

INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE – CAMPUS ARAQUARI

**VINÍCIUS PETERS RUIZ, LUAN KRUGUER, RUAN AUGUSTO
LOBO E JOÃO GABRIEL SCHONROCK**

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM SUCOS
DE LARANJA – *CAMPUS ARAQUARI***

ARAQUARI/SC

2016

**VINÍCIUS PETERS RUIZ, LUAN KRUGUER, RUAN AUGUSTO
LOBO E JOÃO GABRIEL SCHONROCK**

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM SUCOS
DE LARANJA – *CAMPUS* ARAQUARI**

Trabalho de Qualificação (ou Trabalho Final) do Projeto de Iniciação Científica Integrada (PIC-QUIMI) apresentado ao Instituto Federal Catarinense – Campus Araquari como parte complementar à matriz curricular do Curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio.

ARAQUARI/SC

2016

RESUMO

Recentemente começaram a surgir no mercado os sucos naturais pasteurizados, que apesar do alto custo, acaba muitas vezes sendo escolhido no lugar do suco natural na busca pela praticidade, porém com o processo de pasteurização muitos nutrientes são perdidos junto com o ácido ascórbico graças a uma série de fatores como a luz que interfere na vitamina C, por ser um grande oxidante e por isso que durante esse processo, é repostado com novas adições do ácido. Esse projeto teve como objetivo determinar e comparar a quantidade de ácido ascórbico em diversas marcas de sucos pasteurizados e artificiais através de CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência), que permite uma grande informação dos sucos em quantidade de ácido ascórbico presente no suco. Com os resultados obtidos pode-se notar que os sucos naturais pasteurizados têm uma maior quantidade de ácido ascórbico, isso é explicado pelo processo de pasteurização, no qual é adicionado mais ácido ascórbico. A escolha da embalagem da empresa mostrou diferença, já que a vitamina C se degrada facilmente, sendo degradada até pela luz. As amostras com menor concentração de ácido ascórbico apresentaram um desvio maior, isso pode ser explicado pela metodologia utilizada, à falta dos reagentes específicos para o HPLC deixou como uma escolha o uso de ácido sulfúrico 98%.

SUMÁRIO

1 TEMA.....	5
1.1 DELIMITAÇÃO DO TEMA.....	5
2 OBJETIVO.....	6
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
3 INTRODUÇÃO.....	7
4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	8
6.1 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO.....	9
6.2 VITAMINA C EM SUCOS.....	9
6.3 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO.....	10
5 METODOLOGIA DA PESQUISA.....	12
5.1 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	12
5.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)..	12
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
7 CONCLUSÕES.....	16
REFERÊNCIAS.....	17

1 TEMA

Determinação de ácido L-ascórbico em sucos de laranja.

1.1 DELIMITAÇÃO DO TEMA

Determinação de ácido ascórbico em sucos naturais de laranja pasteurizados e comparação com sucos artificiais de laranja.

2 OBJETIVO

Determinar a quantidade de ácido ascórbico em sucos naturais pasteurizados e em sucos artificiais utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar as amostras e soluções padrões para análise cromatográfica;
- Analisar as soluções padrões de ácido ascórbico;
- Analisar as amostras e determinar a quantidade de ácido ascórbico;
- Comparar as quantidades de ácido ascórbico obtidos para cada amostra.

3 INTRODUÇÃO

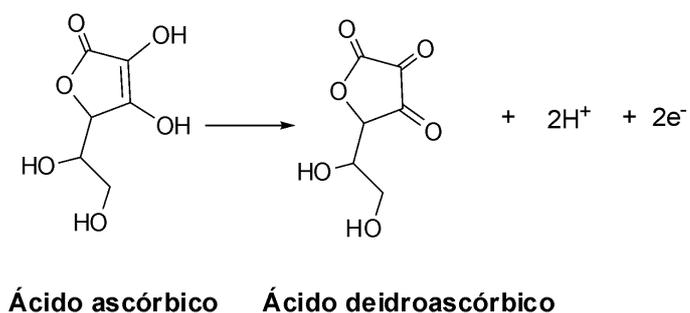
Há, muitas vezes, a preferência da ingestão de sucos ao invés da própria fruta. A maior desvantagem da ingestão do suco está na rápida absorção do carboidrato da fruta pelo corpo devido à ausência das fibras presentes na fruta. Além disso, alguns nutrientes não tem uma estabilidade boa após o preparo da fruta, ao serem expostos, principalmente ao oxigênio presente no ar atmosférico. Dentre esses nutrientes, pode-se citar a vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, que, em sucos tem uma estabilidade bastante baixa. A vitamina C atua no organismo como antioxidante, sendo o ácido ascórbico a ser oxidado e não outros nutrientes, melhorando então a saúde das pessoas.

Recentemente começaram a surgir no mercado os sucos naturais pasteurizados, que apesar do alto custo, acaba muitas vezes sendo escolhido no lugar do suco natural na busca pela praticidade. O processo de pasteurização aumenta o tempo de vida do alimento, porém custando ao consumidor a perda de alguns nutrientes daquele alimento e a escolha por esses produtos pode reduzir os benefícios que deveriam ser obtidos ao ingeri-los. Muitas indústrias optam por fazer a adição de ácido ascórbico aos sucos após a pasteurização. Esse trabalho visa determinar quais as quantidades de ácido ascórbico encontrado nos sucos naturais pasteurizados e artificiais comercializados na região metropolitana de Joinville.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O ácido L-ascórbico, conhecido usualmente como vitamina C, é uma substância química com fórmula química $C_6H_8O_6$ e a estrutura de um diol. Possui um alto potencial de oxidação [$E^\circ = 0,390$ V NHE (eletrodo normal de hidrogênio)], sendo convertido a ácido L-deidroascórbico (Figura 1) (FORNARO, 2011; SENAPATI, 2015).

Figura 1 Reação de oxidação do ácido ascórbico a ácido deidroascórbico.



O ácido ascórbico é uma vitamina encontrada em vários alimentos de origem vegetal, frutas e hortaliças, tais como, laranja, pera, morango, kiwi, limão, dando-se destaque aos alimentos cítricos. O composto é solúvel em água e é um micronutriente com atividades biológicas já bem descritas (CUNHA, 2014). Apesar da vitamina C ser encontrada em muitos alimentos, indica-se comê-los crus, pois o calor destrói a vitamina C. Sucos frescos, por exemplo, tem um grande teor de vitamina C pois foram feitos na hora e já que o ácido L-ascórbico é um ácido muito instável, até a luz o prejudica, degradando toda vitamina C e eliminando alguns benefícios que o suco lhe oferece (CORTE-ELEUTÉRIO,1997).

O ácido ascórbico é a vitamina que sofre degradação mais rapidamente ao ser exposta ao calor. O composto ainda é suscetível reações que são aceleradas dependendo do pH do meio, da presença de oxigênio e íons metálicos. Com isso, há perdas significativas de ácido ascórbico durante o armazenamento e processamento de alimentos que o contenha, sendo oxidado inicialmente a ácido deidroascórbico, que ainda apresenta alguma atividade vitamínica mas é menos estável que o ácido ascórbico, sendo convertido a ácido dicetugulônico – esse já sem nenhuma contribuição nutricional –que é degradado a diversos outros compostos (CUNHA, 2014; NOGUEIRA, 2011).

6.1 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO

A vitamina C é muito importante para todas as pessoas e deve estar presente na alimentação de todos, pois o corpo não possui a capacidade de produzi-la. Participa de várias reações orgânicas que ocorrem no organismo, como por exemplo a produção de colágeno da pele, na conversão do colesterol em ácidos biliares que ajudam na digestão de gorduras e também ajuda na absorção de ferro no organismo. Além disso a vitamina C, é um ótimo antioxidante, isso ajuda na prevenção de doenças cardiovasculares, na prevenção de lesões musculares e ajuda a combater o envelhecimento precoce e também ajuda na recuperação de queimaduras e feridas (CORTE-ELEUTÉRIO, 1997).

A falta de vitamina C no organismo pode causar vários problemas para a saúde. Nas lactantes de 6 a 12 meses, a falta de vitamina C pode causar escorbuto, uma doença carencial. Os sintomas iniciais são dores no corpo, falta de apetite e dificuldade para ganhar peso. Em crianças, os ossos são finos e podem tornar-se saliente as articulações, são possíveis as hemorragias de baixo do tecido que cobre os ossos e em volta dos dentes. Já nos adultos, o escorbuto pode ser causado pela alimentação restringida. Os sintomas são dores no corpo, a pessoa se sente deprimida, cansada, ocorre sangramentos debaixo das unhas, em volta da gengiva e também sangramentos superficiais na pele (VANNUCCHI, 2012).

O consumo excessivo de ácido ascórbico pode causar gastroenterite ou diarreia osmótica. Megadoses também podem diminuir a disponibilidade da vitamina B12 dos alimentos, podendo gerar até deficiência de vitamina B12. Efeitos adversos relacionados ao consumo excessivo: distúrbios gastrointestinais, cálculos renais e absorção excessiva de ferro. A quantidade certa por pessoa a ser consumida varia de acordo com o peso, idade, sexo entre outros aspectos, mas, em média, uma pessoa deve consumir por dia de 75 a 90 miligramas de vitamina C. O alimento mais conhecido por seu teor de vitamina C é a laranja, que possui em média 80 a 90 miligramas de vitamina C (VANNUCCHI, 2012).

6.2 VITAMINA C EM SUCOS

Atualmente, o estilo de vida dos moradores de centros urbanos reserva cada vez menos tempo para o preparo de alimentos, sendo dada preferência a alimentos processados para economizar tempo e evitar o cansaço proveniente do tempo gasto ao elaborar uma refeição. Assim,

tornou-se comum o consumo de sucos de frutas congelados, reconstituídos ou extraídos e simplesmente engarrafados, como, por exemplo, o suco de laranja.

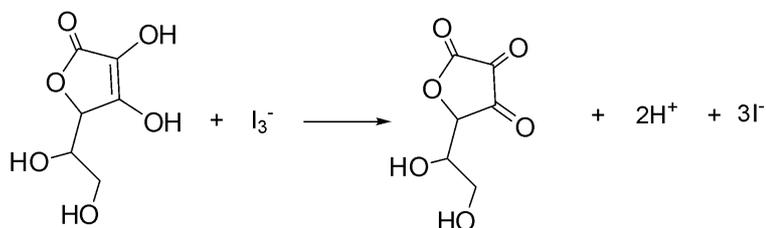
O Brasil é o maior produtor mundial de suco de laranja, de acordo com os dados apresentados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos em 2012 (LARANJA, 2013). O suco de laranja natural apresenta uma vida útil muito limitada e seu preparo, apesar de simples, pode ser suprimido, substituindo-o pelo suco industrializado (SOUZA, 2009). Atualmente é comum encontrar sucos naturais pasteurizados de diferentes frutas e o processo de pasteurização é que garante da qualidade microbiológica destes sucos. Nesse processo há o aquecimento do suco e, como já citado, diversos nutrientes são degradados pelo calor, dado destaque ao ácido ascórbico (GOMES, 2006). Diversas indústrias optam então pela adição posterior de ácido ascórbico, porém, o controle de qualidade dos sucos industrializados ainda é insuficiente (RONCADA, 1977)

6.3 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Dentre os procedimentos utilizados para determinação de ácido ascórbico, pode-se dar destaque a iodometria, a determinação utilizando reagente de Tillmans e determinação via cromatografia líquida de alta eficiência.

A iodometria consiste em uma determinação volumétrica de ácido ascórbico a partir da titulação do mesmo utilizando iodo (Figura 2) e, como indicador, o amido, que forma um complexo azul com o iodo adicionado em excesso. O procedimento mais utilizado em amostras de origem vegetal é o método de Tillmans que também consiste na análise titulométrica usando o reagente 2,6-diclorofenol indofenol, que é colorido, e a descoloração do reagente indica seu consumo pela reação com o ácido ascórbico (BRESOLIN, 2014).

Figura 2 Reação do ácido ascórbico com o iodo na iodometria.



A iodometria e o método de Tillmans são procedimentos mais simples, de menor custo, mas também podem gerar resultados incertos devido à presença de outras espécies redutoras no meio, podendo então se superestimar a quantidade de ácido ascórbico nas amostras. Além disso,

como ambos os métodos se baseiam em mudanças de coloração no ponto de viragem da titulação, há limitações quanto a coloração da amostra (BRESOLIN, 2014).

Outra metodologia para análise de vitamina C é por HPLC (*high performance liquid chromatography*) ou CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), que consiste em uma fase móvel e uma estacionária. Por diferença de pressão a amostra tem sua passagem através da coluna acelerada e a separação dos componentes facilitados. Este método pode ser considerado mais preciso que a titulação, apesar de mais caro e demorado. Diversos trabalhos estão descritos na literatura utilizando análise por cromatografia líquida, em sua maioria utilizando fase reversa com solventes polares e coluna C18 e acompanhamento da análise via espectrometria na região do UV-visível com comprimento de onda fixo (254 nm, comprimento de onda de absorção máxima do ácido L-ascórbico) (INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY; BRESOLIN, 2014; CORTE-ELEUTÉRIO, 1997; LARANJA, 2013).

5 METODOLOGIA DA PESQUISA

5.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

Para a curva de calibração preparam-se soluções estoque de ácido sulfúrico 10% (v/v) em água MilliQ e de ácido ascórbico 240 mg L⁻¹. A partir dessas soluções estoque foram preparadas as soluções de calibração com concentrações entre 10 e 180 mg L⁻¹ em solução 2% (v/v) de ácido sulfúrico em água MilliQ.

As amostras de suco foram preparadas também em solução 2% (v/v) de ácido sulfúrico em água MilliQ com diluição necessária para garantir concentrações de ácido ascórbico dentro da faixa de calibração.

5.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR CLAE (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA)

As análises foram feitas via CLAE utilizando o cromatógrafo líquido modelo 1260 Infinity da Agilent, localizado no Instituto Federal Catarinense Campus Araquari. Os materiais utilizados foram: filtro de membrana de porosidade de 5µm, coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6x250mm; 5 µm), banho ultrassônico. Os reagentes utilizados foram: metanol grau HPLC, água Milli-Q, ácido fosfórico 85%, ácido ascórbico e ácido sulfúrico 98%.

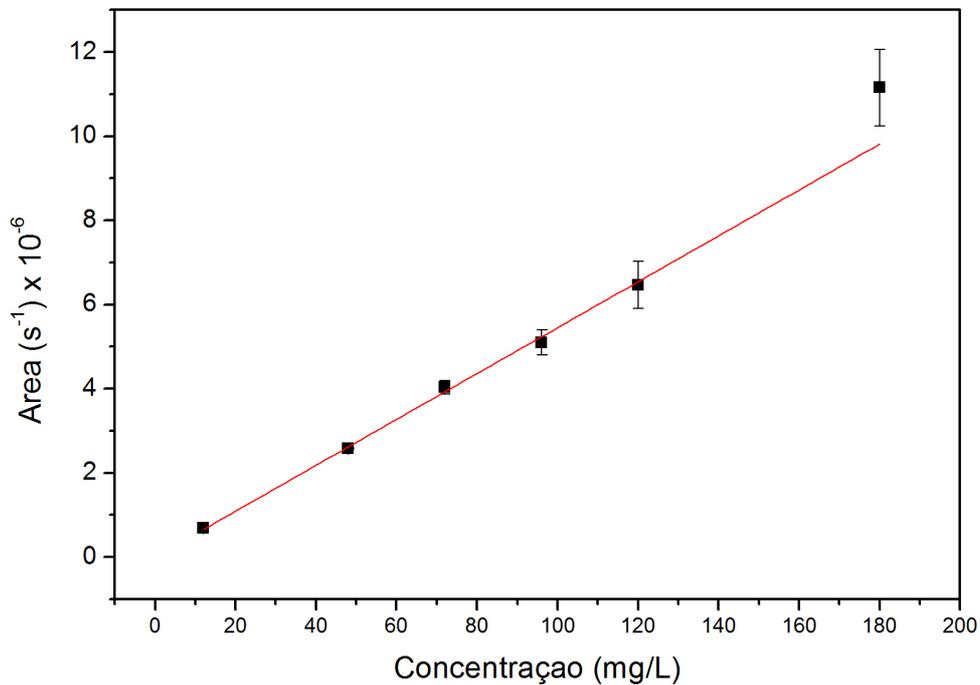
Foram feitas sete amostras em triplicatas das amostras A (Blissima), B (Prats), C (Del Valle Integral), D (Del Valle Caseiro), E (Maguary), F (Sufresh - caixa) e F (Sufresh - lata), sendo que as amostras A,B e C são os sucos pasteurizados e as amostras D, E, F e G são os sucos artificiais

Todas as amostras foram filtradas antes da injeção no cromatógrafo líquido, utilizando um filtro de membrana. As análises no cromatógrafo líquido foram feitas utilizando a coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6x250mm; 5 µm). A fase móvel empregada nas análises foi uma mistura de metanol/água (5:95, v/v) com pH 3,00, ajustado utilizando ácido fosfórico. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min e a corrida foi feita a temperatura ambiente com tempo de corrida de 6 minutos. A detecção foi feita com detector UV ($\lambda = 254$ nm). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de análise escolhido se baseou no trabalho desenvolvido pela Faculdade de Alimentos e Tecnologia Bioquímica do Instituto de Tecnologia Química de Praga. Já o preparo de amostras seguiu o procedimento utilizado no laboratório de ensino do Instituto Federal Catarinense - *campus* Araquari.

Figura 3 Curva de calibração obtida com soluções padrão aquosas de ácido ascórbico.



A curva de calibração (Figura 3) foi obtida através de soluções padrões de ácido ascórbico de concentrações entre 10 e 180 mg L⁻¹. Após ajuste linear dos pontos, obteve-se uma reta de Equação

$$\text{Área (s}^{-1}\text{)} = 54531,39 \times [\text{Ácido ascórbico}]$$

com $R^2 = 0,99896$.

A partir das análises realizadas, obtiveram-se os seguintes resultados (Tabela 1):

Tabela 1 Quantidade de ácido ascórbico obtidos para os sucos analisados.

AMOSTRA	Ácido ascórbico em mg / 200 mL de suco	IC(95%) em mg / 200 mL de suco
Suco A (Pasteurizados)	107 ± 8	107 ± 20
Suco B (Pasteurizados)	48 ± 4	48 ± 10
Suco C (Pasteurizados)	41 ± 2	41 ± 5
Suco D (Artificial)	40 ± 3	40 ± 7
Suco E (Artificial)	29 ± 3	29 ± 7
Suco F (Artificial)	29 ± 7	29 ± 17
Suco G (Artificial)	48 ± 2	48 ± 5

Com base na tabela apresentada podemos ver que os sucos naturais pasteurizados possuem maior quantidade de ácido ascórbico que os sucos artificiais. Dentro dos resultados obtidos, observou-se um grande desvio das medidas e, dentro de um intervalo de confiança de 95 %, os resultados obtidos para os sucos com menos concentração de ácido ascórbico se mostram bastante incertos como, por exemplo, para o suco F, que mostrou o maior desvio (considerando sua baixa concentração de ácido ascórbico), podendo apresentar uma concentração de ácido ascórbico entre 12 e 41 mg de ácido ascórbico a cada 200 mL de suco.

Geralmente no mercado encontram-se sucos de laranjas já prontos para o consumo do comprador, com um alto teor de ácido ascórbico, que pode vir das diversas adições de ácido que o suco sofre durante suas fases de pasteurização, onde são postos em caixas de plástico/vidro. Porém, o ácido ascórbico é muito oxidável sendo que até a luz pode interferir, então hoje são geralmente postos em embalagens que não permitem a passagem de luz, para uma maior duração do suco e conservação do ácido ascórbico. Durante as análises é visível observar que embalagens que não permitem a passagem de luz conseguem com mais facilidade conter o ácido ascórbico dentro da embalagem dando muito mais tempo para o suco ser comprado e consumido pelo comprador, porém com uma embalagem de vidro ou de plástico, permite que a luz oxide o ácido fazendo com que a

vida do suco seja mais curta, porém em seus processos de pasteurização é adicionado muito ácido ascórbico, que compensa o fato da oxidação pela luz.

O método de extração das amostras, utilizando solução aquosa de H_2SO_4 2 %, é utilizado em análises através de iodometria, talvez não sendo tão adequado ao uso no preparo de amostras via CLAE e explicando alguns desvios observados.

7 CONCLUSÕES

O método utilizado na CLAE para determinação de ácido ascórbico mostrou-se eficiente e adequada para o analito, obtendo-se curva de calibração excelente, numa boa faixa linear de resposta em relação a concentração e com um R^2 próximo de 1. Para as amostras reais, observou-se um desvio das medidas quanto menor a concentração de ácido ascórbico presente nas amostras. Os resultados obtidos pelas amostras de ácido L-ascórbico com menor concentração mostraram-se incertos. Uma possível causa das incertezas pode ser pelo método de extração, ainda não validado na análise de ácido ascórbico por CLAE, utilizando solução aquosa de H_2SO_4 2%, usado em análises por iodometria.

REFERÊNCIAS

BRESOLIN, J. D.; HUBINGER, S. Z. Metodologia para determinação de ácido ascórbico em sucos de citrus utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE INSTRUMENTAÇÃO AGROPECUÁRIA, São Carlos. Anais do Simpósio Nacional de Instrumentação Agropecuária 2014. São Carlos, 2014. p. 497.

CORTE-ELEUTÉRIO, R. M.; SALGADO, J. M. Estabilidade do ácido ascórbico em suco congelado de acerola (*malpighia glabra* L. - sinônimo *M. punicifolia* L.) durante o armazenamento. Boletim do CEPPA, Curitiba, v. 15, n. 2, p. 101-112, jul./dez. 1997.

CUNHA, K. D. et al. 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, abr./jun. 2014.

FORNARO, A.; COICHEV, N. Ácido L-ascórbico: reações de complexação e de óxido-redução com alguns íons metálicos de transição. *Química Nova*, v.21, n.5, p.642-650, 1998.

GOMES, M. S. Estudo da Pasteurização de Suco de Laranja Utilizando Ultrafiltração, Rio Grande do Sul. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal, Porto Alegre, 2006.

INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY. Faculty of Food and Biochemical Technology. Analysis of Food and Natural Products Laboratory Exercise: Determination of vitamins, caffeine and preservatives. Praga. Disponível em: <http://web.vscht.cz/~kohoutkj/ENG/LAPP_ANGL_HPLC_UV.pdf>. Acesso em: 17.05.2016

Laranja, Agência Paulista de Promoção de Investimentos e Competitividade, São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.investe.sp.gov.br/setores-de-negocios/agronegocios/laranja/>> Acessado em: 17.05.2016.

NOGUEIRA, F. S. Teores de ácido L-ascórbico em frutas e sua estabilidade em sucos, Rio de Janeiro. 2011. 84 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2011.

RONCADA, M. J. et al. Concentração de ácido ascórbico em sucos de diversas frutas brasileiras e sua relação com preço e necessidades diárias recomendadas de vitamina C. *Revista Saúde pública*, São Paulo, v. 1, n.11, p. 39-46, 1977.

SENAPATI, S. et al. Kinetics and Mechanistic Study of Redox Reaction of Cobalt (III) Complex with L-Ascorbic Acid in Aqueous Acid Medium. American Chemical Science Journal, v. 9, n.2, p. 1-10, 2015.

SOUZA, D. R. et al. Estabilidade do ácido ascórbico em sucos cítricos industrializados, armazenados sob condições simuladas de consumo doméstico. Terra e Cultura, v. 25, n. 48/49, p. 26-35, jan./dez., 2009.

VANNUCCHI, H.; ROCHA, M. M. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes: Ácido Ascórbico (Vitamina C). v. 21, 1ª ed. São Paulo: ILSI Brasil, 2012.