudanças indesejáveis durante os tratamentos térmicos (SPINOLA et al., 2014; BACIGALUPI, 2016).

O ácido ascórbico é uma das vitaminas mais empregadas no enriquecimento de bebidas à base de frutas, também sendo uma vitamina muito susceptível a degradação, sofrendo influência do pH, íons metálicos, temperatura, oxigênio e exposição a luz (SPINOLA et al., 2013). Também é usado na composição de produtos processados à base de frutas o isômero ácido D-isoascórbico que possui alta propriedade antioxidante (WALKER, 1991; DRIVELOS et al., 2010).

As embalagens utilizadas pela indústria para bebidas à base de frutas são o vidro e o PET (polietileno tereftalato). O vidro transparente não fornece proteção aos alimentos perante a luz, podendo facilitar a ocorrência de reações deteriorantes, sendo capaz de bloquear apenas 10% da luz. Para os fabricados na cor verde e âmbar se consegue bloquear 50 e 90%, respectivamente a passagem de luz (KOBAYASHI, 2016). O PET é um material que naturalmente não apresenta coloração, produtos embalados em PET transparente não possuem proteção adequada contra raios ultravioleta, sendo vitaminas e corantes os mais afetados, se fazendo necessária a utilização de absorvedores UV (COUGHLIN; SCHAMBONY, 2008).

No Brasil não há legislação para estudo de fotoestabilidade em alimentos, para tal dispõem apenas a RDC nº 45 de 2012 da ANVISA que apresenta estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. Segundo a legislação o estudo de fotoestabilidade deve ser realizado através de degradação forçada e teste confirmatório, mostrando que uma exposição a luz não resultará em alterações significativas no produto (BRASIL, 2012).

O teste de fotoestabilidade é realizado usando câmara de fotoestabilidade qualificada contendo fontes de luz visível e UV com potência de saída conhecida. A qualificação tem por objetivo provar que a câmara é adequada para testes de fotoestabilidade, existindo duas formas de se qualificar a câmara, usando a actinometria química ou utilizando dispositivos físicos, como radiômetro e luxímetro. A distribuição de energia da radiação para toda a área de exposição (mapeamento) também deve ser determinada (AZEVEDO FILHO et al., 2011).

A estabilidade de produtos fotossensíveis é afetada pela energia radiante de fontes luminosas ou artificiais, sejam elas visíveis ou ultravioleta, iniciando e acelerando reações de degradação através da ação fotoquímica. Os polímeros também sofrem quando expostos à luz, uma degradação oxidativa, resultando em fragilidade e descoloração do material comprometendo propriedades mecânicas e físicas das embalagens, podendo degradar produtos em contato com este material (COLTRO, 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a fotoestabilidade dos ácidos D-isoascórbico e L-ascórbico em produtos processados a base de frutas sob exposição controlada em uma câmara de fotoestabilidade não comercial qualificada, quantificando o ácido D-isoascórbico e L-ascórbico através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por detecção em DAD.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo de fotoestabilidade foi desenvolvido no Laboratório de Interfaces, Nanomateriais e Sistemas Coloidais (LINSIC) no Departamento de Ciências Farmacêuticas. As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório Multiusuário do Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL), no Departamento de Nutrição, ambos situados na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Padrões e Reagentes

Para a composição da fase móvel foram utilizados o fosfato de potássio monobásico (Sigma-Aldrich, Alemanha), ácido fosfórico (Fluka, Suíça) e acetonitrila (Merck, Alemanha), todos grau HPLC. Padrões de ácido L-ascórbico e ácido D-isoascórbico obtido de Sigma-Aldrich, EUA, com grau de pureza superior a 99%. Água ultra-pura obtida através do sistema de purificação de água ultra-pura com resistividade da água produzida de $18 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$.

Matrizes e protocolo de extração

As amostras utilizadas neste estudo foram bebidas mista de frutas cítricas (laranja, limão e tangerina) (BM), geleia de goiaba (GE), concentrado líquido de fruta caju (CO) e suco integral de laranja (SI), acondicionados em embalagem PET - polietileno tereftalato e vidro. Em todas as embalagens constavam na tabela nutricional e no rótulo a presença de vitamina C. As matrizes foram adquiridas em quantidade de 4 unidades cada, com diferentes marcas e diferentes lotes de fabricação, nos supermercados locais da região metropolitana do Recife.

As extrações das amostras foram realizadas pesando 1,0 g, diluídas em 40,0 mL de solução extratora de ácido fosfórico a 3%. Posteriormente agitadas em vórtex (Labnet) por 1 minuto, seguida de centrifugação em centrífuga refrigerada (Eppendorf) a 5000 rpm a 4°C, por 15 minutos, retirando o sobrenadante e filtrando em filtros para seringa de $0.20 \mu\text{m}$ (Chromafil). Foram transferidos 1,0 mL de cada amostra para vials âmbar, seguindo para posterior análise em CLAE.

Equipamento

As análises foram realizadas por CLAE em cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu, Japão), composto pelos seguintes módulos: sistema controlador modelo CBM- 20A, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-20AV, bomba quaternária modelo LC - 20 AT, forno para coluna modelo CTO-20AC, amostrador automático modelo SIL-20AC. Todos os comandos foram realizados utilizando software *LC Solution* (versão 1.25, Shimadzu, Japão), e as detecções

foram feitas pelo detector de arranjo de diodo com comprimento de onda na faixa de 200-400 nm.

Condições cromatográficas

Foi realizada uma adequação da metodologia Bui-Nguyên (1980), utilizando coluna cromatográfica NH₂ (150 x 4,6 mm) 3 µm. As soluções que entraram na composição da fase móvel foram: acetonitrila e tampão fosfato de potássio monobásico (0,005 mol·L⁻¹) filtradas em filtros Millipore com 0,22 µm de diâmetro. O tampão fosfato de potássio monobásico foi preparado com faixa de pH entre 4,4 e 4,8, quando necessário foi utilizado ácido fosfórico a 0,005 mol·L⁻¹ para ajuste do pH. O fluxo da fase móvel foi de 1,5 mL·min⁻¹ com temperatura da coluna em 30°C e volume injetado de 20 µL para análise de padrões e amostras. A eluição foi realizada no modo isocrático, na proporção de 80:20 v/v acetonitrila:tampão fosfato de potássio monobásico 0,005 mol·L⁻¹ aquecido a temperatura de 30°C, e com o tempo de corrida total de 15 minutos por vial com amostra. O comprimento de onda de varredura foi fixado na faixa de 268 nm, com abertura da fenda de 8nm.

Procedimento de fotoestabilidade

Foi utilizada uma câmara de fotoestabilidade qualificada e não comercial, utilizando lâmpada UV com irradiância máxima de 1.416 µW·cm⁻² e lâmpada branca fria com iluminância máxima de 14.472 Lux, segundo especificações técnicas da câmara. A temperatura interna da câmara (T=28°C) foi controlada através do uso de um dispositivo externo de refrigeração.

Segundo o estudo de fotoestabilidade da ANVISA (BRASIL, 2012), a potência luminosa mínima é de 1,2 milhões de Lux horas, integrados à energia da radiação UV próxima de não menos que 200 watts horas·m² para estudos de confirmação. Assim, para o cálculo do tempo de exposição mínima da amostra a partir da dose recomendada pela ANVISA, temos:

1) Para a emissão máxima da lâmpada UV:

Dose da ANVISA = 20.000µWh.cm⁻²

Irradiância UV da câmara = 1.416µW.cm⁻²

$20.000\mu\text{Wh.cm}^{-2} / 1.416\mu\text{W.cm}^{-2} = 14$ horas e 12 minutos.

2) Para a emissão máxima das lâmpadas brancas frias:

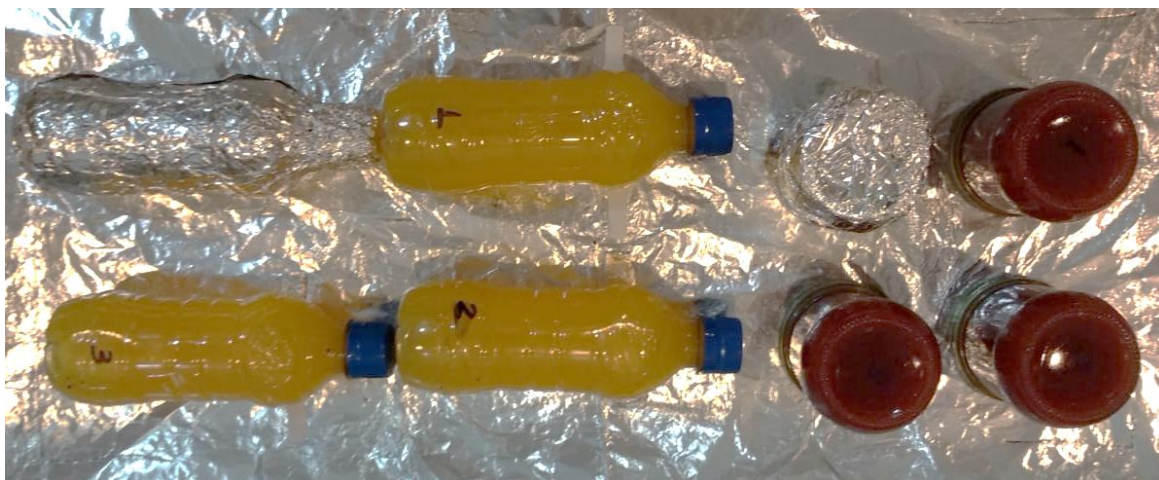
Dose da ANVISA = 1.200.000 Lux h

Iluminância da lâmpada branca fria da câmara = 14.472 Lux

$1.200.000 \text{ Lux h} / 14.472 \text{ Lux} = 82$ horas e 9 minutos (~4 dias).

As amostras foram colocadas na região central da câmara em suas embalagens originais de PET e vidro, sendo 3 amostras expostas e 1 amostra controle envolta com papel alumínio. Durante o tempo de 14 horas e 12 minutos para emissão UV (PET e vidro) e 82 horas e 9 minutos (~4 dias) para iluminância no visível (PET). Logo após a exposição na câmara de fotoestabilidade, foram retirados 1g das amostras para os procedimentos de extração e análise por CLAE.

Figura 1 – Amostras de bebida mista de frutas cítricas e geleia de goiaba dispostas na câmara de fotoestabilidade



Espectrofotometria UV/VIS da embalagem PET

Para análise das embalagens PET onde estavam contidas as bebidas mistas de frutas cítricas submetidas a luz visível, foi utilizado espectrofotômetro modelo UV-1800 (Shimadzu). Foram feitos cortes do PET para representar as secções relativa a espessura da parede do recipiente, medindo a transmitância da secção com referência ao ar no comprimento de onda de interesse, em intervalo de comprimento de luz entre 290 a 450 nm (BRASIL, 2010).

Espectroscopia vibracional na região do infravermelho das embalagens PET e vidro

As análises de FTIR foram realizadas em equipamento de marca PerkinElmer, modelo Frontier UATR Universal. Foram analisadas as embalagens de PET e vidro, com varredura de 650 a 4000 cm^{-1} , com 4 acumulações e janela de ZnSe (BRASIL, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Abaixo na Tabela 1, são apresentados os dados das bebidas mistas de frutas cítricas expostas a incidência de luz branca.

Tabela 1 – Teor de ácido L-ascórbico das bebidas mista de frutas cítricas submetidas a incidência de luz branca

Amostra	Tipo de embalagem	Concentração AA ($\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$)	Tempo de retenção (min)	Similaridade (%)	Pureza do pico (%)
Bebida mista de frutas cítricas marca 1	PET	0,39±0,01	11,00±0,15	99	99
Bebida mista de frutas cítricas marca 2	PET	0,48±0,005	10,23±0,19	99	99

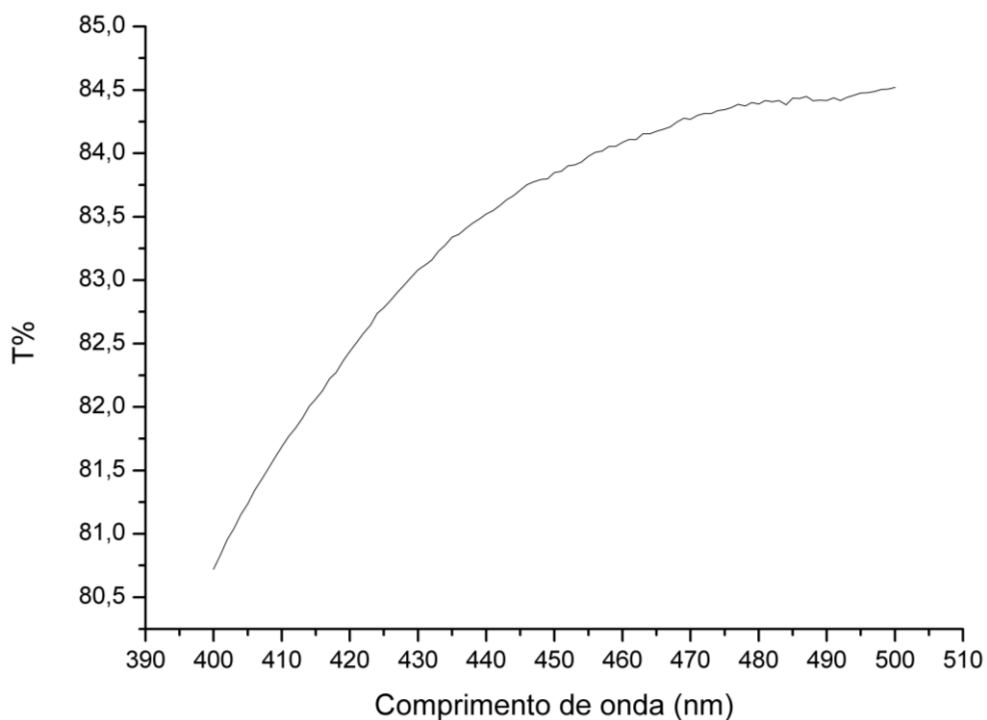
AA = ácido L-ascórbico. Valores obtidos a partir da média de 3 amostras

A exposição das bebidas mistas de frutas cítricas segundo estudo de fotoestabilidade (BRASIL, 2012), referente a exposição a luz branca para estudos de confirmação, não resultou em alterações no teor de vitamina C bem como em características visuais na cor dos produtos. Não foi detectado a presença do ácido D-isoascórbico antes e após a fotodegradação. O tempo de retenção, similaridade e pureza do pico indicou a presença de AA nas bebidas mistas de frutas cítricas

acondicionados em embalagem PET. O resultado da degradação forçada e teste confirmatório para exposição a luz branca, determina que a bebida mista de frutas cítricas é fotoestável quanto ao AA, segundo RDC nº 45 de 2012 ANVISA (BRASIL, 2012).

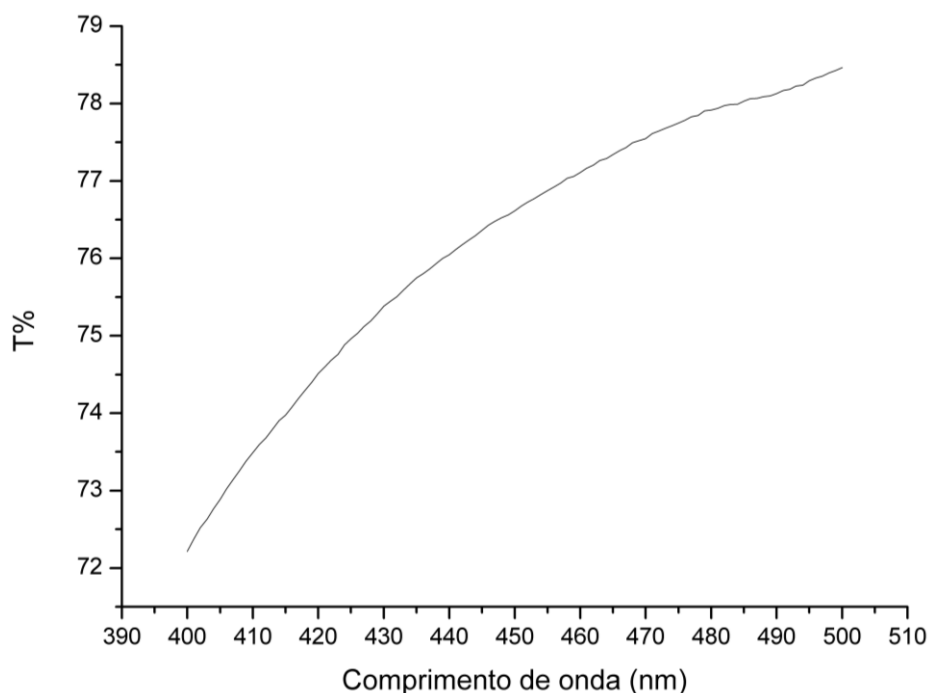
Os espectros UV/VIS para as embalagens PET das bebidas mistas de frutas cítricas expostas a luz branca, são apresentados na Figura 2 e 3 abaixo.

Figura 2 – Varredura espectral das embalagens PET da bebida mista de frutas cítricas 1, submetida à incidência de luz branca



T% = transmitância

Figura 3 - Varredura espectral das embalagens PET da bebida mista de frutas cítricas 2, submetida à incidência de luz branca



T% = transmitância

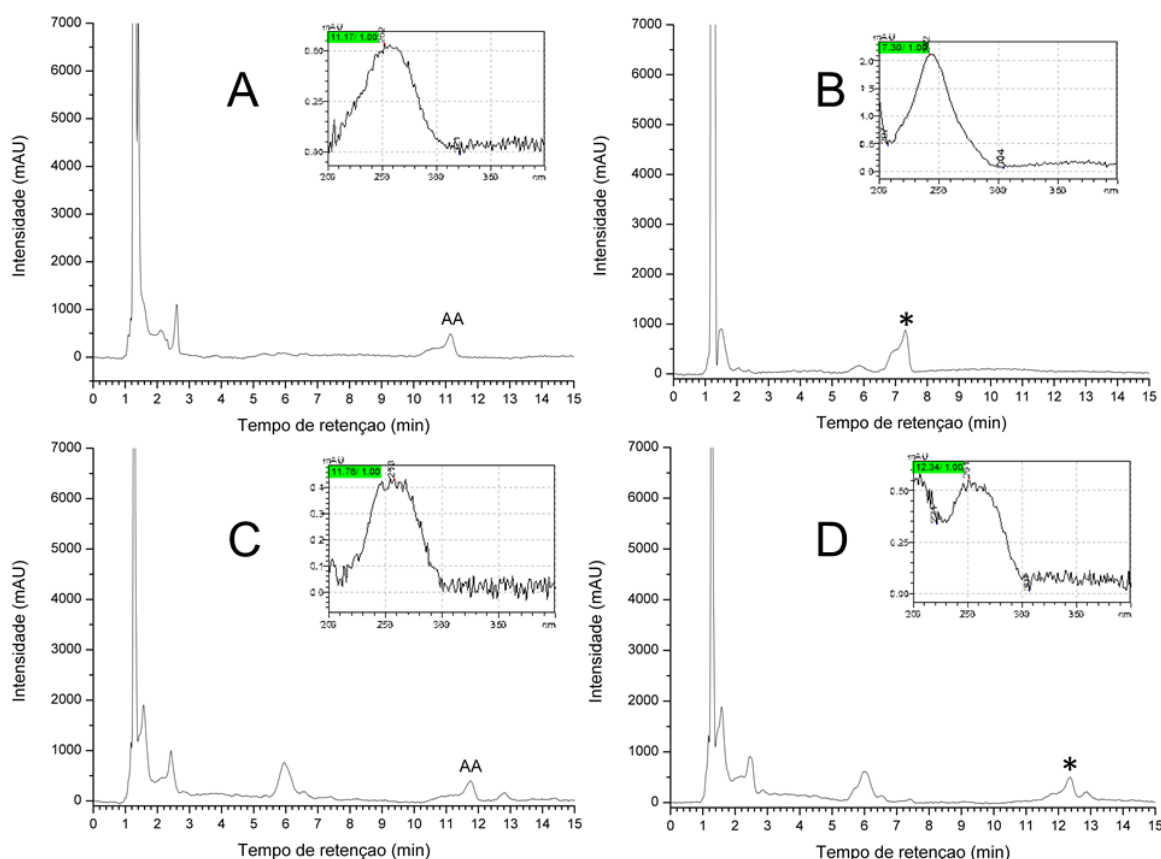
As Figuras 2 e 3 mostram que a partir do comprimento de onda de 400nm houve elevação na transmitância no espectro na luz visível para embalagem PET, com até 84,5% de transmitância, não apresentando eficiência contra os raios de luz visível.

Os espectros mostram que há transmitância da luz visível sob as embalagens, entretanto o conteúdo de AA não foi fotodegradado. Apesar da transmitância dos comprimentos de onda da radiação visível serem comparativamente elevados em relação aos comprimentos de onda da região do UV, a radiação emitida nessa região tem menor energia, desse modo, induz uma menor taxa de oxidação, comparativamente a radiação UV (SILVERSTEIN et al., 1987; ALVES et al., 2009).

Todos os produtos processados a base de frutas submetidos a incidência de radiação UV segundo estudo de fotoestabilidade (BRASIL, 2012), foram degradados quanto a sua vitamina C.

A Figura 4 abaixo, apresenta os cromatogramas e os espectros de absorção no UV-Vis de bebida mista de frutas cítricas e geleia de goiaba que foram submetidas a incidência de radiação UV.

Figura 4 – Cromatogramas e espectros de absorção no UV-Vis de bebida mista de frutas cítricas e geleia de goiaba submetidas a incidência de radiação UV.



Cromatograma A: Bebida mista de frutas cítricas controle; Cromatograma B: Bebida mista de frutas cítricas degradada; Cromatograma C: Geleia de goiaba controle; Cromatograma D: Geleia de goiaba degradada; AA = ácido L-ascórbico; * Amostra degradada, varredura espectral realizada afim de confirmar se a substância é o ácido L-ascórbico

A Figura 4A e 4C referente aos controles de bebida mista de frutas cítricas e geleia de goiaba, apresentaram picos de AA nos tempos de retenção de 11,17 e 11,76 minutos, com similaridade de 90 e 92%, respectivamente. A Figura 4B e 4D mostram que a bebida mista de frutas cítricas e geleia de goiaba expostas a radiação UV sofreram degradação do AA, sendo observada alteração nos máximos de absorção dos espectros das amostras fotodegradadas. O ácido D-isoascórbico não foi detectado nas amostras antes e após fotodegradação.

Os espectros na região do infravermelho para garrafas PET de bebidas mistas de frutas cítricas e sucos integrais são apresentados nas Figuras 5 e 6 abaixo.

Figura 5 – Espectroscopia na região do infravermelho de garrafas PET de bebidas mistas de frutas cítricas

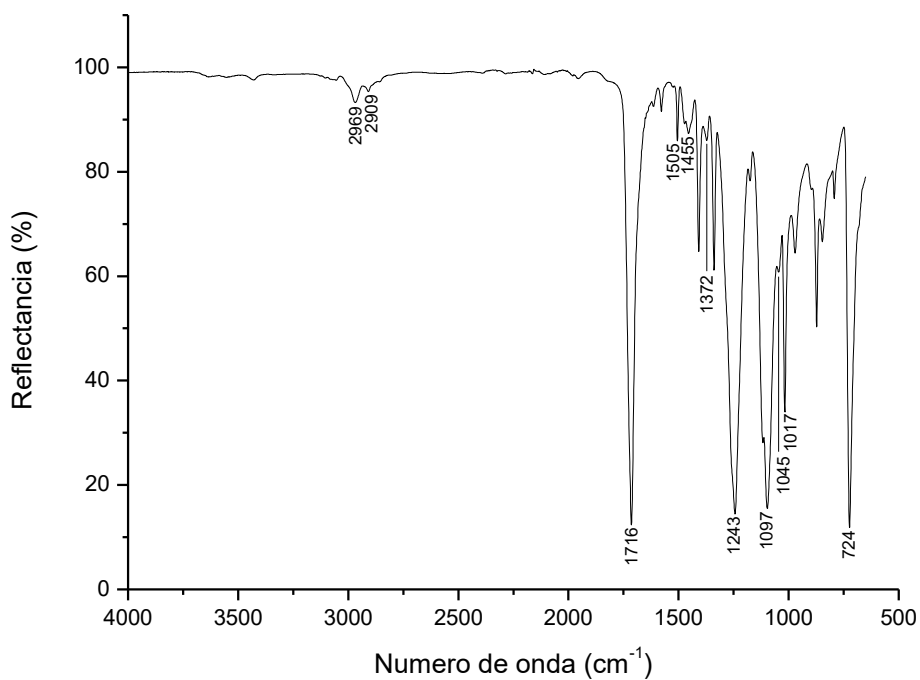
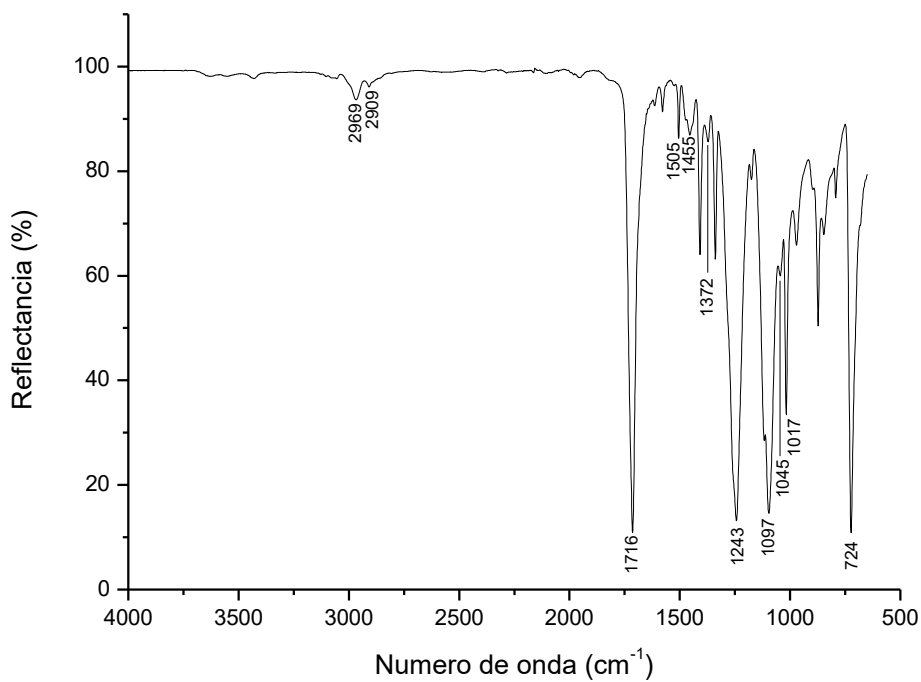


Figura 6 - Espectroscopia na região do infravermelho de garrafas PET dos sucos integrais



Analisando as Figuras 5 e 6, é observado que as duas embalagens PET possuem bandas semelhantes com seus respectivos radicais padrões, encontrados nas regiões próximas a 724 cm^{-1} (metileno C-H), 1017 cm^{-1} (aromático C-H), 1045 cm^{-1} (éteres C-O-C), 1097 cm^{-1} (O-C-C), 1243 cm^{-1} (éteres C-O-C), 1372 cm^{-1} (metil C-H), 1455 cm^{-1} (metileno C-H), 1505 cm^{-1} (aromático C=C), 1716 cm^{-1} (carbonila C=O), 2909 cm^{-1} (metileno C-H) e 2969 cm^{-1} (metil C-H).

Segundo Huang et al. (2012) o PET possui bandas características que se encontram nas zonas de 716 cm^{-1} , 1085 cm^{-1} , 1246 cm^{-1} e 1730 cm^{-1} . As bandas descritas são referentes aos grupos éteres (C-O-C), metanodiilo (grupos $-\text{CH}_2-$), carbonila (C=O) e metil ($-\text{CH}_3$), respectivamente, estes radicais são vistos nos PETs analisados.

Fávaro et al. (2013) analisando embalagens PET da indústria brasileira, encontraram grupos aromáticos (1113 a 1021 cm^{-1}), grupo éster C(O)-O (1240 cm^{-1}), grupos aromáticos (1410 cm^{-1}), carbonila C=O (1710 cm^{-1}) e metil C-H (2960 cm^{-1}), corroborando com os espectros analisados.

Diepens (2007) relata que vibrações próximas a 1629 cm^{-1} e 1689 cm^{-1} são características do absorvedor de radiação ultravioleta benxofenona. Não foram encontrados valores próximos a estas bandas nos PETs analisados.

Figura 7 - Espectroscopia na região do infravermelho de garrafas de vidro de concentrado de caju

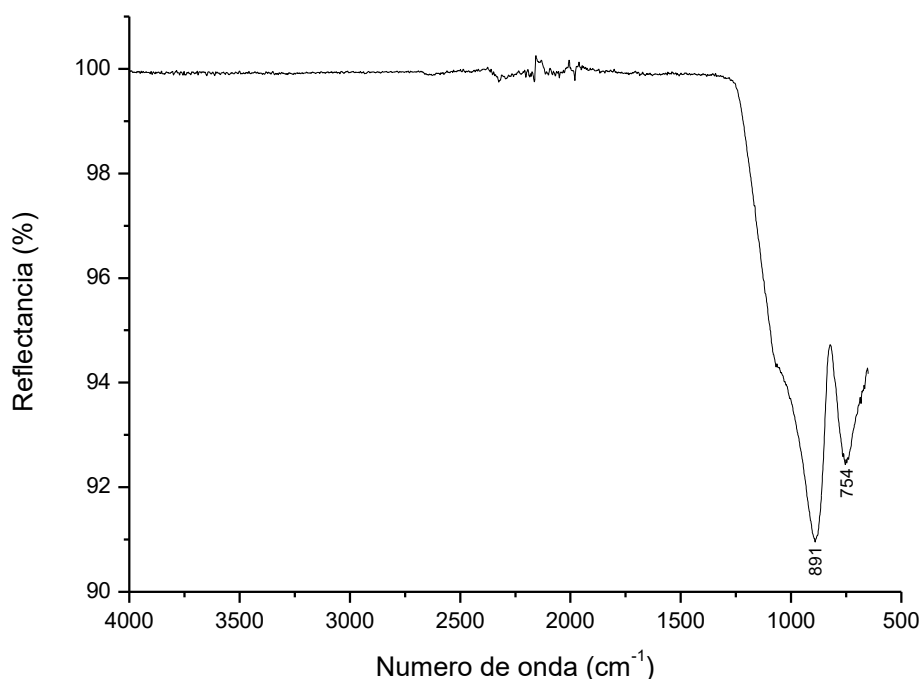
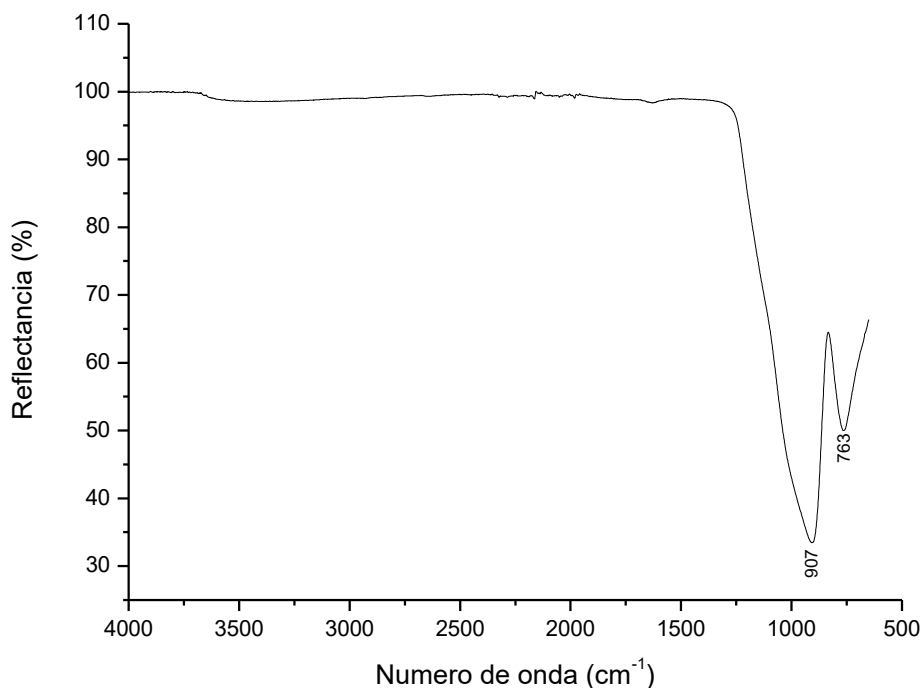


Figura 8 – Espectroscopia na região do infravermelho garrafas de vidro de geleia de goiaba



As embalagens de vidro (Figura 7 e 8) do concentrado de fruta caju e da geleia de goiaba apresentaram bandas com seus radicais padrões nos valores de 754 cm^{-1} (Si-O), 891 cm^{-1} (Si-O-Si) e 763 cm^{-1} (Si-O), 907 cm^{-1} (Si-O-Si), respectivamente.

Li (2014) descreve que o Si-O no vidro se apresenta no intervalo de banda de 800 a 1300 cm^{-1} . Sendo o Si-O-Si o principal componente do vidro com faixa de 1000 a 1110 cm^{-1} (SMITH, 1999).

Espera-se que o vidro ofereça barreira a luz UV, não sendo utilizados absorvedores UV em sua composição. Sua proteção contra a incidência luminosa será dependente da espessura do vidro, de sua coloração e também sua composição (DE WAAL, 1984; ALVES, 2009).

Em estudo realizado por Tikekar et al. (2011) que utilizam radiação UV para induzir a oxidação do ácido ascórbico em sucos de fruta foi observado que a degradação induzida por UV ocorre da mesma forma que para a oxidação meta-catalisada do ácido ascórbico no suco. Com a oxidação do ácido ascórbico há formação do radical ascorbilo que é uma forma parcialmente oxidada, que pode ser reduzido a ácido dehidroascórbico que é a forma completamente oxidada, que se

não for reduzido de volta ao estado ascorbilo, sofrerá oxidação irreversível a ácido 2,3-dicetogulônico, podendo sofrer descarboxilação para CO₂, xilose, ácido xilônico e ácido lexônico, ou ser oxidado para formar ácido oxálico e compostos de quatro carbonos (por exemplo, ácido treônico) (COMBS JR; MCCLUNG, 2017).

O ácido L-ascórbico dos produtos processados a base de frutas foi degradado durante a exposição à radiação UV, não sendo detectada a presença do ácido D-isoascórbico nos produtos processados a base de fruta analisados. Segundo a RDC nº 8/2013 (BRASIL, 2013), a utilização do ácido D-isoascórbico como aditivo alimentar para suco, néctar, polpa de fruta e suco tropical não é permitido, havendo necessidade da adição de antioxidantes nestes produtos afim de proteger o ácido ascórbico, visto que é utilizado no enriquecimento. Entretanto, a utilização do ácido D-isoascórbico em geleias de fruta é permitida, sendo uma opção viável para proteção do ácido ascórbico.

CONCLUSÃO

Os produtos processados a base de frutas que foram expostos a radiação visível não sofreram degradação, sendo quantificado o ácido L-ascórbico. Todos os produtos processados a base de frutas que foram expostos a radiação UV, sofreram degradação do ácido L-ascórbico, mesmo estando envasados em embalagens consideradas seguras pela legislação brasileira. Estes achados são inéditos e permitem repensar as diretrizes para fortificação de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. M. V., JAIME, S. B. M., GONÇALVES, M. P., & SUZUKI, P. W. Embalagens plásticas e de vidro para produtos farmacêuticos: avaliação das propriedades de barreira à luz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 169-180, 2009.

AZEVEDO FILHO, C.A., GOMES, D.F., GUEDES, J.P.D.M., BATISTA, R.M.F., SANTOS, B.S., 2011. Considerations on the quinine actinometry calibration method used in photostability testing of pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 54, 886-888.

BACIGALUPI, C.; MAUREY, A.; BOUTROY, N.; PEYRON, S.; AVALLONE, S.; CHALIER, P. Changes in nutritional value of a multi-vitamins fortified juice packed in glass and standard PET bottles. **Food Control**, v. 60, p. 256-262, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC N° 45, de 9 de agosto de 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0045_09_08_2012.htm>. Acesso em: 18/08/2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº8, de 06 de março de 2013. Regulamento sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares para produtos de frutas e de vegetais e geleia de mocotó. Brasília, DF, 2013.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 5ª ed., v. 1, p. 303, 2010.

BUI-NGUYÊN, Mai Huong. Application of high-performance liquid chromatography to the separation of ascorbic acid from isoascorbic acid. **Journal of Chromatography A**, v. 196, n. 1, p. 163-165, 1980.

COLTRO, L. Embalagens plásticas transparentes: com ou sem barreira à luz? **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**, v. 14, n. 3, p. 1-5, 2002.

COMBS JR, G. F.; MCCLUNG, J. P. The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health: 5. ed. Londres: Academic press, 2017.

COUGHLIN, Greg; SCHAMBONY, Simon. New UV absorber for PET packaging: better protection with less discoloration. **Journal of Plastic Film & Sheeting**, v. 24, n. 3-4, p. 227-238, 2008.

DE WAAL, H. Course on manufacturing and properties of glass containers. Campinas: ITAL/ONUUDI; p. 48, 1984

DIEPENS, M.; GIJSMAN, P. Photodegradation of bisphenol A polycarbonate. **Polymer Degradation and Stabil**, v. 92, n. 3, p. 397-406, 2007.

DRIVELOS, Spyros; DASENAKI, Marilena E.; THOMAIDIS, Nikolaos S. Determination of isoascorbic acid in fish tissue by hydrophilic interaction liquid chromatography–ultraviolet detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 6, p. 2199-2210, 2010.

FÁVARO, S. L., FREITAS, A. R., GANZERLI, T. A., PEREIRA, A. G. B., CARDOZO, A. L., BARON, O.; MUNIZ, E. C.; GIROTTO, E. M.; Radovanovic, E. PET and aluminum recycling from multilayer food packaging using supercritical ethanol. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 75, p. 138-143, 2013.

HUANG, Z., BI, L., ZHANG, Z., HAN, Y. Effects of dimethylolpropionic acid modification on the characteristics of polyethylene terephthalate fibers. **Molecular medicine reports**, v. 6, n. 4, p. 709-715, 2012.

KOBAYASHI, M. L. Glass Packaging Properties and Attributes. In: **Reference Module in Food Science**. Elsevier, 2016.

SPINOLA, V.; BERTA, B.; CÂMARA, J. S.; CASTILHO, P. C. Effect of Time and Temperature on Vitamin C Stability in Horticultural Extracts. UHPLC-PDA vs. Iodometric Titration as Analytical Methods. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 50, n. 2, p. 489-495, 2013.

SPINOLA, V.; LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; CASTILHO, P. C. Determination of vitamin C in foods: Current state of method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1369, p. 2–17, 2014.

TIKEKAR, R. V; ANANTHESWARAN, R. C.; ELIAS, R. J.; LABORDE, L. F. Ultraviolet-Induced Oxidation of Ascorbic Acid in a Model Juice System: Identification of Degradation Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 8244–8248, 2011.

WALKER, R. Erythorbic acid and its sodium salt. In: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA). **Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants**. World Health Organization, Geneva, p. 27–60, 1991.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A temperatura de 30°C foi selecionada para metodologia de separação dos isômeros ácido D-isoascórbico e L-ascórbico, apresentando resultados satisfatórios, a metodologia apresentou um baixo valor na taxa de recuperação, sendo necessário maior estudo quanto o protocolo de extração, o que pode ser justificado pelo baixo valor do L-ascórbico quantificado quando comparado a informação nos rótulos. No estudo de fotoestabilidade, as amostras não sofreram degradação quando expostos a radiação visível, sendo possível quantificar o ácido L-ascórbico. Todas as amostras expostas a radiação UV sofreram degradação do ácido L-ascórbico, mesmo as embalagens se mostrando seguras. Não foi detectado a presença do isômero ácido D-isoascórbico nas amostras.