



**Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição Humana
Especialização em Nutrição Humana**

**Caracterização de Vitamina C em frutos de Camu-camu
Myrciaria dubia (H.B.K.) em diferentes estágios de maturação
do Banco Ativo de Germoplasma de Embrapa**

**Autora: Luz Haydee Bravo Zamudio
Orientadora: Professora Dra. Egle Machado de Almeida Siqueira
Co orientadora: Dra. Elionor Rita Pereira**

**BRASÍLIA
Distrito Federal - Brasil
2007**



**Universidade de Brasília
Departamento de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana**

LUZ HAYDEE BRAVO ZAMUDIO

Caracterização de Vitamina C em frutos de Camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K.) em diferentes estágios de maturação do Banco Ativo de Germoplasma de Embrapa

Monografia apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção da Especialização em Nutrição Humana.

BRASÍLIA
Distrito Federal - Brasil
Agosto – 2007

Bravo, Luz

Caracterização de Vitamina C em frutos de Camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K.) em diferentes estágios de maturação do Banco Ativo de Germoplasma de Embrapa / Luz Bravo. – Brasília 2007.

xvi, 104 Pp, 29 f: il.

Monografia (especialização) – Universidade de Brasília, Departamento Nutrição Humana 2007
Orientador: Egle Machado de Almeida Siqueira

1. Vitamina C. 2. Camu-camu. 3. CLAE. 4. Coluna de troca iônica

Universidade de Brasília
Departamento de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Monografia apresentada à Faculdade de Ciência da Saúde, Departamento de Nutrição Humana Universidade de Brasília – UnB, como requisito parcial à obtenção do grau de Especialista em Nutrição Humana

Título da Monografia: Caracterização de Vitamina C em frutos de Camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K.) em diferentes estágios de maturação do Banco Ativo de Germoplasma de Embrapa

Nome do Autor: Luz Haydee Bravo Zamudio

Aprovado em: 01 / Agosto / 2007

Dra. Egle Machado de Almeida Siqueira (Presidenta)
Professora do Departamento de Nutrição Humana
Universidade de Brasília - UnB

Dra. Elizabeth Maria Talá de Souza (Membro)
Professora do Departamento de Nutrição Humana
Universidade de Brasília - UnB

Dra. Maria Esther Fonseca de Noronha Boiteux (Membro)
Pesquisadora do Centro Embrapa Hortaliças

Professora Dra. Sandra Fernandes Arruda (Membro)
Professora do Departamento de Nutrição Humana
Universidade de Brasília - UnB

Dedico com todo meu coração este trabalho:
Aos meus pais Luis e Consuelo, aos meus irmãos Carmen, Luis, Ronnie e
Berenice; aos meus sobrinhos Andreita e Alejandrino.

AGRADECIMENTOS

À Dra Marília Nutti, quem conduz o programa Internacional Harvest Plus na América Latina e Caribe, pelo apoio com a bolsa, a qual permitiu que eu vivesse com dignidade enquanto desenvolvia o presente trabalho.

A professora Dione, quem coordena DPP - UNB pelo apoio moral e incentivo.

À Professora Egle Machado Siqueira pela orientação para conclusão do presente trabalho, obrigada pela transmissão de seu grande conhecimento e incentivo constante durante o trabalho e pelo exemplo gerado.

A minha amiga e co orientadora do mestrado, a Dra Elionor Rita Pereira, pela amizade e competência com que me guiou nos passos da pesquisa científica.

Ao Dr Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, quem coordena o Laboratório de Cromatografia da Embrapa Agroindústria de Alimentos, pelo incentivo e exemplo de profissionalismo.

Aos meus grandes amigos e colegas que de uma maneira especial me apoiaram durante meu trabalho, amizade e boa vontade em compartilhar seus conhecimentos profissionais.

Agradeço a Deus por tudo.

EPÍGRAFE

O pensamento do sucesso começa com idéias, sonhos, atitudes, educação e planejamento. São as atitudes que escrevem a nossa história, e não nossas expectativas. A maior carência no mundo profissional não é de conhecimento e sim de atitude. Não basta rezar. É preciso ir ao encontro de Deus

Gilclér Regina

RESUMO

Myrciaria dubia é uma planta nativa da Amazônia, com elevado potencial funcional, principalmente pelo alto teor de vitamina C, um dos antioxidantes naturais. O potencial do camu-camu ainda é praticamente ignorado pelos habitantes da região amazônica, ao contrário do meio industrial, onde tem prestígio na indústria de medicamentos, cosméticos, alimentos e bebidas. A Embrapa Amazônia Oriental tem um Banco Ativo de Germoplasma - BAG de camu-camu oriundo da microrregião do Rio Solimões que ainda não foi caracterizado. Por esta razão e aliada à importância dos frutos desta espécie propusemos no presente trabalho de pesquisa: Determinar o teor de ácido ascórbico de um grupo de frutos oriundos do BAG de camu-camu da Embrapa em diferentes estágios de maturação mediante análise comparativa de duas metodologias de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com coluna de Troca Iônica em comparação com o método de titulometria de Tillman, em polpas e cascas separadamente, e avaliar as perdas devidas ao processamento usual na produção de polpa comercial para consumo que ainda não foram reportados. Como resultado, representado pela média das repetições técnicas na polpa e casca do fruto e na polpa processada, a metodologia de CLAE com coluna de troca iônica apresentou teor de vitamina C 28% maior na casca em comparação com a polpa dos frutos. A polpa comercial apresentou teor de vitamina C mais baixo que o teor da polpa do fruto em 30%. Observou-se que o armazenamento do fruto tanto inteiro quanto na forma homogeneizada, a -80°C, por cerca de 10 meses reduz significativamente o teor de vitamina C na casca e polpa. Concluiu-se que: Existe escassa diferença de vitamina C entre os diferentes estágios de maturação. Em todos os estágios de maturação a casca apresentou maior teor de vitamina C que a polpa do fruto. A metodologia de CLAE com coluna de Troca Iônica apresenta valores mais exatos de teor de vitamina C, ao eliminar os interferentes que dão uma alteração no teor de vitamina C. Grande parte do teor de vitamina C na polpa extraída por despulpador mecânico, foi perdida durante o processamento. A completa caracterização dos frutos do banco de germoplasma pode contribuir significativamente com programa de melhoramento genético de camu-camu na Embrapa.

Palavras Chave: Camu-camu, Vitamina C, estágios de maturação, CLAE, coluna de Troca Iônica.

ABSTRACT

Myrciaria dubia is a native plant of the Amazonian region, with high functional potential, mainly for the high quantities of vitamin C, one of the natural antioxidants. The potential of camu-camu is still practically ignored by the Amazonian region settlers; on the other hand in the industrial way, the camu-camu has prestige as a natural raw material for the medicine, cosmetics, food and drinks industry. Embrapa Amazonian Oriental keeps Germoplasma Active Bank BAG of camu-camu, originated from the Solimões micro region that was not characterized. For this reason, allied to the importance of this specie fruits, we propose in the present research work: Evaluate the ascorbic acid concentration of a mix of camu-camu fruits native to Embrapa's BAG, in different ripeness stages by comparative analysis of two methodologies High pressure liquid chromatography (HPLC) with Ionic Interchange column and Tillman titulometric method in flesh and rind separately and evaluate the losses due to the usual processing of camu-camu fruits for a commercial flesh production, all of these were not reported yet. As a result, that was represented by the arithmetical average of technical repetitions in the flesh and rind fruit and the commercial flesh, HPLC's methodology showed 28 % higher quantity of vitamin C in rind than in flesh. The commercial flesh extracted for its further use presented less vitamin C concentration than the natural flesh of camu-camu fruit in 30 %. The storage of camu-camu fruit at -80 °C as a whole fruit or in the homogenized form for near 10 months approximately reduces significantly the vitamin C concentration in the rind and flesh. Concluding: The results presented lightly significant differences of the vitamin C concentration between the different ripeness stages; the rind presented vitamin C quantity significantly higher than the flesh in all ripeness stages of camu-camu fruit; HPLC's methodology presented more exact values of vitamin C concentration than Tillman's methodology, because HPLC's methodology eliminate the substances that interfere the vitamin C concentration determination; the great part of vitamin C in the commercial flesh was lost during its processing. The complete characterization of the camu-camu fruits of the BAG can contribute significantly with the genetic improvement programs of camu-camu resources in Embrapa.

Key words: Camu-camu, vitamin C, ripeness stages, HPLC, interchange ionic column

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO	ix
ABREVIATURAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABELAS	xv

Capítulo I.-	1
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
1 - Camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i> H.B.K)	3
1.1 – Distribuição Geográfica de camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i>)	09
1.2 – Habitat e Condições edafo-climáticas de camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i>)	10
1.3 – Composição Nutricional de camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i>)	11
1.4 – Potencial Agro industrial de camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i>)	14
1.5- Banco Ativo de Germoplasma BAG de camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i> (H.B.K.) McVaugh) da Embrapa	16
1.6.- Desenvolvimento e maturação dos Frutos de camu-camu	18
2 - Vitamina C	21
2.1.- Vitamina C e sua estrutura	21
2.2.- Funções da vitamina C, metabolismo, absorção e depósito de vitamina C no organismo do ser vivo	22
2.3.- Dose Recomendada de Ingestão de vitamina C	29
2.4.- Biossíntese da vitamina C	31
2.5.- Função antioxidante da vitamina C	35
2.6.- Estudo do camu-camu como nutraceutico	39
3.- Considerações sobre as metodologias para determinação de vitamina C	40

Capítulo II.-	47
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	47
Capítulo III.-	49
MATERIAIS E MÉTODOS	49
Capítulo IV.-	63
RESULTADOS	63
Capítulo V.-	80
DISCUSSÃO	80
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	86
Capítulo VI.-	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
APÊNDICE	104

ABREVIATURAS

AA ácido ascórbico

ASC[•] Radical ascorbil

ASCH⁻ Ascorbato (anion resultante quando o ácido ascórbico se encontra em solução)

ABS Absorbância

ATP Adenosina trifosfato

CLAE Cromatografia líquida de alta eficiência

CoQH₂ Coenzima Q en forma reduzida, ubiquina

2,6- DCPIP 2,6- Diclorofenolindofenol

DHA Ácido deidroascórbico

DHAR Deidroascorbato redutase

DNPH dinitrofenilhidrazina

EAR Estimate average requirement

ERO Espécie reativa de oxigênio

FDA Food and Drug Administration

G6PDH Glicose – 6 – fosfato desidrogenase

GR Glutathione redutase

GSH Glutathione reduzida

GSSH Glutathione oxidada

H₂O₂ Peróxido de hidrogênio

HPLC High performance liquid chromatography

LC Liquid Chromatography

MDHAR Monodehidroascorbato redutase

NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

OH[•] Radical hidroxilo

OMS Organização Mundial de Saúde

RDA Requirement Dietary Allowance

SOD Superóxido dismutase

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01.- Plantas de camu-camu na ribeira do Rio Solimões (habitat original)	04
Figura 02.- Aspecto geral da planta de camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i>).	05
Figura 03.- Frutos de camu-camu empregados no presente trabalho no arbusto com os diferentes estágios de maturação.	06
Figura 04.- Foto da Inflorescência de camu-camu obtida no campo experimental de Embrapa	07
Figura 05.- Foto do aspecto geral da planta em condições de terra firme no campo experimental da Embrapa.	08
Figura 06.- Foto das sementes de camu-camu no campo experimental de Embrapa	09
Figura 07.- Bacia Amazônica, onde se observa o rio Solimões.	18
Figura 08.- Estrutura química do ácido ascórbico (vitamina C)	21
Figura 09.- Estrutura do Ácido L-ascórbico e Ácido L-deidroascórbico	22
Figura 10.- Rota de Biossíntese do ácido L-ascórbico em plantas e em animais	33
Figura 11.- Biossíntese, degradação e reciclagem do ácido ascórbico em plantas.	34
Figura 12.- Ressonância da molécula radicalar ascorbil.	36
Figura 13.- Reações de reciclagem do Ascorbato	37
Figura 14.- Reações de Interação entre moléculas radiculares de carotenóides, vitamina E e ácido ascórbico	38
Figura 15.- Cromatógrafo líquido de alta eficiência nas dependências de Embrapa Agroindústria de Alimentos CTAA.	44
Figura 16.- Partes do equipamento de CLAE com coluna de troca iônica	46
Figura 17.- Célula do detector espectrofotômetro de absorbância de radiação UV-VIS	46
Figura 18.- Fotografia obtida de um corte dos frutos de camu-camu	49
Figura 19.- Frutos de camu-camu nos quatro estágios de maturação	51
Figura 20.- Fluxograma utilizado no presente trabalho para o	53

processamento da polpa dos frutos de camu-camu	
Figura 21.- Frutos de camu-camu no estágio 03 e estágio 04 de maturação no campo experimental de Embrapa	54
Figura 22.- Fluxograma do procedimento empregado no trabalho para o método de CLAE com coluna de troca iônica.	58
Figura 23.- Cromatogramas de análise de Vitamina C da polpa dos frutos de camu-camu	67
Figura 24.- Cromatogramas de análise de Vitamina C da casca dos frutos de camu-camu	69
Figura 25.- Cromatograma de análise de vitamina C na polpa extraída por despulpamento mecânico dos frutos de camu-camu procedentes do BAG de Embrapa	71
Figura 26.- Comparação entre os métodos: CLAE de troca iônica e titulometria de Tillman na determinação de teor de vitamina C na polpa dos frutos de camu-camu.	76
Figura 27.- Comparação entre os métodos: CLAE de troca iônica e titulometria de Tillman na determinação de teor de vitamina C na casca dos frutos de camu-camu.	77
Figura 28.- Teor de vitamina C, determinado por titulometria de Tillman, na polpa do fruto de camu-camu, depois de armazenado do fruto a -80 °C, inteiro ou homogeneizado	78
Figura 29.- Teor de vitamina C, determinado por titulometria de Tillman, na casca do fruto de camu-camu, depois de armazenado o fruto a -80 °C, inteiro ou homogeneizado.	79

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01. -Conteúdo de ácido ascórbico em matrizes vegetais maduras	13
Tabela 02. -Atributos físicos utilizados no presente trabalho para caracterizar os estágios de maturação de frutos de camu-camu.	50
Tabela 03. - Construção dos pontos da curva de calibração	59
Tabela 04. -Concentração de ácido ascórbico na polpa dos frutos de camu-camu do BAG de Embrapa determinada por CLAE (g/100g).	63
Tabela 05. -Concentração de ácido ascórbico na casca dos frutos de camu-camu do BAG de Embrapa determinada por CLAE (g/100g).	64
Tabela 06. -Teor de ácido ascórbico nos frutos de camu-camu procedentes do BAG de Embrapa determinado por CLAE (g/100g).	65
Tabela 07. -Efeito do armazenamento no teor médio de ácido ascórbico* na polpa e na casca dos frutos de camu-camu, independentemente do estágio de maturação. (g/100g)	65
Tabela 08. - Concentração de ácido ascórbico* por CLAE em polpa extraída por despolpamento mecânico dos frutos de camu-camu procedentes do BAG de Embrapa	71
Tabela 09. -Concentração de ácido ascórbico na polpa dos frutos de camu-camu do BAG de Embrapa determinada por titulometria de tillman. g/100g.	72
Tabela 10. -Concentração de ácido ascórbico na casca dos frutos de camu-camu do BAG de Embrapa determinada por titulometria de Tillman, resultados expressos em g/100g.	73
Tabela 11. -Concentração de ácido ascórbico determinado por titulometria de Tillman na polpa e casca do fruto do BAG de Embrapa. g/100g.	74
Tabela 12. -Efeito do armazenamento no teor médio de ácido ascórbico* na polpa e na casca dos frutos de camu-camu, independentemente do estágio de maturação, em g/100g.	74
Tabela 13. - Concentração de ácido ascórbico por titulometria de Tillman	75

na polpa extraída por despulpamento mecânico dos frutos de camu-camu procedentes do BAG de Embrapa.

Tabela 14.- Teor de ácido ascórbico determinado por titulometria de Tillman, na polpa e casca do fruto armazenado inteiro a –80 °C, desde Abril 2005, em g/100g. 75

Capítulo I

INTRODUÇÃO

Camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K McVaugh) é um recurso da região da Amazônia que tem elevado potencial como alimento funcional por apresentar elevada capacidade antioxidante, devido possivelmente a seu elevado teor de vitamina C, e por apresentar concentrações consideráveis de potássio, antocianinas e carotenóides.

A produção mundial de ácido ascórbico sintético é de 80.000 toneladas por ano, o que é economicamente viável, sendo que 50% desta produção é utilizada como suplemento vitamínico em preparações farmacêuticas, para tratamento de queimaduras, como aditivo nos produtos cosméticos por sua propriedade antioxidante e estimulante de produção de colágeno. O ácido ascórbico, durante o processamento de alimentos previne a descoloração de pigmentos e o escurecimento enzimático e preserva aromas e sabores dos alimentos, realçando o conteúdo de nutrientes. (HANCOCK & VIOLA. 2002).

No Peru, o Camu-camu é processado na forma de polpa congelada, geléias e xaropes. No Brasil, a polpa de camu-camu é encontrada nos mercados da região norte do país e é utilizada no processamento de sorvetes, em misturas com outras frutas e em cosméticos.

A crescente demanda por alimentos e produtos saudáveis, vem contribuindo para aumentar a importância do camu-camu na produção de concentrados e suplementos naturais de vitamina C, por ter um apelo como fonte natural desta vitamina principalmente no mercado de produtos naturais, devido ao seu altíssimo teor de vitamina C.

Um Banco de Germoplasma de camu-camu foi criado pela Embrapa Amazônia Oriental com sementes coletadas em diferentes partes das margens do rio Solimões da região amazônica. A proposta do presente trabalho foi determinar os teores de vitamina C de polpa e casca de frutos dos acessos camu-camu do BAG de Embrapa em diferentes estágios de maturação, utilizando-se dois métodos; um titulométrico e outro por Cromatografia líquida de alta eficiência, com coluna de troca iônica. Uma análise comparativa da forma de armazenamento do fruto, a -80 °C, inteiro e da polpa comercial foi também realizada

Os resultados obtidos podem contribuir para a definição de melhores métodos de processamento dos frutos, especialmente para fazer concentrados de vitamina C e para a predição do período ideal de colheita mediante a avaliação do conteúdo nutricional do fruto (ANDRADE, 1991b).

REVISÃO DA LITERATURA

1 – Camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K (McVaugh)).

Camu-camu é uma fruteira nativa da Bacia Amazônica, pertence à família *Myrtaceae*, que cresce de forma natural na beira dos rios e lagos de águas escuras e ilhas, formando grandes bosques (MCVAUGH, 1969). O camu-camu possui outros nomes, conforme a região ou país de origem: Caçari, araçá-d'água (Brasil), guaybito (América do sul Colômbia), guayabato (Venezuela). Rumberry (América do Sul) e Camu plus (América do Norte e Europa).

A planta mede de 4 a 8 m de altura, com uma ramificação que se inicia desde a base, ramos cilíndricos lisos de cor marrom claro ou vermelho, com uma crosta que se desprende obedecendo a um ciclo definido. Na Figura 01 podem-se ver os camucamuzeiros no habitat original, nas margens dos rios. Na Figura 02 pode-se ver o aspecto geral da planta: as folhas são simples, opostas, ovuladas ou elípticas; a raiz principal é de forma cônica e possui muitos fios absorventes; a flor é de cor branca, subséssil com quatro pétalas. Na figura 03 pode-se ver que os frutos são globosos, de superfície lisa e brilhante, da cor vermelha escura até preto púrpura ao amadurecer, os quais medem de dois a quatro centímetros de diâmetro. (PINEDO *et al.*, 2002).



Figura 01.- Plantas de camu-camu na ribeira do rio (habitat original)

Fonte: <http://www.cedecam.org/>



Figura 02.- Aspecto geral da planta de camu-camu (*Myrciaria dubia*).
A) Corte longitudinal de uma flor. B) Ramo frutífero. C) Frutos maduros
Fonte: COUTURIER, G. & MAUÉS, M. 2002.



Figura 03.- Frutos de camu-camu empregados no presente trabalho no arbusto com os diferentes estágios de maturação.

A planta é monóica, com flores hermafroditas mas de fecundação alógama, já que não existe a sincronização entre a abertura do pistilo e estames (PETERS & VASQUEZ,. 1988). A propagação pode realizar-se por semente ou por materiais vegetativos: enxertos, estacas.

Na Figura 04 pode-se ver o aspecto geral da inflorescência. Normalmente na planta, o eixo floral contém quatro flores. (PINEDO *et al.*, 2002).



Figura 04.- Foto da Inflorescência de camu-camu obtida no campo experimental de Embrapa

Na Figura 05 pode-se ver uma planta de camu-camu submetida ao habitat de terra firme do BAG de Embrapa com os frutos verdes. O campo experimental se encontra na Embrapa Amazônia Oriental CPATU, Belém, Pará.



Figura 05.- Foto do aspecto geral da planta em condições de terra firme no campo experimental da Embrapa.

Na Figura 06 podem-se ver as sementes de camu-camu, as quais são reniformes, aplanadas, cobertas de uma pilosidade branca e apresentam de uma a quatro sementes por fruto com peso médio de 8,4 g. (PINEDO *et al.*, 2002)



Figura 06.- Foto das sementes de camu-camu no campo experimental de Embrapa

1.1 – Distribuição Geográfica de camu-camu (*Myrciaria dubia*)

O camu-camu possui distribuição geográfica natural ampla: No Brasil desde o litoral Atlântico no Estado do Pará até a região pré Amazônica tocantiniana, até os estados de Mato Grosso e Rondônia, assim como nos rios Negro e Uatumã (VILLACHICA, 1996). Está sendo introduzido no estado de São Paulo, sendo cultivado na região de Bebedouro e no Vale da Ribeira (PINEDO. R, 2002). No Peru, o cultivo do Camu-camu passa pelo médio e alto rio Amazonas até a parte ocidental, próximo às Cordilheiras dos Andes. Na Venezuela, ao longo do rio Casiquiare e grande parte da alta e média bacia do rio Orinoco (VILLACHICA, 1996).

A maior concentração dos arbustos é encontrada no estado silvestre na Amazônia peruana, onde são encontradas grandes populações nativas quase mono específicas (PETERS & VASQUEZ, 1987), nas margens dos rios Nanay, afluente do rio Amazonas; e Supay, afluente do rio Ucayali baixo, entre as localidades de Pucallpa e Iquitos e no curso inferior do rio Marañon (MENDONZA *et al.*, 1989). A maior produção natural se concentra na região de Jenaro Herrera. (VILLACHICA, 1996).

1.2 –Habitat e Condições edafo-climáticas de camu-camu (*Myrciaria dubia*)

O Camu-camu é típico de bosque úmido tropical, caracterizado por temperaturas mínimas de 22°C, máxima de 32°C, média de 26°C, e precipitação pluvial aproximadamente entre 1600 e 4000 mm. A altitude adequada é inferior a 300 metros sobre o nível do mar (PINEDO *et al.*, 2001). Pode adaptar-se à terra firme da Amazônia central, onde o regime de chuvas favorece a floração e frutificação da espécie (ANDRADE *et al.*, 1991a). RIBEIRO (2002) avaliou o desempenho vegetativo de diferentes acessos de camu-camu cultivados em terra firme, obtendo como resultado uma boa adaptação com bom desenvolvimento da planta e com caracteres semelhantes a plantas de camu-camu silvestre; portanto pode ser cultivado em terra firme.

O arbusto no habitat natural frutifica entre os meses de novembro a março e quando cultivado em terra firme (condições edafo-climáticas de Belém), produz flores e frutos durante o ano inteiro, mas com menores produções nos meses de julho e agosto (RIBEIRO *et al.*, 2002).

As populações naturais nas margens dos rios amazônicos têm uma produção que varia de 3 até 25 kg de frutos por planta. Em terra firme RIBEIRO (2002) obteve até 6 Kg de frutos frescos por planta / safra, o que é equivalente a 6,7 toneladas de frutos frescos por hectare / safra (RIBEIRO *et al.*, 2002).

1.3 - Composição Nutricional de camu-camu (*Myrciaria dubia*)

Frutos de camu-camu procedentes da região de Belém, Pará, possuem a porção comestível com rendimento médio de 60% do fruto, com 8,5 graus Brix, com pH entre 2,9 a 3,1 e o ácido ascórbico (vitamina C) variando de **2,4 a 3,0 g/100g** de mesocarpo. (RIBEIRO *et al.*, 2002).

Os Frutos de camu-camu procedentes de todas as regiões em geral mostram teor de vitamina C que varia amplamente entre **0,934 a 6,112 g/100g** de polpa (CALZADA BENZA, 1980.; ANDRADE *et al.*, 1991b.; YUYAMA *et al.*, 2001 e 2002), podendo ser superior à de acerola (1,79 g/100g de polpa), até então considerada como a fruta mais rica nessa vitamina (MATSUURA *et al.*, 1998). Frutos de camu-camu produzidos em Manaus, no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), possuem teores de vitamina C que variam entre **2,4 g a 3,0 g/100g** de polpa (ROQUE, 1994), entretanto o camu-camu produzido no estado de Paraná possui de **1,38 a 1,49 g/100g** (JUSTI *et al.*, 2000). Acessos de camu-camu, procedentes da região leste do estado de Roraima, nas margens do rio Urubu e do rio Maú (ambos afluentes do rio Tacutu) possuem vitamina C **5734 ± 236,1 mg/100g** no fruto inteiro e **3571 ± 12,0 mg/100g** só na polpa, e nos frutos coletados de uma única planta individual no rio Urubu apresentaram um conteúdo de **6112 ± 137,5 mg/100g** só na polpa (YUYAMA, 2002).

ROCA, (1965) encontrou que frutos de camu-camu em Peru possuíam 2,94 g/100g de vitamina C no fruto inteiro e que 7% deste total de vitamina C (0,214 g/100g) era representado pelo ácido deidroascórbico e 93% (2,78 g/100g) pelo ácido ascórbico.

A ampla variação do teor de vitamina C entre as diferentes populações se deve em grande parte às diferenças genéticas. Este fato foi observado por meio de isoenzimas, entre populações de camu-camu oriundas de Iquitos (Peru), Uatumã (Amazonas) e de Boa Vista (Roraima). (TEIXEIRA *et al.*, 2004).

O fruto de camu-camu é uma fonte potencial de fibra alimentar total, insolúvel e solúvel, atingindo uma concentração média de 2,88 g/100g (YUYAMA *et al.*, 2002). Os teores de proteínas descritos na literatura, variam entre 0,4 g a 0,89 g, os de carboidratos entre 3,5 g a 4,7g em 100g de polpa (ROCA, 1965.; ANDRADE, 1991b.; JUSTI *et al.*, 2000).

No que concerne aos elementos minerais os frutos de camu-camu podem suprir a ingestão adequada de elementos minerais (YUYAMA *et al.*, 2004). As concentrações de potássio se encontram elevadas variando de $144,1 \pm 0,8$ mg/100g. Cálcio $10,6 \pm 0,5$ mg/100g. A concentração de sódio é baixa $90,7 \pm 16,5$ µg/100g. O zinco é de $472,0 \pm 8,3$ µg/100g. O ferro é de $664,6 \pm 121,7$ µg/100g. Sendo assim, o cálcio, mineral considerado limitante nas dietas de pré-escolares (YUYAMA *et al.*, 1999 in YUYAMA *et al.*, 2004) e de adultos (YUYAMA *et al.*, 1995 in YUYAMA *et al.*, 2004), que está presente nos frutos de camu-camu pode servir na diversificação de fontes alimentícias deste micronutriente.

JUSTI *et al.*, (2000) encontrou alto conteúdo de potássio em camu-camu (838,8 mg/Kg), sendo superior ao encontrado em acerola por VISENTAINER *et al.*, 1997.

O estágio de maturação parece não interferir no teor de vitamina C. JUSTI *et al.*, (2000), investigando o teor de ácido ascórbico por titulometria em camu-camu, procedentes do estado de Paraná, cultivado no Instituto Agrônômico IAPAR, estação

experimental de Morretes Paraná, em três estágios de maturação (imaturos, prematuros e maduros), encontraram valores médios de $1,49 \pm 0,03$ g/100g, $1,40 \pm 0,04$ g/100g e $1,38 \pm 0,01$ g/100g, respectivamente.

A Tabela 01 apresenta o conteúdo de vitamina C, determinado pelo método Cromatográfico CLAE com coluna de troca iônica em matrizes tropicais. Pode-se ver que o camu-camu tem duas vezes maior teor de vitamina C que a acerola e muito maior teor que os outros frutos.

Tabela 01.- Conteúdo de ácido ascórbico em matrizes vegetais maduras

Matriz da amostra	Teor de vitamina C (mg/100g)
Suco de Abacaxi ^a	51,18
Tomate ^a	21,03
Limão	44
Goiaba	60
Batata ^a	39,82
Mandioca ^a	85,33
Acerola ^b	1300
Camu-camu ^b	2780

Fonte: SANTOS DA ROSA, 2005^a e Boletim C & T, 2001^b.

Quanto ao teor de antocianinas e carotenóides em duas regiões de São Paulo: Iguape e Mirandópolis, ZANATTA (2005) relatou que os frutos de Mirandópolis apresentaram maior teor de carotenóides totais $1096 \pm 198,0$ µg/100g em relação aos frutos produzidos em Iguape $363,4 \pm 217,4$ µg/100g. A all-trans-luteína, o principal

carotenóide presente nos frutos, apresentou concentrações de $160,5 \pm 93,1 \mu\text{g}/100\text{g}$ (44,2% do total de carotenóides nos frutos de Iguape) e $601,9 \pm 75,6 \mu\text{g}/100\text{g}$ (54,9% do total de carotenóides nos frutos de Mirandópolis). O teor de β -caroteno encontrado foi de $72,8 \pm 60,9 \mu\text{g}/100\text{g}$ (20% do total de carotenóides nos frutos de Iguape) e $142,3 \pm 19,4 \mu\text{g}/100\text{g}$ (13% do total de carotenóides nos frutos de Mirandópolis). O restante, violaxantina + luteoxantina 27% nos frutos de Iguape e 31% nos frutos de Mirandópolis. O extrato bruto de antocianinas nos frutos de camu-camu revelou cianidina-3-glucosídeo e delphinidina-3-glucosídeo e novamente os frutos de Iguape apresentaram maior teor de antocianinas totais ($56,4 \pm 26,7 \text{ mg}/100\text{g}$) em relação aos frutos de Mirandópolis ($30,1 \pm 5,5 \text{ mg}/100\text{g}$). O autor concluiu que o elevado teor de antocianinas totais nos frutos de camu-camu, oriundos da região de Iguape pode ser devido às baixas temperaturas (ZANATTA, 2005).

1.4 - Potencial agro industrial de camu-camu

O camu-camu é considerado um Tesouro Amazônico, por ser uma cultura com alto potencial sócio-econômico e nutricional para a região, pois, além de melhorar a dieta da população, também contribui para o aumento da renda das comunidades nativas. É uma excelente alternativa econômica e ecológica por não envolver altos custos de produção no cultivo e pelo fato de os frutos possuírem as sementes necessárias para novas produções da população (PETERS *et al.*, 1987), podendo tornar-se uma fonte de renda para os agricultores da região Amazônica, gerando ocupação permanente ao campesino, ribeirinho, pescador e agricultor sazonal.

O recurso é apreciado especialmente nos mercados internacionais pelo seu alto conteúdo de ácido ascórbico. O Peru exporta camu-camu em forma de polpa congelada, mas em quantidades que não cobrem ainda a demanda dos mercados internacionais. Desde 1978, a indústria peruana realiza pesquisas nos frutos para o desenvolvimento agrícola, visando a exportação da polpa congelada. Nos últimos anos, no Brasil, a polpa de camu-camu vem sendo disponibilizada no mercado da região do norte do país (SOUZA FILHO, M *et al.*, 2002).

Os frutos de camu-camu são úteis na elaboração de sucos, bebidas, sorvetes, geléias, xarope, licor, conservante e corante naturais para a indústria de alimentos e na elaboração de polpas do fruto em formas liofilizada e congelada. Na indústria farmacológica e de cosméticos são úteis na fabricação de sabão, xampus e comprimidos concentrados de vitamina C natural (WHITMAN, 1974). No entanto, devido a sua elevada acidez, dificilmente são consumidos *in natura*. Desta forma é importante que as instituições de pesquisa realizem seleção genética de plantas de camu-camu com maior teor de ácido ascórbico e/ou produtividade, o que possibilitará o surgimento de agroindústrias e bioindústrias, que por sua vez podem gerar mais emprego e desenvolvimento da fruticultura regional e maior economia para a região e o país, aumentando a renda e qualidade de vida dos produtores rurais. (SOUZA FILHO *et al.*, 2002).

1.5 - Banco Ativo de Germoplasma BAG de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) da Embrapa

Instituições de pesquisa brasileiras e peruanas vêm desenvolvendo pesquisas sobre a domesticação de *Myrciaria dubia* através de programas de melhoramento genético para o cultivo em terra firme (CLEMENT *et al.*, 1982.; COUTURIER *et al.*, 2002.; RIBEIRO *et al.*, 2002.; YUYAMA *et al.*, 2001). A frutificação das plantas de camucamuzeiro em seu habitat natural ocorre entre os meses de novembro a março, sendo que, quando cultivados em terra firme, no Banco Ativo de Germoplasma (BAG), nas condições edafo-climáticas de Belém, têm demonstrado uma boa adaptação, com bom desenvolvimento da planta, florindo praticamente o ano inteiro, com extensão na produção durante o ano todo, mas com menores índices de produção nos meses de julho e agosto (CORRÊA *et al.*, in RIBEIRO, 2001).

Uma parte dos acessos de camucamuzeiro do BAG de *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh da Embrapa é oriunda de coletas realizadas em populações naturais da microrregião de Alto Solimões, no Estado do Amazonas, nos Municípios de Atalaia do Norte e São Paulo de Oliveira. Nove coletas procedem do local do rio Javari e seis do rio Jandiatuba, dando um total de 15 populações. Os rios Javari e Jandiatuba são afluentes da margem direita do rio Solimões.

A coleta das sementes dos frutos que formam o BAG de EMBRAPA foi efetuada no momento em que os frutos estavam no início de maturação. Em cada ponto foram coletadas amostras aleatoriamente de frutos de plantas representativas das populações. As amostras receberam códigos alfanuméricos, compostos de nome

abreviado do centro de pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (CPATU), posteriormente Solimões, em homenagem ao local de coleta, além de um número seqüencial de quatro dígitos (RIBEIRO, 2001).

Atualmente, as coletas são cultivadas e conservadas em campo em condições de terra firme na base física da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém do Pará. A área onde está localizado o BAG de *Myrciaria dubia* de Embrapa (1°28' S e 48°29' W) se caracteriza por ter um solo com pH ácido de baixa fertilidade e é uma região que apresenta precipitações anuais variando de 1.700 a 3.000 mm. O clima se caracteriza como tropical quente e úmido, onde a temperatura média oscila entre 22 °C a 28 °C, suportando temperaturas mínimas e máximas em torno de 17 °C e 35 °C e com umidade relativa (UR) de 70% até 95%. (RIBEIRO, S. I. 2001. Comunicação Embrapa Amazônia Oriental).

A Figura 07 apresenta o mapa onde se pode ver o lugar de origem dos frutos de camu-camu, onde foram realizadas colheitas para formar o BAG de camu-camu (*Myrciaria dubia*) de Embrapa, nas margens do rio Solimões (bacia do rio Amazonas).



Figura 07.- Bacia Amazônica, onde se observa o rio Solimões.

Fonte: WILKIPEDIA 2007

Perto da cidade de Manaus, o Rio Solimões e o Rio Negro se unem para formar o rio Amazonas. (WILKIPEDIA, 2007)

1.6 - Desenvolvimento e maturação dos frutos de camu-camu

O conhecimento do estágio de maturação dos frutos é importante para realização de colheitas no momento certo, pois frutos colhidos imaturos apresentam amadurecimento irregular e frutos muito maduros apresentam maior susceptibilidade ao apodrecimento,

apresentando em consequência qualidade inferior. (FANTÁSTICO, 1975 in ANDRADE, 1991a). Colheita no tempo ideal favorece também o prolongamento do tempo de vida do fruto com características desejáveis.

O camu-camu é um fruto não climatérico (PINEDO, 2002), ou seja, o fruto não faz a transição entre o desenvolvimento e senescência, portanto não passa pelas mudanças bioquímicas que produzem autocatálise de etileno que origina o amadurecimento do fruto (ANDRADE, 1991b). Desta forma, quando é colhido verde não consegue alcançar sua maturidade total.

Devido à falta de sincronia na frutificação dos frutos de camu-camu é sugerido levar em consideração a coloração do fruto para determinar os estágios de maturação, observando a coloração que surge na casca (ANDRADE, 1991b). As cores variam de vermelho ou róseo a roxo escuro, no estágio final de maturação.

Nesse estudo, foram considerados os seguintes conceitos sobre estágio de maturação e desenvolvimento dos frutos:

Desenvolvimento: Períodos em que novos tecidos são formados por divisão e expansão das células ocorrendo mudanças químicas. O desenvolvimento compreende os estágios de pré-maturação e maturação. A duração deste período é variável, dependendo de muitos fatores do cultivo.

Pré-maturação: Período de desenvolvimento em que ocorre uma expansão celular extensiva e um conseqüente aumento de volume. Abrange geralmente a metade do intervalo entre a floração e a colheita. O tempo que dura este período é variável, dependendo de muitos fatores do cultivo.

Maturação: Período de desenvolvimento em que o fruto atinge pleno crescimento e máxima qualidade comestível. Este período ocorre com o fruto ainda ligado à planta.

Amadurecimento: É o período terminal da maturação, durante o qual o fruto desenvolve completamente a aparência e qualidades sensoriais. Ocorrem principalmente mudanças químicas: na atividade do sistema enzimático como a inibição de enzimas pré-formadas, quebra de clorofila e a formação de carotenóides e antocianinas, hidrólise de amido e inter conversão de açúcares, síntese de aromáticos voláteis; alterações fisiológicas como mudanças na permeabilidade de membranas. Este período pode ocorrer tanto antes como após a colheita.

O início de amadurecimento é controlado geneticamente, mas está sujeito a mudanças por atuação de fito-hormônio, temperatura e condições climáticas.

Senescência Período em que o crescimento do fruto cessou e os processos bioquímicos de envelhecimento substituem as mudanças químicas do amadurecimento, com reações bioquímicas tendendo para o catabolismo dentro de um curto período de tempo. A senescência pode ocorrer tanto antes como após a colheita. (ANDRADE, 1991b)

O período ideal de colheita é determinado através de curvas de maturação, para confecção destas, é preciso acompanhar as mudanças na composição dos frutos durante a maturação; mediante análises físico químicos (ANDRADE, 1991b). Daí a importância de caracterização do teor de vitamina C em diferentes estágios de maturação para estabelecer o tempo ideal de colheita.

2 - Vitamina C

2.1.- Vitamina C e sua Estrutura

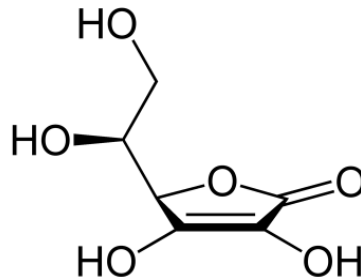


Figura 08.- Estrutura química do ácido ascórbico (vitamina C)

A estrutura química do ácido ascórbico assemelha-se a de um monossacarídeo, apresentando extraordinário poder redutor devido a sua configuração dienólica $C(OH)=C(OH)$, redutona ou enediol. (MURRAY *et al.*, 1993).

Vitamina C é um termo genérico para os compostos que exibem atividade biológica de ácido ascórbico (AA), possui duas formas: a principal forma biologicamente ativa é o L-ácido ascórbico, a forma oxidada L-Ácido deidroascórbico (DHA), um produto de oxidação que também exibe atividade biológica e pode facilmente ser convertido em ácido ascórbico. A oxidação ocorre facilmente. (MURRAY *et al.*, 1993).

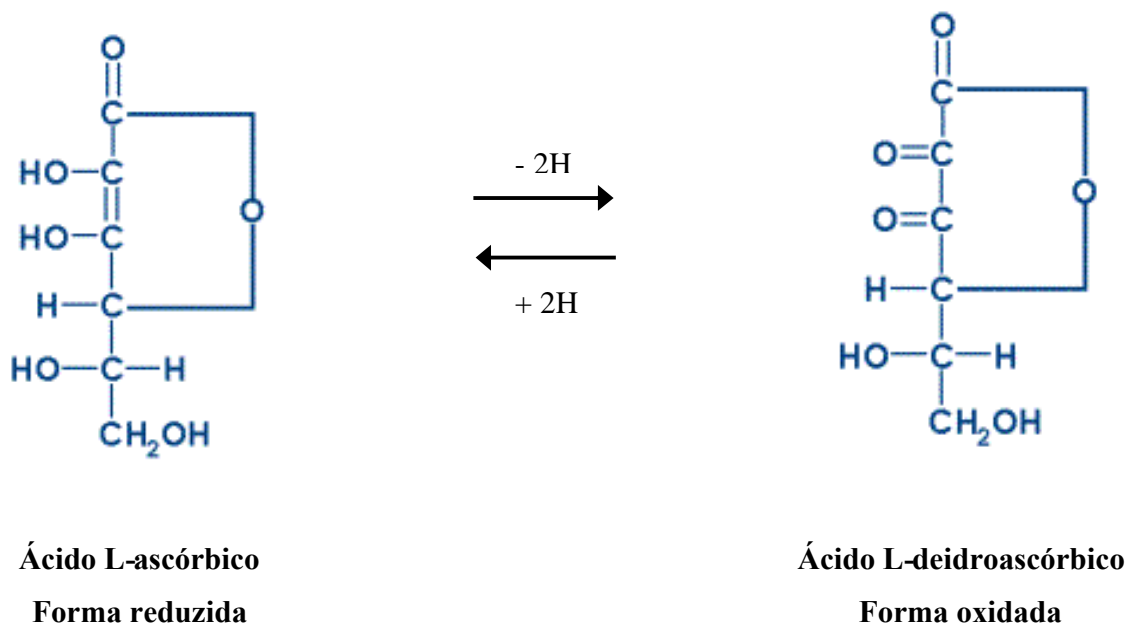


Figura 09.- Estrutura do Ácido L-ascórbico e Ácido L-deidroascórbico.

2.2.- Funções da Vitamina C, metabolismo, absorção e depósito de vitamina C no organismo do ser vivo.

A vitamina C é muito importante na nutrição humana e animal (VANDAMME 1992), participando na formação de colágeno e mucopolissacarídeos, dos quais depende a integridade de todos os tecidos fibrosos que formam a pele, tecido conjuntivo, dentina, matriz óssea, vasos sanguíneos, cartilagens e tendões. A vitamina C também é necessária, junto com o O_2 e o Fe^{+2} , para formar hidroxiprolina e hidroxilisina (componentes do colágeno); por isso ela intervém na cicatrização de feridas e fraturas (MURRAY *et al.*, 1993).

A Vitamina C também cumpre uma função importante no sistema imunológico, ajudando na luta contra infecções e contra células cancerosas. A estimulação dos

leucócitos, de anticorpos, neutrófilos e fagócitos é obtida pela suplementação com vitamina C. A vitamina C estimula a produção de interferón e reduz o processo da reação inflamatória, ajudando a integridade das mucosas, devido ao fato dessa vitamina influenciar positivamente nos níveis plasmáticos de Ig A (anticorpo presente principalmente na boca). A vitamina C também influencia nos teores de Ig M (atua na primeira resposta aos antígenos e ativa partes adicionais do sistema imune) e o de complemento 3 (C3) (ativado por imunoglobulinas que é uns dos mais importantes complementos na destruição de antígenos), dando um reforço no sistema imunológico (GLASSER *et al.*, 2000). Um estudo realizado em 2000 mostrou que a vitamina C previne resfriados durante a temporada de inverno, por que no frio os níveis de imunoglobulinas descem e a vitamina C, como suplemento, atua elevando-os (GLASSER *et al.*, 2000).

O efeito anticarcinogênico da vitamina C é devido a sua ação antioxidante e ao fortalecimento do sistema imunológico, que promovem a redução dos riscos de câncer e por destruir as células pré-cancerosas, pois as células pré-cancerosas e cancerosas são reconhecidas como invasoras, sendo assim destruídas pelas células imunes, especialmente, as *natural killer* e as secreções destas, as citocinas (GLASSER *et al.*, 2000). No tratamento de câncer de pele, a vitamina C atua com o estímulo da formação do colágeno com a inibição de vírus oncogênico e com o realce no efeito de determinadas drogas usadas em quimioterapia e com a neutralização de substâncias carcinogênicas (BSOUL, 2004). Na inibição de nitrosaminas (substâncias carcinogênicas que se formam a partir de nitritos e nitratos usados como conservantes na tecnologia de alimentos), também a vitamina C atua inibindo sua formação, sendo

assim recomendada a adição de vitamina C em produtos industrializados que contêm nitritos e nitratos (RODRÍGUEZ, 2006).

Além disso, LEON, S & ZANINOVIC (1993) relataram que a vitamina C pode inibir a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) de tumores e reduzir a produção de vírus por interferir na interação célula / vírus, pois a vitamina C exerce um papel protetor durante a resposta imune. Outros pesquisadores têm relatado que a vitamina C pode contribuir com alguma melhoria imunológica em pessoas infectadas com HIV (ARANHA *et al.*, 2000). Um recente trabalho concluiu que uma alimentação rica em vegetais e frutas, fontes de vitamina C como frutas cítricas e de vitamina E, como o abacate, em homens saudáveis e não fumantes, mostrou-se importante na redução de processos inflamatórios, indicados pela redução da proteína C-reativa no plasma, embora não melhorou a função imunológica dos mesmos (WALTZ, 2005). A vitamina C participa melhorando a resistência física do organismo, assim como também fortalece o sistema nervoso, estimula os sistemas cardíaco, circulatório e respiratório. Promove a desintoxicação do corpo e em especial do fígado, além de ter a capacidade de reduzir os níveis de chumbo no sangue. O ácido ascórbico, quando é suplementado em gestantes a partir da vigésima semana, evita a ruptura da bolsa e conseqüentemente o parto prematuro (HARK, 1998). A vitamina C exerce um papel de neuroproteção no cérebro, sendo importante na síntese de neurotransmissores como dopamina, norepinefrina e serotonina. A norepinefrina e serotonina têm sido vinculadas ao controle direto de sentimentos de ansiedade e depressão. A dopamina está implicada diretamente na síntese de norepinefrina no sistema nervoso central. A vitamina C atua na conversão do aminoácido L-tirosina a dopamina, e esta é convertida a norepinefrina com ajuda de cofatores como a Vitamina

B6. Adicionalmente a vitamina C, como antioxidante, se opõe à produção dos radicais de oxigênio que tendem a aumentar durante a tensão emocional e física, assim como durante a infecção a vitamina C está também envolvida no controle e movimento, formação de resposta emocional e na percepção de dor e ao prazer (RICE, 2000). A vitamina C é essencialmente requerida como um cofator ou como coenzima para muitas enzimas essenciais nos processos fisiológicos do corpo humano, animal e de plantas e é também precursora da síntese de oxalato e tartarato. Tem um papel de grande importância no metabolismo pela capacidade de captar e liberar hidrogênio nas reações de oxido-redução (ARLIN, 1995).

Nas plantas a vitamina C participa em uma variedade de processos incluindo a fotossíntese, foto proteção, crescimento da parede celular e expansão celular, resistência a estresse ambiental e síntese de etileno, giberilinas, antocianinas e hidroxiprolina (SMIRNOFF & WHEELER, 2000).

Quanto à atividade biológica da vitamina C, na forma oxidada, o ácido deidroascórbico, também possui atividade fisiológica posto que no organismo este é reduzido formando o ácido ascórbico. Esta transformação do ácido ascórbico em ácido deidroascórbico ocorre normalmente no interior do organismo e é reversível, permitindo que uma dessas substâncias possa sempre ser transformada na outra e esta capacidade de transformação funcione como um sistema oxido redutor capaz de transportar hidrogênio nos processos de respiração, no nível celular (WELCH *et al.*, 1995).

A vitamina C é absorvida facilmente no intestino delgado, principalmente no duodeno, podendo ocorrer no jejuno e no íleo, que são porções distais do intestino delgado, sendo necessária a presença de sódio na luz intestinal. A vitamina passa então ao sangue por transporte ativo, sob a forma de um ânion livre, sendo transferida por difusão simples no interior dos leucócitos e dos eritrócitos. O ácido ascórbico plasmático filtrado é quase totalmente reabsorvido. A eficiência de absorção se dá por um mecanismo de saturação, ou seja, decresce quando se ingere grande quantidade da vitamina. Com a ingestão normal de 0,060 a 0,12 g, o organismo absorve 90% da vitamina C. A vitamina C pode ser armazenada pelo organismo em pequenas quantidades. Quando o *pool* de vitamina C que o ser humano possui em condições normais está saturado devido a ingestão em doses muito elevadas, uma alta porcentagem é eliminada pela urina, sob a forma do catabólito ácido oxálico ou em sua forma original. Mas, quando existe deficiência, a absorção é muito alta e não há eliminação pela urina (ARLIN, 1995). O nível de ácido ascórbico (ascorbato) no plasma em adultos humanos é de 30 a 100 $\mu\text{mol/l}$, o que pode ser mantido com uma absorção diária de 60 a 100 μg de vitamina C (HERMES, 2004). O ácido ascórbico pode ser encontrado em altas concentrações em vários tecidos, como por exemplo, o tecido supra-renal, fígado, baço e rins (ARANHA *et al.*, 2000).

As propriedades da vitamina C são importantes na prevenção de anemia, por que esta vitamina atua como fator promotor da absorção de ferro não heme (inorgânico), presente nos alimentos de origem vegetal: (LYNCH *et al.*, 1980), devido a vários fatores:

- Reduz o Fe^{+3} (que é pouco solúvel no intestino) ao Fe^{+2} , para que seja absorvido.

- A ingestão simultânea de ferro, vitamina C e/ou proteínas aumenta a absorção de ferro, formando quelatos de baixo peso molecular com ferro a pH ácido, mais solúvel e biodisponível; facilitando assim sua absorção intestinal no pH alcalino do lúmen intestinal.
- A vitamina C facilita a liberação do ferro da transferrina (proteína que transporta o ferro no sangue) e também da ferritina (principal proteína de armazenamento do ferro).
- O ácido ascórbico participa de modo importante da modulação de síntese de ferritina e, portanto no depósito de ferro. O mecanismo envolve a regulação de RNA mensageiro na síntese de ferritina pela proteína responsável de ferro (LYNCH *et al.*, 1980)
- A presença da vitamina C aumenta a absorção do ferro não-heme mesmo na presença de fatores inibidores (fitatos, polifenóis, fosfatos, oxalatos, carbonatos, fibra dietética e taninos) nas refeições (LYNCH *et al.*, 1980).

A absorção de ferro heme é relativamente independente da composição dos alimentos e pouco afetada por intensificadores ou inibidores que possam afetar esta absorção, embora outros componentes de alimentos sejam necessários para assegurar uma adequada absorção. Portanto a absorção de ferro heme é mais efetiva que ferro não heme (LYNCH *et al.*, 1980).

Em idosos a diminuída biodisponibilidade do ferro pode ser revertida através do consumo em conjunto com alimentos ricos em vitamina C, melhorando assim a absorção e aproveitamento do ferro, uma vez que a estabilidade e solubilidade do

complexo ascórbico-férrico são mantidas mesmo com alterações de valores de pH gástrico (ARANHA *et al.*, 2000)

Um estudo mostrou que crianças anêmicas e/ou com hipovitaminose, mediante o consumo de um copo de suco de acerola por 35 dias apresentaram melhora nos níveis séricos de vitamina C e aumento na concentração de hemoglobina em forma significativa, combatendo a anemia ferropriva (COSTA *et al.*, 2001).

Considerando uma dieta com 100% da recomendação diária de ferro e taxa de absorção de ferro de 10%, a quantidade de vitamina C necessária para conseguir o efeito de aumentar a taxa de absorção de ferro é estimada como 0,070 – 0,14 g/dia de vitamina C para crianças com menos de um ano de idade e cerca de 0,05 a 0,1 g/dia para crianças maiores de um ano (INSTITUTE OF MEDICINE, 2003).

A deficiência de vitamina C, que é a causa do escorbuto, se instala quando o valor sérico do ácido ascórbico é menor a 0,0002 g / 100 ml. Os sintomas são derivados da inadequada formação e manutenção dos tecidos e compostos intercelulares, ocorrendo hemorragias subcutâneas, gengivais e em outras áreas. Ocorre ainda anemia, debilidade muscular, deficiência na cicatrização de feridas, petéquias, osteoporose, amolecimento de dentes, perda do cabelo, pele seca pruriginosa e alterações neuróticas. A deficiência de vitamina C exerce ação sobre a mobilização das reservas de ferro do baço, mas não sobre suas reservas hepáticas. A suplementação de vitamina C acelera a mobilização do ferro (PORTELA, 1994).

Alguns autores têm evidenciado uma diminuição dos teores plasmáticos de vitamina C com a idade (RUSSEL & SUTER, 1993; GUILLAND & LEQUEU, 1995 in ARLIN,

1995) sendo resultado, na maioria dos casos, de uma reduzida ingestão de alimentos decorrentes de causas variadas (ASCIUTTI-MOURA *et al.*, 1993.; GUILLAND & LEQUEU, 1995 in ARANHA *et al.*, 2000).

A hipervitaminose C causa diarreia notável, provavelmente pela grande quantidade de água que passa para o interior do intestino. Pode causar também náuseas, vômitos, aumento da absorção do ferro e um problema potencial do rim e da bexiga, em razão do aumento de suas excreções. O catabólito de excreção ácido oxálico em excesso pode provocar litíase oxálica (GUILLAND, 1992 in ARANHA. *et al.*, 2000).

Um estudo mostrou que idosos com idade entre 60 e 93 anos e hipovitaminose C que receberam durante um mês vitamina C, através de suplemento de suco de acerola ou suplemento em fármaco de 0,5 g, após vinte dias de tratamento, já tinham corrigido o quadro de hipovitaminose e normalizado os níveis séricos de vitamina C. Aqueles que receberam o suco tiveram a absorção da vitamina C de forma mais eficiente, possivelmente devido aos flavonóides presentes na fruta de acerola (ARANHA *et al.*, 2004).

2.3.- Dose Recomendada de Ingestão de vitamina C

A RDA, definida como o nível de ingestão diário dietético de um nutriente para um indivíduo é baseado na quantidade suficiente para cobrir a exigência nutritiva de quase todos os indivíduos (97%) de uma população sadia. O AI é definido como a quantidade

dietética adequada de ingestão diária de um nutriente (MARCHIONI, D. M. L *et al.*, 2004).

O AI de vitamina C para bebês de 0 a 6 meses é de 40 mg/dia e para os de 7 a 12 meses de 50 mg/dia. A RDA de vitamina C para crianças de 1 a 3 anos é de 15 mg/dia e para as de 4 a 7 anos de 25 mg/dia. A RDA para homens e mulheres de 9 a 13 anos é de 45 mg/dia. Para adolescentes homens de 14 a 18 anos é de 75 mg/dia e para mulheres com esta idade de 65 mg/dia. Para homens de 19 a 70 anos é de 90 mg/dia e para mulheres com esta idade de 75 mg/dia. Para mulheres grávidas a RDA de vitamina C é de 80 a 85 mg/dia e para lactantes é de 15 a 120 mg/dia. (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, 2004).

Para prevenir o escorbuto é recomendada a ingestão de 46 mg/dia em homens e mulheres não fumantes. Em condições de estresse como com o consumo de cigarro e álcool, quando a absorção de vitamina C é afetada, a RDA aumenta de 60 a 120 mg/dia. Esta dieta diminui o risco de doenças crônicas como o câncer, doença cardiovascular e catarata pela ação antioxidante desta vitamina. (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, 2004).

A Vitamina C é hidrossolúvel e é armazenada pelo corpo em pequenas quantidades; portanto, deve ser consumida diariamente para manter em forma ótima o *pool* corporal desta vitamina (CARR, 1999).

Em humanos, vários fatores podem regular a biodisponibilidade do ácido ascórbico para os tecidos: O consumo dietético desta vitamina, sua ligação a uma proteína no soro ou no plasma, e a forma em que esta se encontra (DHARIWAL *et al.*, 1991).

2.4.- Biossíntese de Vitamina C

A biossíntese do ácido ascórbico se dá a partir de D-glicose e é uma via complexa constituída de nove etapas. Em plantas, a rota biossintética divide-se em dois ramos: A rota do ácido galacturônico e a rota myo-inositol. (Figura 10 e 11). Em animais (etapas 2 a 9 da figura 10) o intermediário final da síntese é o L-gulono 1,4-lactona, enquanto nas plantas o L-galactono 1,4-lactona. O processo de biossíntese de ácido ascórbico em plantas não está completamente estabelecido e pouco se conhece sobre sua regulação, sobre os fatores genéticos e ambientais que afetam a variação dos níveis de ácido ascórbico nas frutas, assim como o que regula a concentração de vitamina C nos diferentes tecidos vegetais. VIOLA *et al.*, (2003) relataram que a síntese de vitamina C se produz dentro do floema do vegetal e se acumula em órgãos de armazenamento. A biossíntese em animais foi elucidada desde os anos 60 (DAVEY *et al.*, 2000), a descrição se encontra na figura 10, nas etapas de 2 a 9.

Os seres humanos e outros primatas, alguns pássaros e alguns peixes têm perdido a capacidade de sintetizar a vitamina C, como consequência de uma mutação na codificação do gene para o L-gulonolactone oxidase (GLO), a enzima requerida na biossíntese da vitamina C na via do ácido glucurônico (WOODALL & AMES, 1997). Entretanto a maioria dos mamíferos não primatas tem a capacidade de síntese de ácido ascórbico, pois possuem um mecanismo de retorno, através do qual o fígado aumenta a síntese de ácido ascórbico em resposta a um estresse fisiológico (STONE, 1984). Frente a este fato, o interesse pelo aumento do teor de vitamina C em alimentos tem sido observado nos trabalhos realizados em batatas e tomates, principais vegetais

consumidos nos Estados Unidos, visando ao enriquecimento nutricional destes vegetais, levando assim a um suprimento mais direto e natural da Vitamina C (FRUSCIANTE *et al.*, 2000).

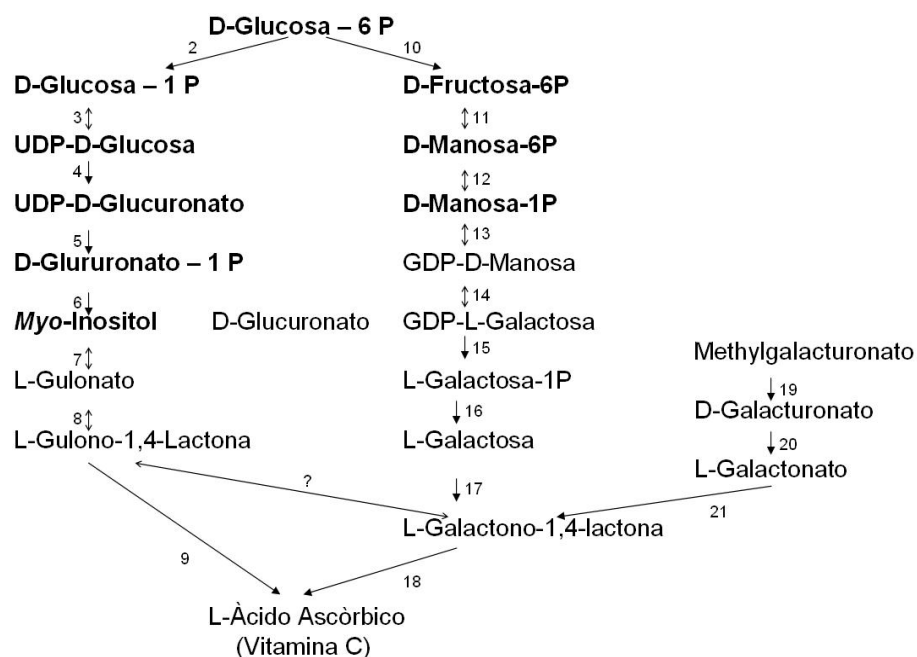


Figura 10.- Rota de Biossíntese do ácido L-ascórbico em plantas (reações 10–18). **Em animais** (reações 2–9). Enzimas que catalisam as reações: 1. *myo*-inositol oxygenase; 2, phosphoglucomutase; 3, UDP-glucose pyrophosphorylase; 4, UDP-glucose dehydrogenase; 5, glucuronate-1-phosphate uridyltransferase; 6, glucuronokinase; 7, glucuronate reductase; 8, aldonolactonase; 9, gulono-1,4- lactone dehydrogenase; 10, glucose-6-phosphate isomerase; 11, mannose-6-phosphate isomerase; 12, phosphomannomutase; 13, GDP-mannose pyrophosphorylase; 14, GDP-mannose-3,5-epimerase; 15, phosphodiesterase; 16, sugar phosphatase; 17, L-galactose-1-dehydrogenase; 18, L-galactono-1,4- lactone dehydrogenase; 19, methyl-esterase; 20, D-galacturonate reductase; 21, aldono-lactonase. Reação reversível com dupla terminação.

Fonte: NESSLER *et al.*, 2003.

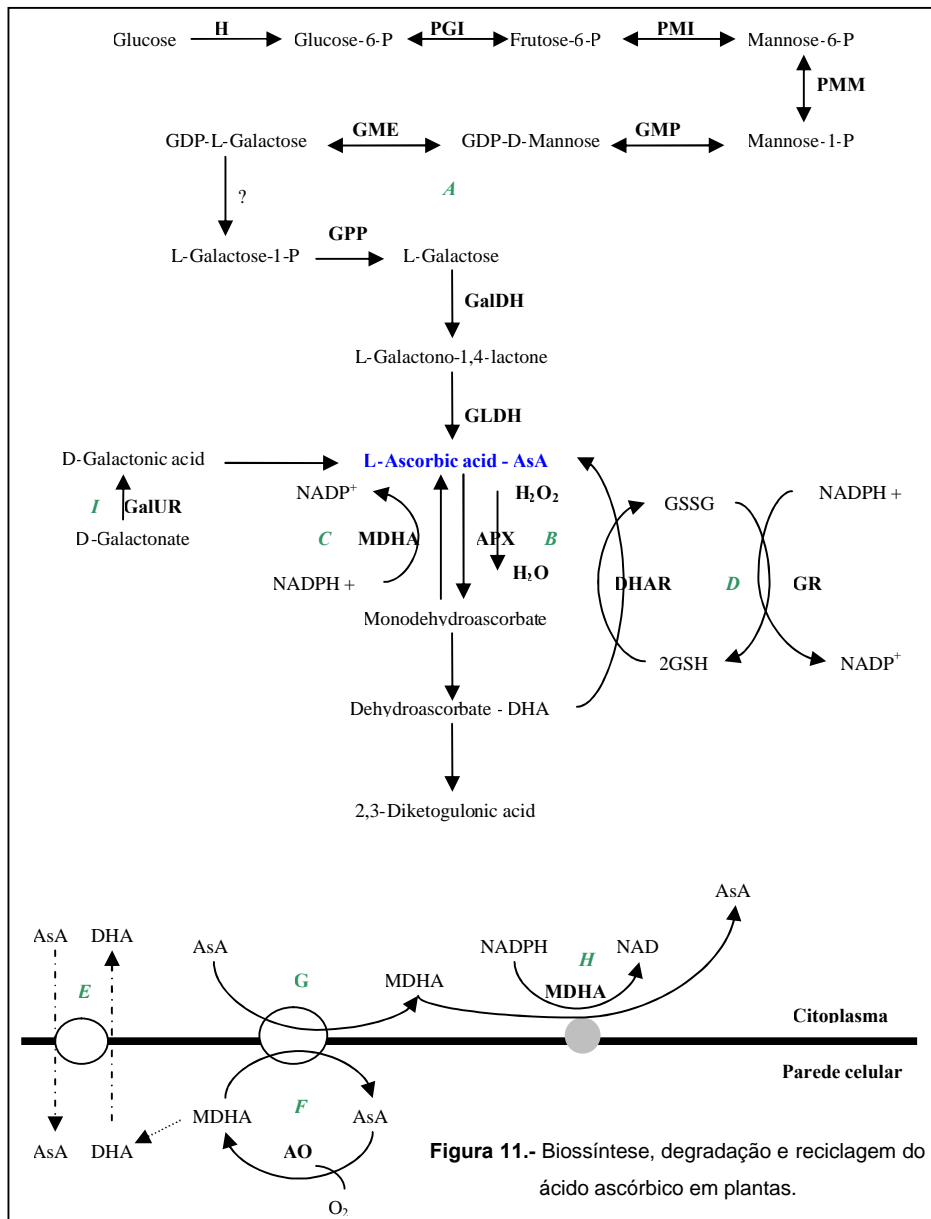


Figura 11.- A) Biossíntese. B) Redução do peróxido de hidrogênio pelo ascorbato, catalisado pela ascorbato peroxidase citosólica (cAPX); C) O produto da oxidação, radical monodehidroascorbato (MDHA) é reduzido a ascorbato pela MDHA redutase dependente de NADP; D) DHA é reduzido a ascorbato pela dehidroascorbato redutase (DHAR) dependente de glutathiona (GSH), que é regenerada de sua forma oxidada GSSG pela glutathiona redutase (GR) a GSH; E) O AsA é transportado através da parede celular facilitada por difusão via um transportador de membrana plasmática na troca por DHA; F) Ascorbato oxidase (AO) é uma glicoproteína secretada que catalisa a oxidação do ascorbato na parede celular vegetal; G) O MDHA resultante é provavelmente reduzido pelo sistema citocromo b da membrana plasmática (7); H) Uma MDHAR ligada à membrana plasmática regenera o ascorbato no lado citosólico. Fonte: SILVA, 2006.

2.5.- Função antioxidante da Vitamina C

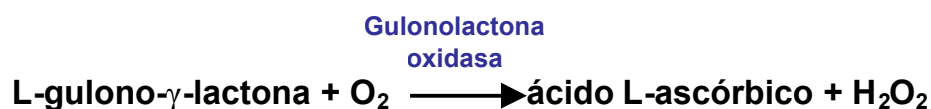
Um sistema poderoso de defesa antioxidante, proveniente da dieta é composto pela vitamina C, vitamina E (α -tocopherol), β -Caroteno, vitamina A e flavonóides. Estes compostos interceptam os radicais livres gerados pelo metabolismo e/ou por fontes exógenas, impedindo a oxidação dos aminoácidos e das proteínas e das bases do DNA; cuja condição geraria a formação de lesões e perda da integridade celular (BIANCHI & ANTUNES 1999). O ascorbato é a primeira linha de defesa antioxidante do plasma (KRELING, 2005).

O estresse oxidativo é definido como perda da homeostase entre a produção de radicais livres e de antioxidantes, por que ocorre um aumento da produção de radicais livres e uma deficiência de antioxidantes (BIANCHI & ANTUNES, 1999)

A vitamina C é um antioxidante não-enzimático e hidrossolúvel que intervém capturando radicais livres e oxigênio singlete. Também intervém regenerando a forma reduzida de vitamina E, uma vez que esta atuou como antioxidante. Atua na fase aquosa como um excelente antioxidante sobre os radicais livres, mas não é capaz de agir nos compartimentos lipofílicos para inibir a peroxidação lipídica, função que é cumprida pela vitamina E. A vitamina E é o principal antioxidante lipossolúvel, presente em todas as membranas celulares que previne a perda de fluidez da membrana, importante na função de proteção das células, inibindo a peroxidação lipídica.

A ação antioxidante diminui riscos em afecções oculares como a degeneração macular relacionada com a idade e catarata e outras doenças degenerativas (BIANCHI. & ANTUNES, 1999)

Ironicamente o aumento da síntese de ascorbato, também leva ao desenvolvimento de estresse oxidativo, por que se produz uma reação que gera a espécie reativa de oxigênio (ERO) H_2O_2 que é praticamente inócuo e, porém pode se difundir facilmente através das membranas celulares como, por ex., a membrana do núcleo (Reação abaixo) (BARREIROS *et al.*, 2006).



Reação de síntese de ácido L-ascórbico em plantas e ratos

Quando o ascorbato atua frente a um radical livre, o ascorbato se torna radicalar, gerando-se o radical ascorbil. A vantagem desta reação é que o radical gerado, o ascorbil radicalar, possui menor reatividade entre todas as moléculas radicalares, já que se encontra em ressonância estabilizada entre o ascorbato e o ácido deidroascórbico (figura 12).

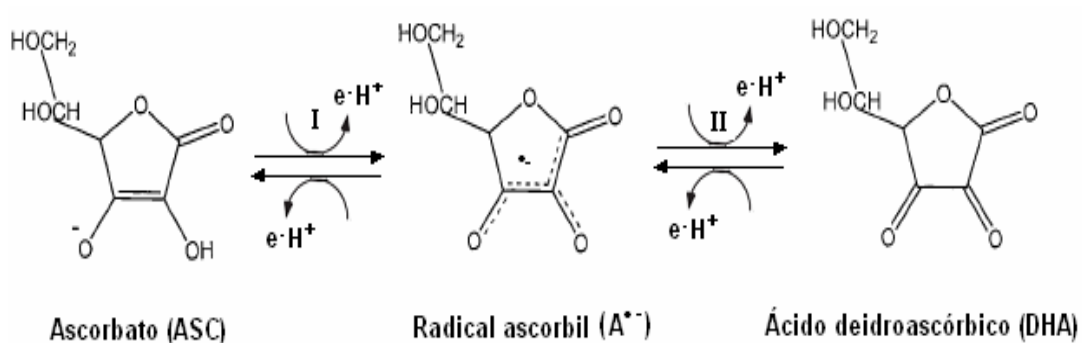


Figura 12.- Ressonância da molécula radicalar ascorbil.

Posteriormente o ascorbato é reciclado (Figura 13), e o ácido deidroascórbico é reduzido a ascorbato (ânion resultante, quando o ácido ascórbico está em solução) pela ação da enzima dehidroascorbato redutase e de um cofator, o tripeptídeo glutathiona na forma reduzida. Este passa à forma oxidada, produzindo o ascorbato. A reciclagem do ácido ascórbico pode ser também realizada pela enzima monodehidroascorbato redutase (MDHAR) (Figura 12), que converte o DHA em ácido ascórbico via transferência de elétrons do NADH (LISENBEE *et al.*, 2005).

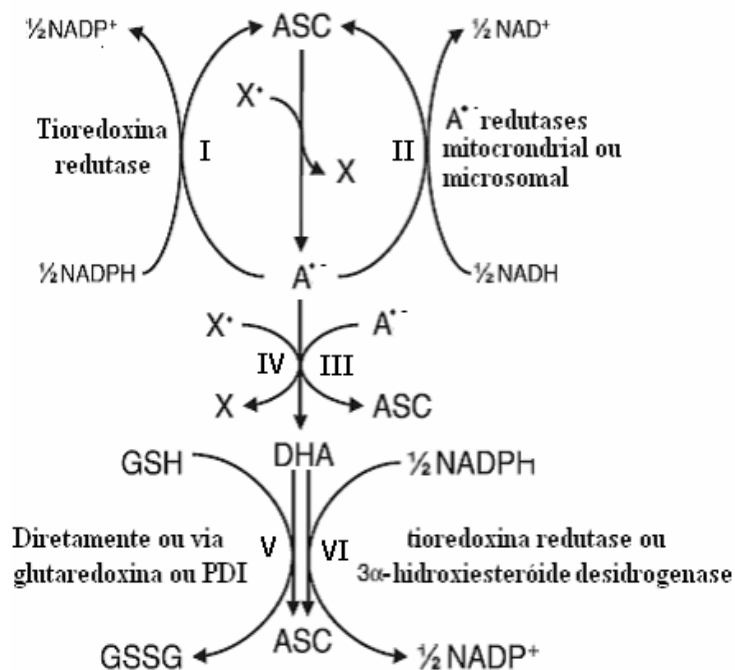


Figura 13.- Reações de reciclagem do Ascorbato

Onde:

A^{••} = Ascorbil **GSH** = Glutathiona forma reduzida,
ASC = Ascorbato **DHA** Ácido deidroascórbico,
GSSG = Glutathiona disulfido (forma oxidada da glutathiona)

Existe uma interação entre carotenóides, vitamina E, e ácido ascórbico (Figura 14), acontecendo uma reação em cascata. O carotenóide ao reagir com a vitamina E radicalar permite a recuperação desta molécula na forma não radicalar, produzindo o carotenóide na forma radicalar. Na segunda reação o carotenóide radicalar reage com ascorbato, recuperando o estado não radicalar, resultando um radical ascorbil. O radical ascorbil por ser um radical de baixa reatividade, exerce um reduzido efeito no organismo como o aumento do estresse oxidativo. Na figura 14b é mostrado que a vitamina C hidrossolúvel reciclada permite a conversão da Vitamina E radicalar a Vitamina E em estado normal (presente na membrana), dado que a vitamina E ao reagir com um radical livre se torna radicalar e a vitamina E radicalar reage logo com ascorbato, gerando assim radical ascorbil e recuperando a vitamina E em estado normal (não radicalar).

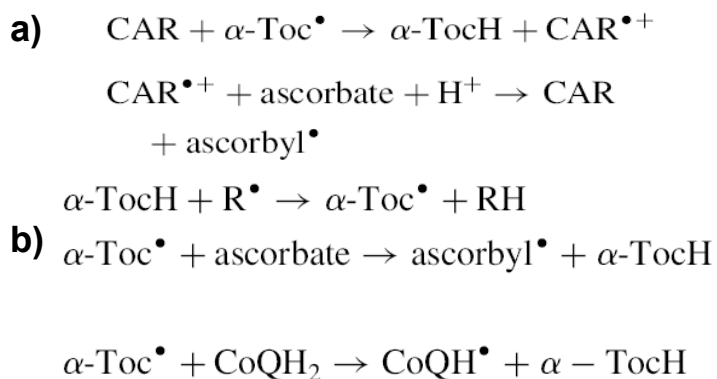


Figura 14.- Reações de Interação entre moléculas radicalares de carotenóides, vitamina E e ácido ascórbico

Fonte: HERMES, 2004.

Onde:

$\alpha\text{-Toc}^\bullet$ = Vitamina E radicalar

$\text{CAR}^{\bullet+}$ = Carotenóide radicalar

$\alpha\text{-TocH}$ = Vitamina E

CoQH_2 = Coenzima Q forma reduzida

A vitamina C tem uma ação pró oxidante: Estudos *in vitro* mostraram que esta vitamina, na presença de metais de transição, tais como o ferro, pode atuar como uma molécula pró-oxidante e gerar os elementos reativos de oxigênio, como a H_2O_2 e radical hidroxil OH^\bullet , uma vez que promove a redução de metais de transição como o ferro. Entretanto a disponibilidade desses metais, no organismo é limitada (BIANCHI *et al.*, 1999).

Um trabalho realizado por BENDICH (1993), mostrou um efeito positivo da suplementação com complexo de vitamina A, β -caroteno, vitamina C e vitamina E na prevenção e modulação das conseqüências patológicas resultantes da ação de radicais livres como a resposta imune com a destruição de células cancerosas, resposta imune aos efeitos imunossupresivos de fatores exógenos, como a exposição à radiação ultravioleta e ao uso de cigarro, que aumentam o risco de câncer. Este estudo é uma abertura na pesquisa da determinação de doses exatas e de protocolos de tratamento, para a ação destes agentes na sua prescrição com a finalidade antioxidante.

2.6.- Estudo do camu-camu como nutraceutico

Determinadas pesquisas realizadas por médicos norte-americanos constataram que a ingestão diária de 1,0 g de camu-camu liofilizado em pó e em jejum elimina todos os sintomas de depressão, ansiedade e alterações de humor (GONZAGA MOTA, 2003). Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2007), a ingestão diária recomendada (RDA) para vitamina C é de 15 a 25 mg para crianças entre 1 a 8 anos, respectivamente; de 45 a 75 mg para jovens entre 9 e 18 anos ,e de 75 a 90 mg para mulheres e homens respectivamente, o consumo diário de apenas um fruto de

camu-camu por dia (233,5 mg de vitamina C por frutos, Tabela 1), ultrapassaria essa recomendação tanto para crianças quanto para homens adultos. Na verdade, as frutas e vegetais, são excelentes fontes naturais de vitaminas antioxidantes (E e C) e β -caroteno. O camu-camu, além de apresentar altos níveis de vitamina C, apresenta ainda alto teor de flavonóides (ZANATTA, 2005) composto bioativo com ação antioxidante, podendo estar envolvido na proteção do organismo humano contra doenças cardiovascular e câncer (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002).

3.- Considerações sobre as metodologias para determinação de Vitamina C

Existem diversos métodos analíticos de quantificação dos teores de ácido ascórbico em alimentos, alguns deles mencionados na presente monografia. Na escolha do método mais adequado para a determinação de vitamina C nos alimentos se toma em consideração que a vitamina C é sensível à oxidação, frente aos fatores externos como: ar, luz, condições alcalinas e calor; sendo facilmente destruída em prolongados períodos de estocagem e processamento de alimentos. Devido a esta fácil degradação e oxidação, para a determinação dos teores de vitamina C em alimentos, em primeiro lugar a vitamina C deve ser estabilizada quando recém extraída da matriz vegetal para obter altos níveis de recuperação e reprodutibilidade destes teores. (SANTOS DA ROSA, 2005)

3.1 - Determinação do teor de ácido ascórbico por titulometria

Método de Tillman

O método titulométrico baseia-se na redução do corante 2,6-diclorofenol indofenol pela solução ácida do ácido ascórbico. O ácido ascórbico reage direta e quantitativamente com o titulante, que seria o corante, reduzindo-o e oxidando-se a ácido deidroascórbico. A reação efetuada em meio ácido é rápida e a mudança final é dada pelo próprio corante que, em meio ácido e uma vez oxidado todo pelo ácido ascórbico muda de coloração. O titulante, DFI – 2,6 dicloro fenol indofenol, age como indicador de pH e o ácido ascórbico pode ser determinado pela medida do excesso do reagente. Este método pode ser empregado em análises em grande escala. (GÜÇLU, K et al., 2004).

A desvantagem deste método é a interferência por parte de outras substâncias presentes na matriz analisada, que tenham também capacidade redutora como o ácido ascórbico. Entre os interferentes cabe mencionar: cisteína, taninos, fenóis, tiosulfato e os pigmentos presentes na matriz que influem na coloração da amostra, interferindo na determinação da concentração exata de vitamina C. (GÜÇLU, K et al., 2004).

3.2 - Determinação do teor de ácido ascórbico por espectrofotometria

Neste método inicialmente é feita a extração de interferentes que podem apresentar absorvância no mesmo comprimento de onda utilizado na determinação do teor de vitamina C, confundindo o teor exato de vitamina C. Esta metodologia é laboriosa, devido à extração dos interferentes, necessitando de longas horas, o que repercute na

oxidação e degradação da vitamina C da amostra a analisar. Para eliminar estes interferentes são utilizados diferentes reagentes como a dinitrofenilhidrazina, tiouréia, 2-6 diclorofenolindofenol (DCPIP), ácido metafosfórico, ácido sulfúrico. (GÜÇLU, K et al., 2004).

3.3 - Determinação de Vitamina C por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com coluna de Troca Iônica

Os métodos cromatográficos são os mais utilizados atualmente na determinação de ácido ascórbico, principalmente por sua inerente capacidade de separação de interferentes, não necessitando de preparos laboriosos que expõem a vitamina C a maiores probabilidades de degradação. A cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE é um análise com alta sensibilidade e rapidez, muito empregada para substâncias de baixo peso molecular.

O método de análise de quantificação CLAE com coluna de troca iônica separa a vitamina C por mecanismo de partição em fase reversa na superfície da resina da coluna, sendo esta separação modulada por íon. As substâncias interferentes na determinação de vitamina C se ionizam no pH da fase móvel e são separadas por exclusão iônica, processo facilitado pela carga fixa da resina. (ARSHOOR *et al.*, 1984 in SANTOS DA ROSA, 2005). A coluna por troca iônica é constituída de uma tubulação de aço inoxidável com faixa de comprimento de 10 a 30 cm e diâmetro interno de 4 a 10 mm. A fase estacionária desta utiliza resinas poliméricas com tamanho de partícula do recheio de 3,5 a 10 mm, que possui íons que são capazes de reter contra-íons. Estes

por sua vez são capazes de serem deslocados por íons presentes na amostra. Na extremidade da coluna está presente um grupo trocador de íons.

O ácido ascórbico é analisado pelo mecanismo de partição em fase reversa (onde a fase estacionária é apolar e a fase móvel é polar, a afinidade pela fase estacionária e conseqüentemente seu tempo de retenção na coluna é controlado pela polaridade da fase móvel) e não pelo mecanismo de troca iônica (a fase estacionária, normalmente uma resina, possui os grupos iônicos ligados e este por sua vez tem um contra íon com carga oposta), o contra íon pode ser deslocado pelos íons da fase móvel de carga similar a ele. Durante o processo de separação, ao pH da fase móvel, a molécula de vitamina C encontra-se sob a forma não ionizada porque a este pH a molécula de vitamina C não se ioniza e a partição acontece pelo mecanismo de fase reversa que evita que a vitamina C esteja quimicamente ligada à sílica da coluna. (JUPILLE *et al.*, 1981 in SANTOS DA ROSA, 2005).

Posteriormente a amostra passa por um detector, que é um dispositivo mecânico que identifica e registra a mudança de concentração na fase móvel efluente da coluna, a interpretação deste registro determina a concentração da amostra e seus constituintes. O transdutor converte a informação de concentração da amostra, que é de domínio não elétrico num sinal elétrico registrado por um sensor. O detector assim é capaz de medir os sinais elétricos, que são proporcionais ao índice de refração do soluto e da fase móvel, determinando a concentração da amostra. O detector tem que estar aliado ao tempo de retenção da amostra.

A vitamina C recém extraída da matriz vegetal precisa estar estabilizada, para obter altos níveis de recuperação e reprodutibilidade destes teores de vitamina C

(PENTEADO, 2003 in SANTOS DA ROSA, 2005), esta estabilização é dada no preparo da amostra, não necessitando de processos laboriosos.

A Figura 15 mostra o cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) com coluna de troca iônica empregado no presente trabalho.

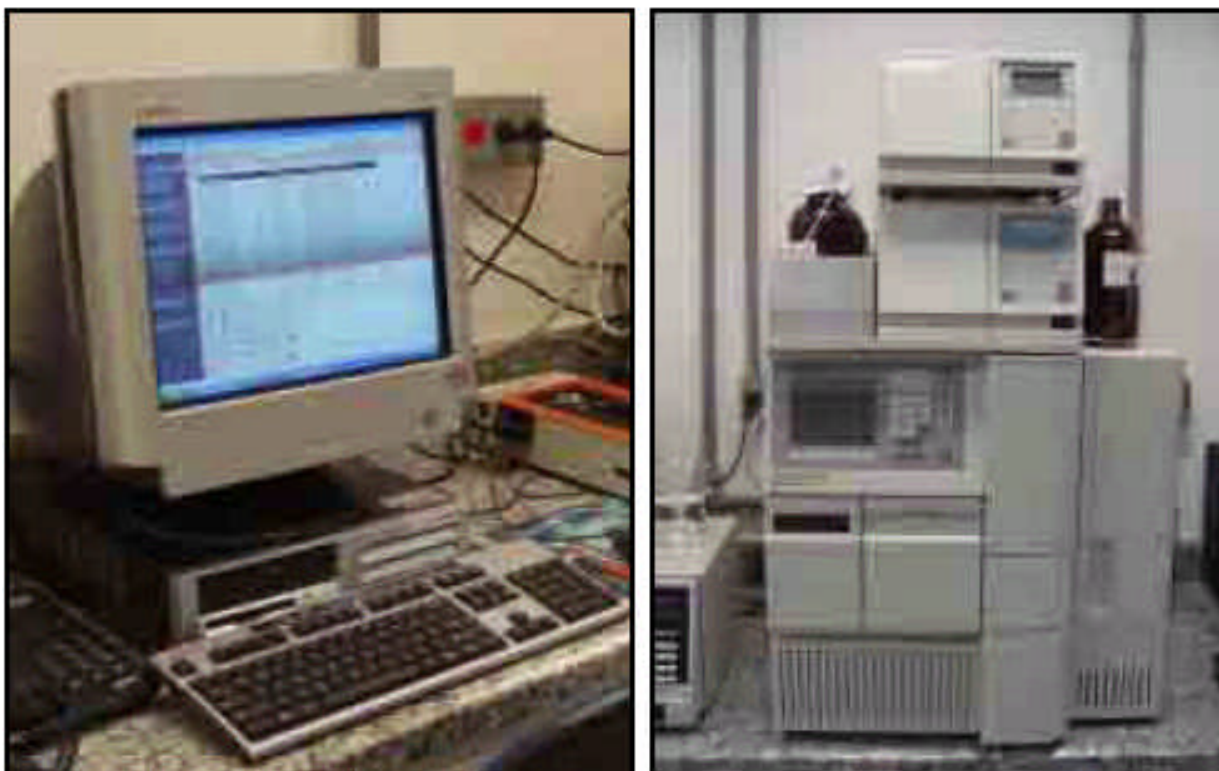


Figura 15.- Cromatógrafo líquido de alta eficiência nas dependências de Embrapa Agroindústria de Alimentos CTAA.

A Figura 16 mostra as diferentes partes do equipamento CLAE – com coluna de troca iônica:

Reservatório de solvente: São freqüentemente equipados com meios de remover gases dissolvidos, como o O_2 e N_2 , os quais interferem formando bolhas na bomba e no

sistema de detecção. Consistem de uma bomba de vácuo que permeia o ar por tubos de teflon, ou ate mesmo um sistema de introdução de gases inertes (He ou Ar).

Bomba e Misturador de Solventes: O bombeamento de solvente, tem como requisito a capacidade de suportar pressões de até 5.000 psi (libra por polegada quadrada), fluxos de 0,1 a 10 ml/min (COLLINS & BRAGA, 1990 in SANTOS DA ROSA, 2005).

Injetor: Para a introdução da amostra o método de injeção de amostras mais utilizado em cromatografia líquida e baseado na utilização de válvulas rotatórias equipadas com uma pequena tubulação de volume conhecido ("*loops*").

Detector: O detector espectrofotômetro de absorbância de radiação UV-VIS foi empregado no presente trabalho, cujo princípio de funcionamento é que a fase móvel que emerge da coluna passa a través de uma pequena célula que é mantida no caminho de um feixe de radiação UV-Visível (Figura 17) provinda de uma lâmpada de deutério e a radiação não absorvida é medida em um dispositivo o fotodiodo, que seria o transdutor ao converter uma informação não elétrica num sinal elétrico.

Este detector oferece informações espectrais e permite a comparação de espectros.

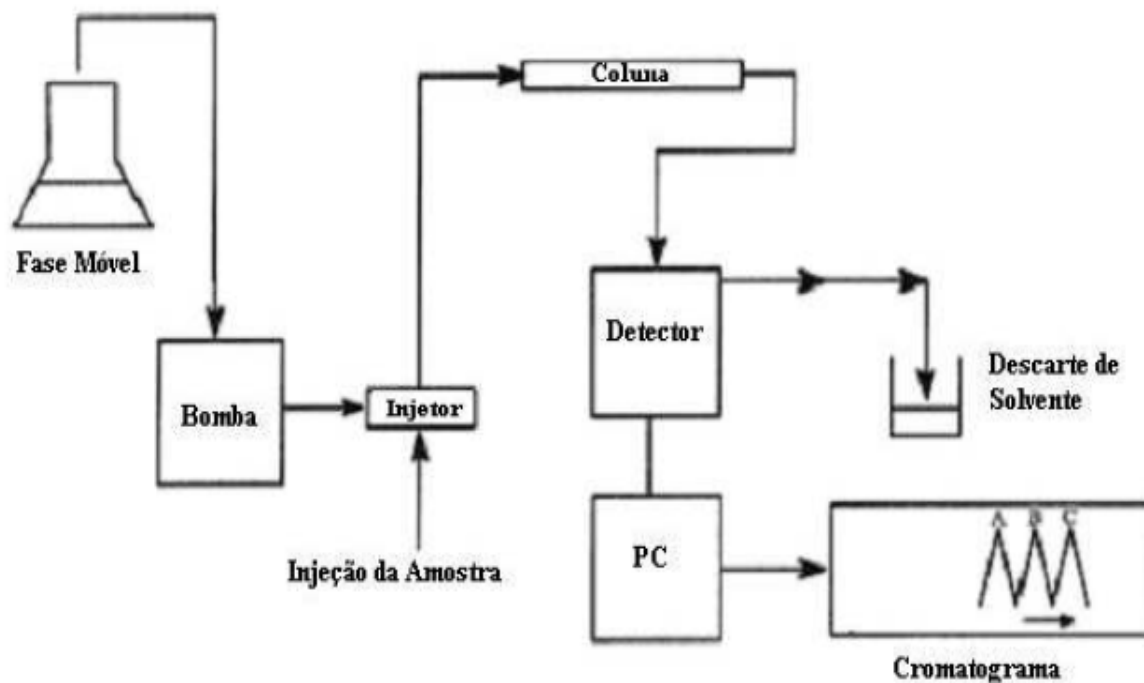


Figura 16.- Partes do equipamento de CLAE com coluna de troca iônica
(Fonte: SANTOS DA ROSA, 2005)

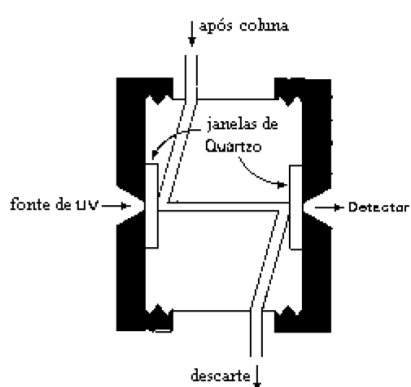


Figura 17.- Célula do detector espectrofotômetro de absorbância de radiação UV-VIS
(Fonte: SKOOG *et al.*, 1998 in SANTOS DA ROSA, 2005)

Capítulo II

JUSTIFICATIVA

Este trabalho faz parte de um projeto de pesquisa que vem sendo desenvolvido na Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia, que tem por objetivo o desenvolvimento da cultura de camu-camu, como alimento funcional, com foco na valorização da biodiversidade da Amazônia e no estudo do genoma funcional das vias de síntese e degradação da vitamina C.

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho reuniu dados da literatura sobre os teores de vitamina C no camu-camu, oriundo de várias regiões do país, bem como, apresenta resultados preliminares das análises de teores de vitamina C em frutos de camu-camu, em diferentes estágios de maturação, do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental.

Os objetivos específicos foram:

- 1-** Determinar os teores de vitamina C em casca e polpa dos frutos de camu-camu em quatro estágios de maturação através de titulometria e CLAE.
- 2-** Analisar o efeito do processamento nos teores de vitamina C em polpas gerada por despulpadores comerciais e avaliar as perdas nos teores de vitamina C através de titulometria e CLAE.

- 3-** Analisar, comparativamente, os teores de vitamina C em frutos de camu-camu através das metodologias de titulometria e CLAE
- 4-** Analisar a influência do armazenamento do camu-camu a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 10 meses, na concentração de vitamina C da casca e da polpa.

Capítulo III

MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Material Vegetal

Os frutos utilizados (figura 18) foram obtidos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG), de camu-camu da Embrapa Amazônia Oriental, localizado em Belém de Pará. Este banco foi formado em 1993, a partir de sementes coletadas às margens do rio Solimões. O BAG consiste de 100 plantas, sendo 10 populações oriundas de diferentes localidades das margens do rio, representadas por 10 plantas cada.



Figura 18.- Fotografia obtida de um corte dos frutos de camu-camu

1 – Coleta, Classificação e Preparo das amostras.

1.1.- Frutos de camu-camu

Os frutos de camu-camu em frutificação e em diferentes estágios de desenvolvimento e maturação foram coletados aleatoriamente do BAG camu-camu. Foram definidos 04 estágios de maturação nos frutos a partir do seu completo desenvolvimento; tomando-se como referência a coloração da casca dos mesmos que

varia de verde a avermelhada até roxa (Figura 19). Tomou-se em consideração também a variação da consistência da polpa do fruto e o tamanho do fruto. A Tabela 02 apresenta as características qualitativas utilizadas na determinação do grau de maturação dos frutos de camu-camu no presente estudo.

Tabela 02.- Atributos físicos utilizados no presente trabalho para caracterizar os estágios de maturação de frutos de camu-camu.

Estágios de Maturação	Cor da Casca	Consistência do fruto e caracteres
01 (não maduro)	100% o fruto com coloração verde	Rígida e dura, a polpa com cor clara.
02 (Semimaduro)	50% coloração com início de pigmentação púrpura avermelhada	Rígida, a polpa cor clara.
03 (Maduro)	100 % do fruto com presença de tonalidades vermelhas	Firme, a polpa cor clara.
04 (Sobre maduro)	100% do fruto com presença de coloração púrpura-roxa	Frágil, a polpa apresentou cor rosa.

Observou-se que a casca do fruto no estágio 03 de maturação rompe-se com facilidade e no estágio 04 existe menor consistência do fruto, o que é explicado pela ação de hidrólise das pectinas na parede celular no estágio maduro.



Figura 19. - Frutos de camu-camu nos quatro estágios de maturação

Para cada estágio de maturação 05 frutos com características típicas de cada estágio foram selecionados aleatoriamente das dez populações; assim o resultado das análises corresponde à média de 05 frutos coletados ao acaso dentro de todo o BAG todo.

Os frutos foram acondicionados em caixa de isopor e imediatamente transportados via aérea até a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, DF, onde as amostras foram pesadas e processadas.

1.1.1.- Frutos cujas polpas e cascas foram armazenadas em forma homogeneizada:

As polpas foram separadas manualmente das cascas dos frutos, e então submetidas a homogeneização no aparelho Politron, até a obtenção de uma massa

homogênea e procurando deixar menor espaço possível entre as partículas presentes na amostra. Este processo foi realizado em Outubro de 2006 e foram considerados somente frutos com a polpa branca ou translúcida (figura 18), os frutos com polpas avermelhadas foram descartados. As cascas e polpas homogeneizadas separadamente para cada estágio foram pesadas e armazenadas a -80°C até o momento da extração e análise da vitamina C.

1.1.2.- Polpa extraída por despulpamento mecânico:

Uma polpa foi obtida através do processamento de frutos maduros do BAG de Embrapa (mistura dos estágios 03 e 04) por despulpadora mecânica comercial Tortugan de aço nobre inoxidável AISI 304 e foi armazenada a -80°C . O método empregado para a obtenção desta polpa é o mesmo utilizado para produção de polpas de camu-camu comerciais na região de Belém.

Tomou-se em consideração todas as medidas de higiene na manipulação, para evitar contaminação, seja por fungos ou microorganismos. Posteriormente foi armazenada em sacos de polietileno na câmara frigorífica e ao abrigo da luz.

O processamento mecânico de extração da polpa se faz com a finalidade de aumentar o tempo de vida útil dos frutos no estágio 04, que por estarem muito maduros, facilmente se estragariam.

O fluxograma do processo de extração da polpa está apresentado na figura 20.

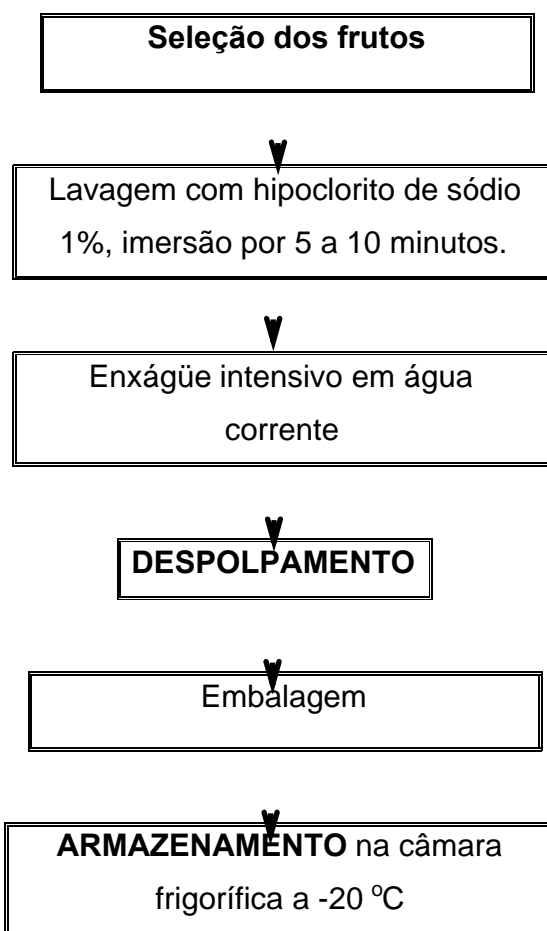


Figura 20.- Fluxograma utilizado no presente trabalho para o processamento da polpa dos frutos de camu-camu

1.1.3.- Frutos armazenados inteiros:

Os frutos foram armazenados inteiros desde 2005 a -80 °C.

A figura 21 apresenta os frutos coletados no BAG de Embrapa no estágio de maturação 03 e 04 (maduros).



Figura 21.- Frutos de camu-camu no estágio 03 e estágio 04 de maturação no campo experimental de Embrapa

2.- Equipamentos

2.1.- Para acondicionar o material

- Balança analítica Mettler® H51
- Politron - Omni\ Homogenizer 17105
- Blender – Waring commercial

2.2.- Para a metodologia de CLAE com Coluna de Troca Iônica

- Cromatógrafo Líquido de alta eficiência CLAE Shimadzu - Waters Alliance modelo 2695 com detector de UV a 243,8 nm. AUFs (para detector 2487) 3000. Coluna de

Troca Iônica BIO RAD HPX 87H (7,8 X 300 mm). Cartucho de pré-coluna troca iônica forma ácida. Filtro de Segurança.

-Purificador de água Millipore®, modelo Milli-Q Plus; (tipo II) – Millipore Ellix- 5

-Sistema de Ultrapurificação de água (tipo I) - Millipore Milli-Q Gradiente – A10

-Sonicador Sonics®, modelo VC 505;

-Ultrassom - Branson 2210

-Microcentrífuga – Hsiangtai

-Balança Analítica (0,0001g) – 2104 Bel Engineering\

-Estufa de secagem Fanen®, modelo 315 SE.

-Kit de filtração a vácuo – Millipore.

-Membrana filtrante 0,45 µm para solventes aquosos tipo HA (acetato de celulose) – OE67 Schleicher & Schuell.

2.3.- Para a metodologia de titulometria de Tillman

-pH metro Micronal®, modelo B 474; pHmetro – TecnoPON mPA 210

-Sistema para obter a Titulação

3.- Reagentes e Soluções

3.1.- Para a metodologia de CLAE com Coluna de troca iônica

-Ácido sulfúrico 0,05 moles/l (concentrado) supra puro Merck

-Padrão de Ácido L-ascórbico (99% pureza) – A1370 Spectrum Chemical Mfg. Corp.

-Água ultrapura (Milli-Q)

-Fase móvel ácido sulfúrico H₂SO₄ 0,2 moles/l (pH 1,3)

-Fase estacionária na coluna de troca iônica resinas estireno divinil benzeno e grupos trocadores de hidrogênio ácido sulfônico (agrupamento ácido H^+).

3.2.- Para a metodologia de titulométrico de Tillman

Reagentes:

2,6 diclorofenol indofenol.

-Ácido oxálico 0,5%.

-Bicarbonato de Sódio

-Ácido ascórbico Sigma (P.A)

Soluções:

-Solução de Tillman (DFI – 2,6 dicloro fenol indofenol 0,02%) (Preparação em anexo, página 104).

-Solução de ácido oxálico 0,5% (preparação em apêndice, página 104)

-Solução padrão de ácido ascórbico (preparação em apêndice, página 104).

4.- Métodos

4.1 – Metodologia de CLAE com coluna de troca iônica

As análises por CLAE com coluna de troca iônica foram realizadas no laboratório de Cromatografia da Embrapa Agroindústria de Alimentos (CTAA) no Rio de Janeiro.

As condições de trabalho foram as seguintes:

- Fase móvel: ácido sulfúrico 0,2 moles/l (pH 1,3) sob vazão de 0,7 ml/min e pressão em torno de 800 psi e máxima monitorada 1500 psi (libra por polegada quadrada)
- Coluna Aminex HPX 87H Biorad.

- Volume de injeção: 20 µl.
- Temperatura da câmara de injeção resfriada a 5 °C.
- Integração, calibração, processamento, quantificação e armazenamento dos dados cromatográficos através do software Empower (Waters Corp).

4.1.1 – Preparo da fase móvel:

A fase móvel, o ácido sulfúrico 0,2 moles/l, foi preparada a partir de 5,6 ml de ácido sulfúrico supra puro Merck, que foi transferido a um balão volumétrico e ajustado a um volume de 2 L com água ultrapura (Milli-Q). Após o preparo, a fase móvel foi filtrada em membrana de acetato de celulose (tipo HA) de 0,22µm. A fase móvel foi estocada em geladeira e microfiltrada novamente a cada dois dias de uso.

4.1.2 – Preparo da amostra:

- 0,5 g da amostra homogeneizada (pesada em balança analítica) foi dissolvida em mais ou menos 10 ml de ácido sulfúrico 0,2 moles/l. Em seguida o volume foi ajustado para 25 ml em balão volumétrico.
- O ácido ascórbico foi extraído submetendo-se as amostras a ultrassom durante 10 minutos. Debris celulares foram removidos por microcentrifugação. (como alternativa para esta etapa pode-se aplicar filtração ou microfiltração).
- Alíquotas de 20µl do sobrenadante foram transferidas para vials para a posterior injeção no cromatógrafo.

Em todo o procedimento utilizou-se água ultra pura obtida por um sistema de purificação de água com um equipamento Elix[®] e um equipamento de ultra purificação da água Milli-Q[®] Gradient 10A.

A descrição do procedimento empregado na metodologia de CLAE no presente trabalho encontra-se resumida na Figura 22.

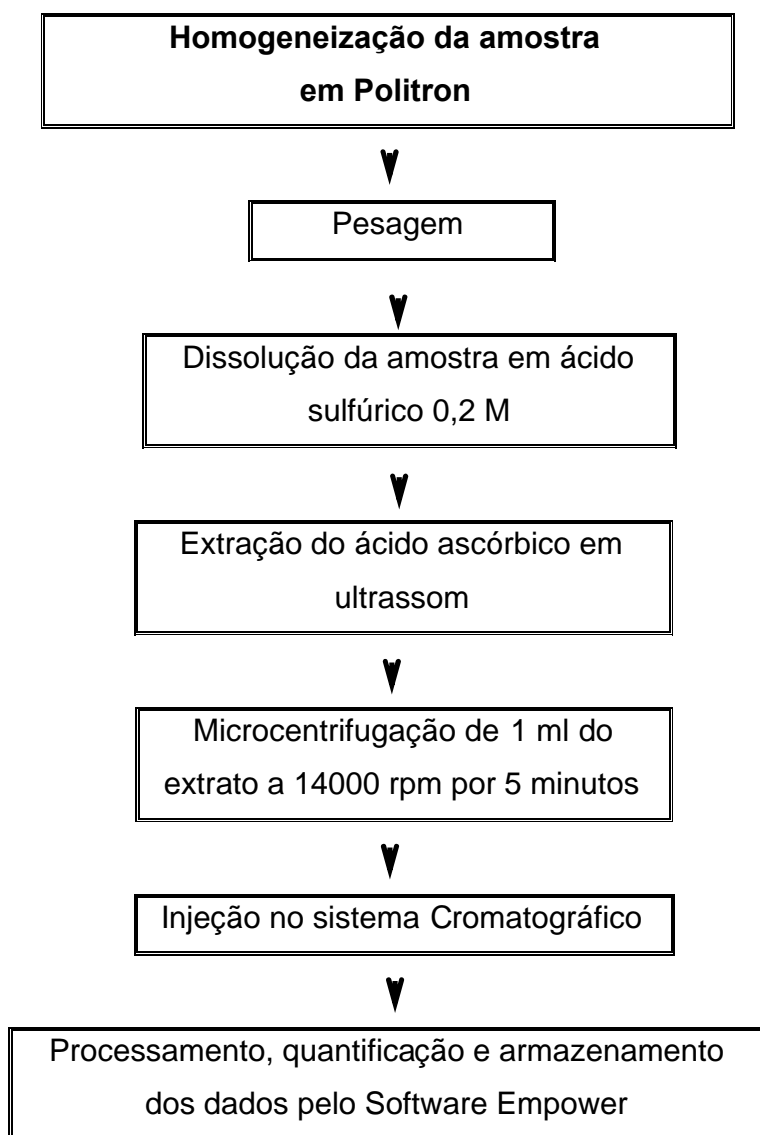


Figura 22.- Fluxograma do procedimento empregado no trabalho para o método de CLAE com coluna de troca iônica.

4.1.3 – Preparo do padrão de ácido ascórbico e determinação da concentração de vitamina C nas amostras:

O método de análise de quantificação CLAE exige a preparação de um padrão de ácido ascórbico que permite o cálculo do Fator Resposta (FR) a partir da concentração conhecida do padrão. Este fator resposta é uma forma de ajustar a proporcionalidade da resposta do detector à concentração de vitamina C da amostra.

Preparou-se a solução padrão de ácido ascórbico a partir da qual foram realizadas diluições em diferentes concentrações de vitamina C (Tabela 03). A detecção foi realizada pelo detector de UV e os cromatogramas extraídos foram obtidos no espectro de 243 nm.

Tabela 03.- Construção dos pontos da curva de calibração

Ponto da Curva	Ponto a partir da sol 1,554 mg/25ml	Concentração no ponto (mg/25ml)	Área do pico	RT Tempo de retenção
1	0,5 µl	0,777	43362	9,773
2	1,0 µl	1,554	158927	9,719
3	3,0 µl	4,662	607674	9,660
4	5,0 µl	7,770	1050012	9,658
5	7,0 µl	10,878	1511805	9,665
6	10,0 µl	15,54	2169038	9,684
7	15,0 µl	23,310	3295712	9,686

O Fator Resposta foi calculado manualmente já que a padronização de vitamina C realizou-se externamente a partir da concentração conhecida do padrão.

Cálculo do Fator Resposta (FR) a partir do padrão de calibração

$$\text{FR} = \frac{\text{Concentração do padrão de vitamina C (mg).....}}{\text{Área do pico de vitamina C do padrão de calibração}}$$

Cálculo pontual do teor da vitamina C

Os teores de vitamina C são calculados automaticamente pelo software Empower, após a introdução de informação de tempo de retenção da vitamina C (a través do padrão externo), concentração do padrão de calibração, massa da amostra e fator de diluição.

$$\text{mg/100 g} = \frac{\text{Área do pico de vitamina C na amostra} \times \text{FR} \times 100}{\text{Massa da amostra (g)}}$$

*Onde 100 é o fator de diluição para realizar ajuste

Cálculo do teor de vitamina C a partir de uma curva de calibração.

A área produzida pelo pico de vitamina C nas amostras (concentração da amostra) deve estar contida entre os valores de área dos pontos que conformam a curva padrão

$$\text{mg/100 g} = \frac{(\text{Área do pico de vitamina C na amostra} - b) \times 100}{a \times \text{Massa da amostra (g)}}$$

*onde: b = Coeficiente Linear (intercessão)

*a = Coeficiente angular (inclinação)

Todo o processo de extração da vitamina C das amostras, e preparo das soluções contendo as amostras, além das diluições do padrão de ácido ascórbico foram realizados em sala escura, iluminada por luz negra e sem incidência de radiação ultravioleta direta.

4.2 – Metodologia de titulometria de Tillman

As análises titulométricas foram realizadas no laboratório de Nutrigenômica Vegetal de Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, de acordo com o procedimento descrito por AOAC (1995), modificado por Benassi *et al.*, (1988), que substituiu o ácido meta fosfórico por ácido oxálico.

4.2.1.- Preparo do extrato:

A polpa do fruto foi extraída deste manualmente, pesou-se 1,0 g da polpa e adicionou-se cerca de 30 ml de ácido oxálico 0,5% (refrigerado), a homogeneização dos tecidos realizou-se no homogeneizador politron Omni 17105. A casca foi também extraída manualmente, macerou-se em um cadinho com ácido oxálico gelado, logo foi passada por politron para homogeneização dos tecidos. Após a extração e homogeneização da amostra, transferiu-se esta para um balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com ácido oxálico 0,5% gelado. A solução foi armazenada em vidro escuro. Nos casos em que a análise não foi imediata, armazenou-se em geladeira ou freezer esta solução por até um dia sem alterações significativas nos teores de ácido ascórbico.

4.2.2- Padronização da solução de Tillman 0,02% com ácido ascórbico:

A solução de Tillman, titulante, foi padronizada: 5 ml da solução estoque de ácido ascórbico (50 µg/ml) foram transferidos para um erlenmeyer de 125 ml, é ajustado para 50 ml com água destilada. A titulação foi realizada com solução de Tillman até o ponto

de virarem, róseo claro persistente por 15 segundos. O reagente foi reduzido de azul a incolor e em meio ácido, tornou-se róseo.

4.2.3.- Determinação de ácido ascórbico no extrato:

Tomou-se 1ml do extrato em um erlenmeyer de 125 ml, ajustado a 50 ml com água destilada, em seguida foi titulado com a solução de Tillman, até o ponto de virarem róseo claro persistente por 15 segundos. Realizou-se como mínimo quatro repetições por amostra.

5.- Tratamento Estatístico

Foram obtidas as médias e desvio padrão das repetições. Para a comparação dos teores médios de vitamina C entre a polpa e casca, independentemente do grau de maturação, bem como para a avaliação da influência do tempo de armazenamento do fruto nos teores de vitamina C da casca e da polpa foi utilizada a análise de variância (Anova, fator único). Para verificar as diferenças entre as médias dos valores de vitamina C da polpa e casca, em diferentes estágios de maturação, obtidos em triplicata, em julho de 2007, foi aplicado análise de variância múltipla (Anova, com correção de Bonferroni)

Capítulo IV

RESULTADOS

A análise estatística foi realizada por um efeito combinado de duas fontes de variação: O tipo de método de análise de vitamina C e a determinação da concentração de vitamina C nos diferentes estágios de maturação.

A Tabela 04 revela o teor de vitamina C da polpa dos frutos, realizada em Novembro de 2006, com valores muito próximos entre os diferentes estágios de maturação.

Tabela 04.- Concentração de ácido ascórbico na polpa dos frutos de camu-camu do BAG de Embrapa determinada por CLAE (g/100g).

Réplica	Estágio de Maturação			
	1	2	3	4
I	1,91	1,71	1,64	1,75
II	1,93	1,97	1,62	1,98
Média	1,92 ± 0,01	1,84 ± 0,18	1,63 ± 0,01	1,87 ± 0,16

* Análise realizada em Novembro 2006.

A Tabela 05 revela os resultados do teor de vitamina C na casca, os quais apresentaram baixa variabilidade, sugerindo que não haja diferença entre os valores encontrados para vitamina C na casca do camu-camu, em diferentes estágios de maturação.

Tabela 05.- Concentração de ácido ascórbico na casca dos frutos de camu-camu do BAG de Embrapa determinada por CLAE (g/100g).

Réplica	Estágio de Maturação			
	1	2	3	4
I	2,49	2,40	2,47	2,75
II	2,41	2,55	2,36	2,59
Média	2,45 ± 0,05	2,48 ± 0,1	2,41 ± 0,07	2,67 ± 0,1

* Análise realizada em Novembro 2006.

Considerando que os valores encontrados tanto na polpa quanto na casca do camu-camu não foram diferentes nos quatro estágios de maturação (Tabela 04 e 05), uma análise estatística comparativa entre as médias dos teores de vitamina C encontrados na casca (**2,50 ± 0,11**) e na polpa (**1,81 ± 0,13**), independentemente do grau de maturação, revelou que o teor de vitamina C na casca é significativamente maior que o encontrado na polpa do camu-camu ($p = 0,00019$).

A Tabela 06 apresenta os valores de vitamina C encontrados nos frutos nos quatro estágios de maturação, com três repetições técnicas para cada estágio, realizadas em Julho de 2007. Os resultados mostram que a polpa do camu-camu no primeiro estágio de maturação apresentou maior teor de vitamina C que os teores encontrados no terceiro ($p = 0,0037$) e quarto estágios de maturação ($p = 0,0025$). Não foi observada diferença significativa nos valores médios encontrados na polpa entre os estágios de maturação 02 , 03 e 04. Não foi observada diferença significativa nos teores de vitamina C da casca do camu-camu nos diferentes estágios de maturação. Entretanto, foi

observada uma tendência dos frutos no estágio 1 apresentarem maior valor de vitamina C na casca que os frutos do estágio 04 ($p = 0,0711$).

Com a finalidade de verificar a influência do tempo de armazenamento do camu-camu a -80°C , no teor de vitamina C da casca e da polpa do fruto, foram comparados os valores médios obtidos em novembro de 2006 e Julho de 2007, independentes do estágio de maturação.

Tabela 06.- Teor de ácido ascórbico nos frutos de camu-camu procedentes do BAG de Embrapa determinado por CLAE (g/100g).

Estágio de Maturação				
Camu-camu	1	2	3	4
Polpa	$1,56 \pm 0,05^a$	$1,36 \pm 0,06^a$	$1,23 \pm 0,05^b$	$1,21 \pm 0,11^b$
Casca	$2,04 \pm 0,21^a$	$1,85 \pm 0,01^a$	$1,78 \pm 0,08^a$	$1,73 \pm 0,03^a$

Análise realizada em triplicata em Julho de 2007. Valores na mesma linha com letras diferentes apresentam diferença significativa (Anova, com correção de Bonferroni).

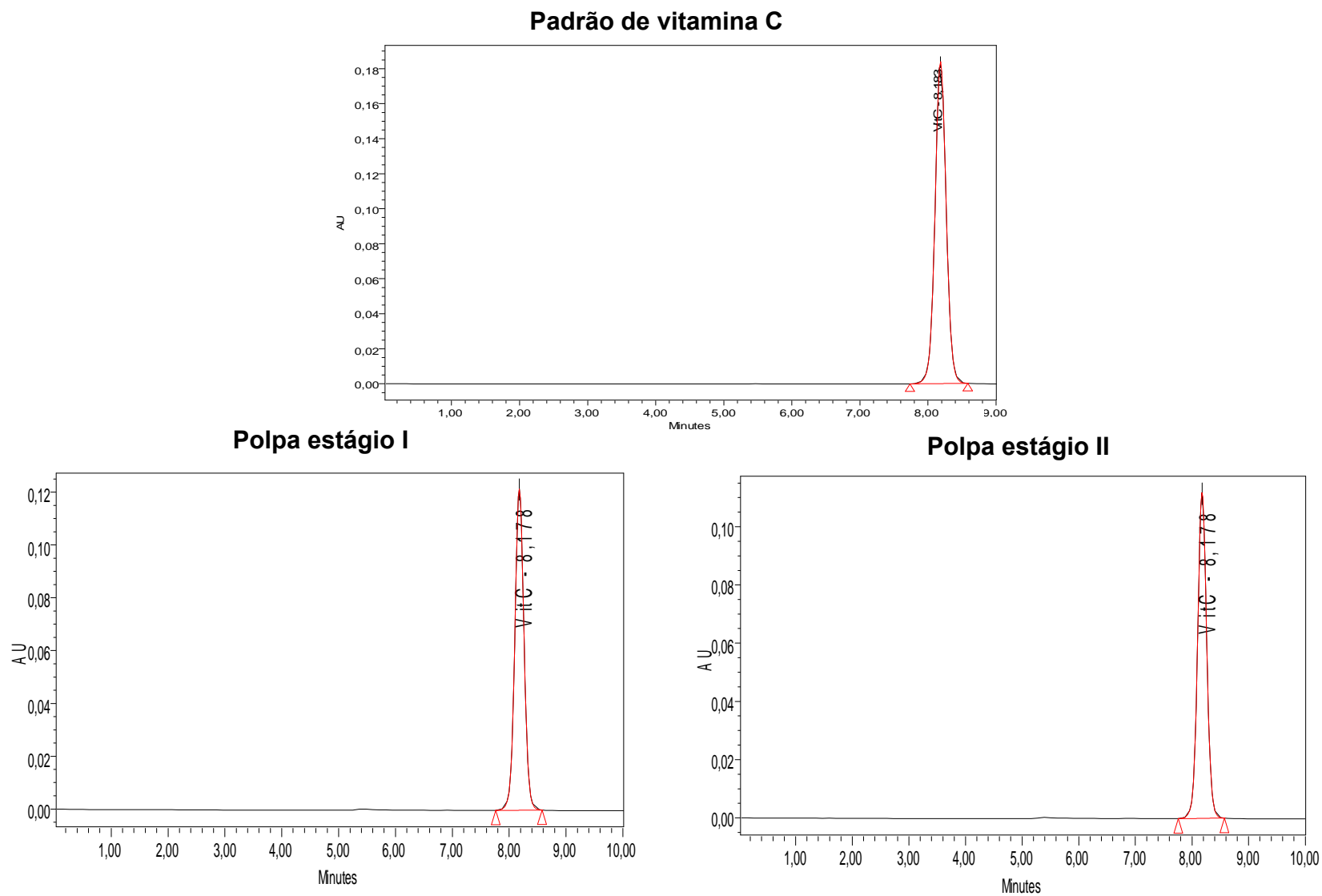
Tabela 07.- Efeito do armazenamento no teor médio de ácido ascórbico* na polpa e na casca dos frutos de camu-camu, independentemente do estágio de maturação. (g/100g)

	Novembro/2006	Julho de 2007
Polpa	$1,81 \pm 0,15^a$	$1,34 \pm 0,16^b$
casca	$2,50 \pm 0,13^a$	$1,85 \pm 0,16^b$

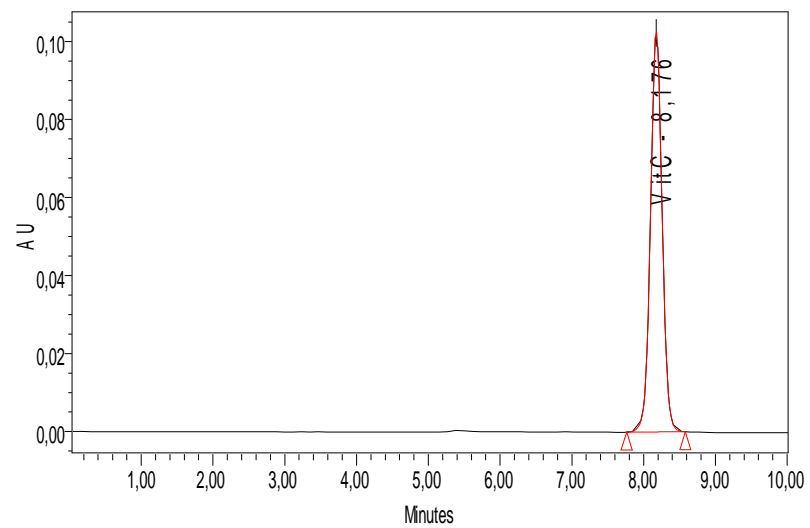
Teor de vitamina C determinado por CLAE. Valor médio entre todos os valores obtidos nos diferentes estágios de maturação. Valores na mesma linha com letras diferentes apresentam diferença significativa (Anova, fator único)

Na Figura 23 estão apresentados os cromatogramas na análise do teor de vitamina C do camu-camu. Os cromatogramas apresentaram perfil contínuo com o pico da vitamina C resolvido no nível da linha base, o que significa que a metodologia de CLAE com coluna de troca iônica tem precisão na determinação do teor de vitamina C, eliminando os interferentes que em este caso são redutores.

Figura 23.- Cromatogramas de análise de Vitamina C da polpa dos frutos de camu-camu



Cromatograma da Polpa estágio III



Cromatograma da Polpa estágio IV

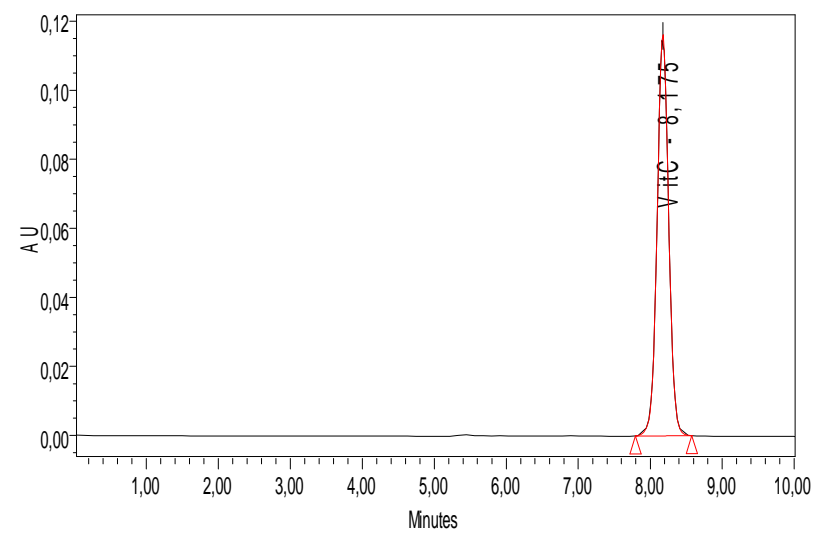
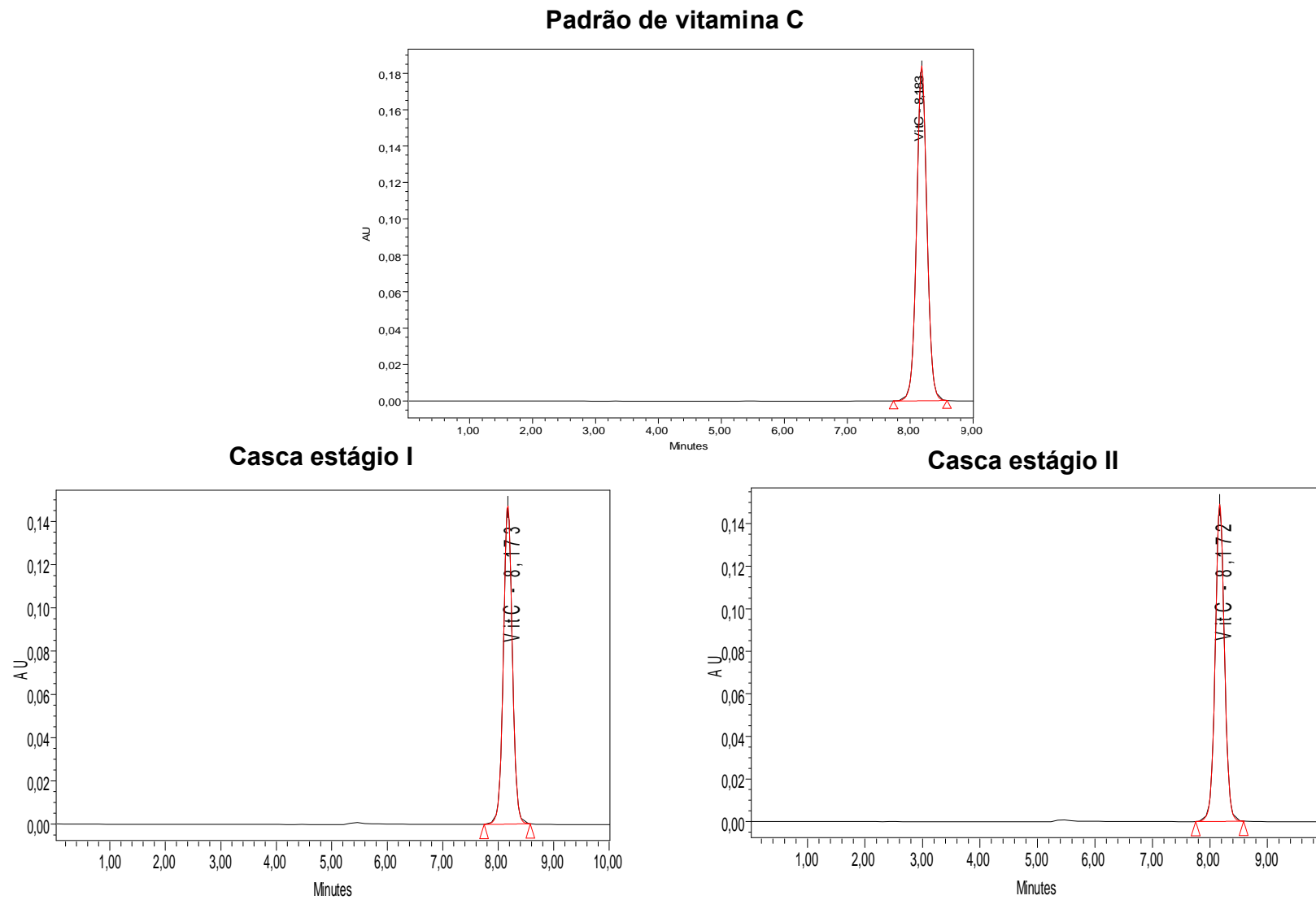
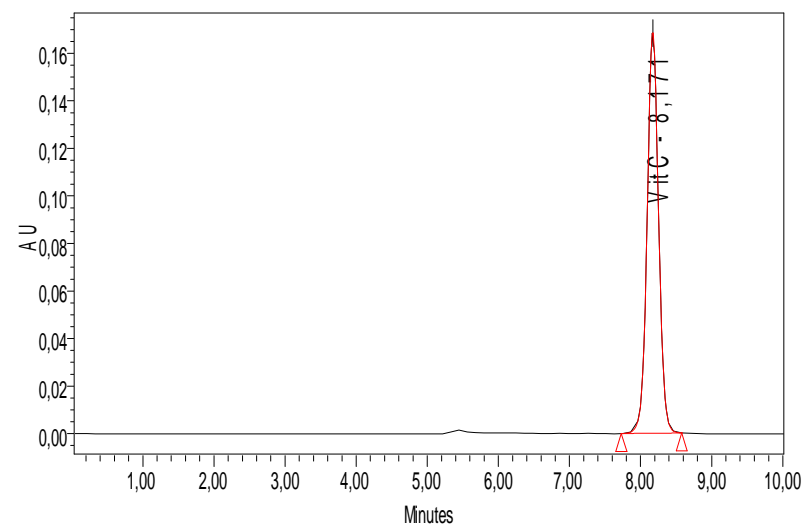


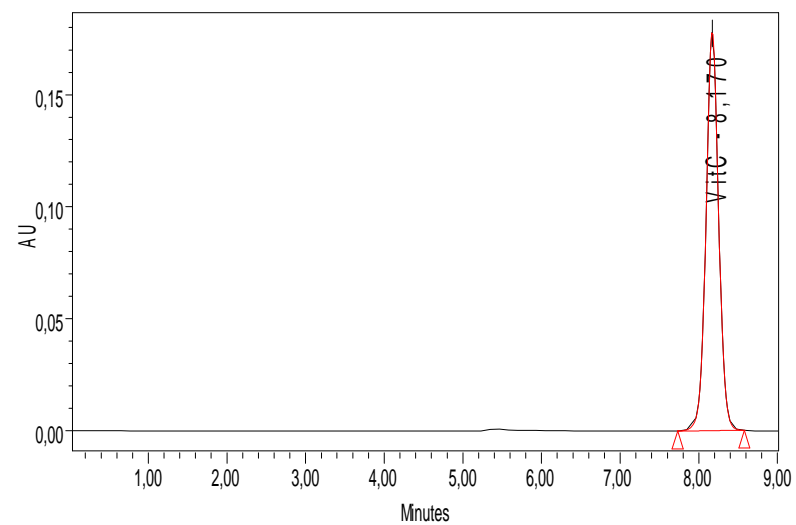
Figura 24.- Cromatogramas de análise de Vitamina C da casca dos frutos de camu-camu



Cromatograma da Casca estágio III



Cromatograma da casca estágio IV



Na tabela 08 estão apresentados os teores de vitamina C encontrados nas polpas processadas e revela que a polpa extraída por processamento mecânico apresentou teor de vitamina C de **1,32 ± 0,05 g/100g**, inferior à média encontrada na polpa do fruto por CLAE no mesmo período em Novembro de 2006 (Tabela 07)

Tabela 08.- Concentração de ácido ascórbico* por CLAE em polpa extraída por despulpamento mecânico dos frutos de camu-camu procedentes do BAG de Embrapa

Réplica	g/100g
1	1,28
2	1,35
Média	1,32 ± 0,05

* Análise realizada em Novembro de 2006.

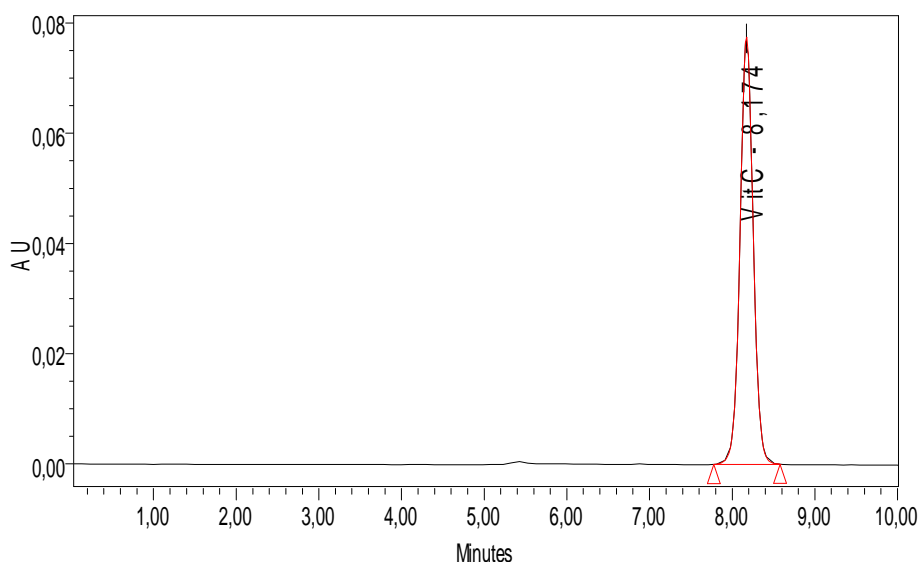


Figura 25.- Cromatograma de análise de vitamina C na polpa extraída por despulpamento mecânico dos frutos de camu-camu procedentes do BAG de Embrapa

* Análise realizada em Novembro de 2006.

Pela análise dos cromatogramas, não foi possível verificar alteração entre os perfis da vitamina C extraída da polpa do fruto e da polpa extraída por despolpamento mecânico (Fig 23 e 25).

As Tabelas 09 e 10 apresentam o resultado da análise do teor de vitamina C realizada em Agosto de 2006, por titulometria (metodologia de Tillman). Os valores encontrados tanto na polpa quanto na casca não apresentaram grandes variações nos diferentes estágios de maturação.

Tabela 09.- Concentração de ácido ascórbico na polpa dos frutos de camu-camu do BAG de Embrapa determinada por titulometria de tillman. g/100g.

Réplica	Estágio de Maturação			
	1	2	3	4
I	2,27	2,20	2,30	2,39
II	2,31	2,24	2,23	2,46
Média	2,29 ± 0,02	2,22 ± 0,02	2,27 ± 0,04	2,43 ± 0,04

* Análise realizada em Agosto 2006.

Tabela 10.- Concentração de ácido ascórbico na casca dos frutos de camu-camu do BAG de Embrapa determinada por titulometria de Tillman, resultados expressos em g/100g.

Réplica	Estágio de maturação			
	1	2	3	4
I	3,20	3,06	2,99	3,10
II	3,32	3,07	3,01	3,17
Média	3,26 ± 0,8	3,06 ± 0,01	3,0 ± 0,01	3,13 ± 0,05

* Análise realizada em Agosto 2006.

Na tabela 11 estão apresentados os valores de vitamina C, determinados por titulometria, nos frutos cuja polpa e casca foram separadas e homogeneizadas em Outubro de 2006, armazenados a -80 °C e analisadas em julho de 2007. O teor de vitamina C na polpa do fruto foi menor no segundo e terceiro estágio de maturação em relação ao primeiro estágio, não havendo diferença entre os estágios primeiro e quarto. Na casca houve grande variação dos teores em relação aos estágios de maturação. O terceiro estágio apresentou maior teor de vitamina C.

Tabela 11.- Concentração de ácido ascórbico determinada por titulometria de Tillman na polpa e casca do fruto do BAG de Embrapa. g/100g.

	Estágio de maturação			
	1	2	3	4
Polpa	1,86 ± 0,05 ^a	1,52 ± 0,02 ^b	1,35±0,04 ^b	1,74±0,08 ^a
Casca	2,34 ± 0,02 ^d	2,58 ± 0,04 ^b	2,62 ± 0,09 ^a	2,46 ± 0,09 ^c

* Análise realizada em triplicata em Julho de 2007.

Considerando as médias obtidas para todos os valores determinados nos quatro estágios de maturação, o teor médio de vitamina C encontrado na casca foi maior que o valor encontrado na polpa dos frutos ($p < 0,0001$), independentemente dos períodos de avaliação, Agosto de 2006 e Julho de 2007 (Tabela 12).

Tabela 12.- Efeito do armazenamento no teor médio de ácido ascórbico* na polpa e na casca dos frutos de camu-camu, independentemente do estágio de maturação, em g/100g.

	Agosto/2006	Julho de 2007
Polpa	2,3 ± 0,09 ^a	1,62 ± 0,21 ^b
casca	3,11 ± 0,11 ^a	2,50 ± 0,13 ^b

*Teor de ácido ascórbico determinado por titulometria de Tillman.

*Letras iguais na mesma linha significa que não houve diferença significativa ($P < 0,01$)

A média entre todos os valores de vitamina C, determinados por titulometria, nos quatro estágios de maturação do fruto, tanto na polpa quanto na casca, foram menores após 10 meses de armazenamento (Tabela 12).

Não foi observada diferença entre as médias de vitamina C obtidas por meio dos dois métodos CLAE e titulométrico das amostras de polpa obtidas por despulpamento, devido ao reduzido número de réplicas realizadas em novembro de 2006 (Tabelas 08 e 13).

Tabela 13.- Concentração de ácido ascórbico por titulometria de Tillman na polpa extraída por despulpamento mecânico dos frutos de camu-camu procedentes do BAG de Embrapa.

Réplica	g/100g
1	1,30
2	1,35
Média	1,33 ± 0,04

* Análise realizada em Novembro de 2006

Na Tabela 14 estão apresentadas as concentrações de vitamina C obtidas nas amostras do fruto de camu-camu armazenado inteiro a -80 °C desde Abril 2005 e analisado em Julho 2007.

Tabela 14.- Teor de ácido ascórbico determinado por titulometria de Tillman, na polpa e casca do fruto armazenado inteiro a -80 °C, desde Abril 2005, em g/100g.

Camu-camu	Estágio maturação			
	1	2	3	4
Polpa	1,83 ± 0,02 ^a	1,55 ± 0 ^c	1,19±0,04 ^c	1,67±0,04 ^b
Casca	2,01 ± 0,02 ^a	1,98 ± 0,04 ^a	2,06±0,04 ^a	1,78±0,04 ^b

*Letras iguais na mesma linha significa que não houve diferença significativa (P < 0,01)

Nas Figuras 26 e 27 pode-se apreciar a diferença de valores de teor de vitamina C mediante as duas metodologias empregadas no presente trabalho.

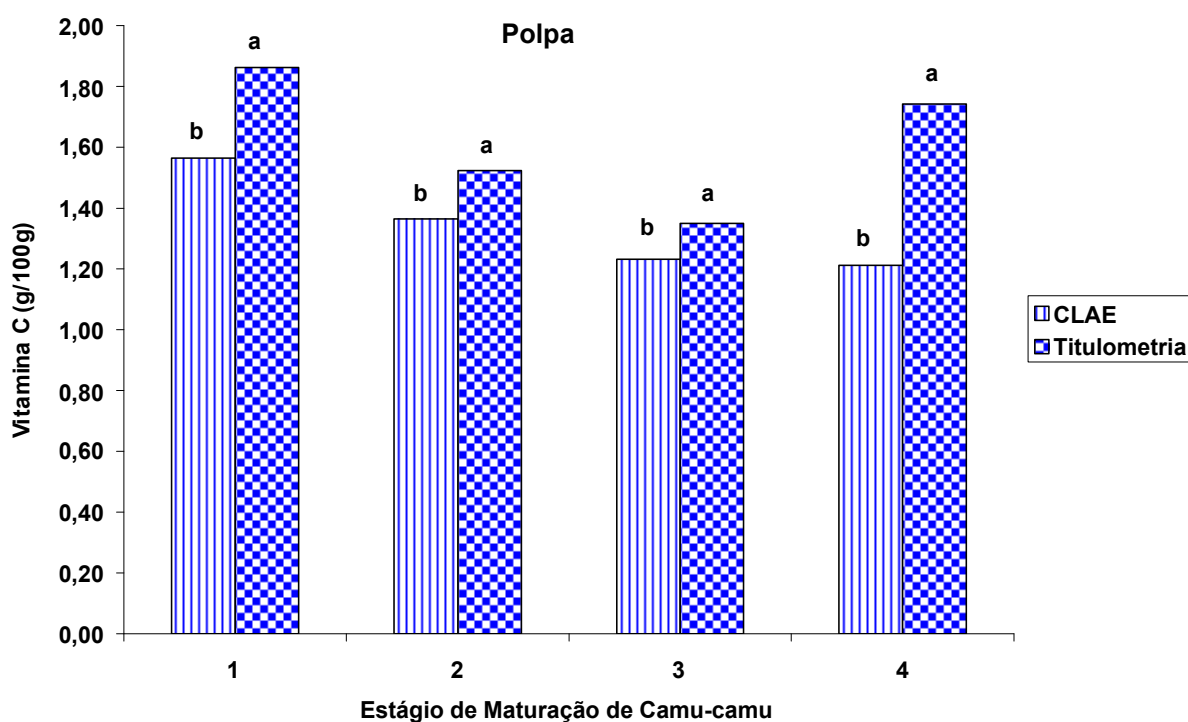


Figura 26.- Comparação entre os métodos: CLAE de troca iônica e titulometria de Tillman na determinação de teor de vitamina C na polpa dos frutos de camu-camu.

*Análise realizada em Julho de 2007

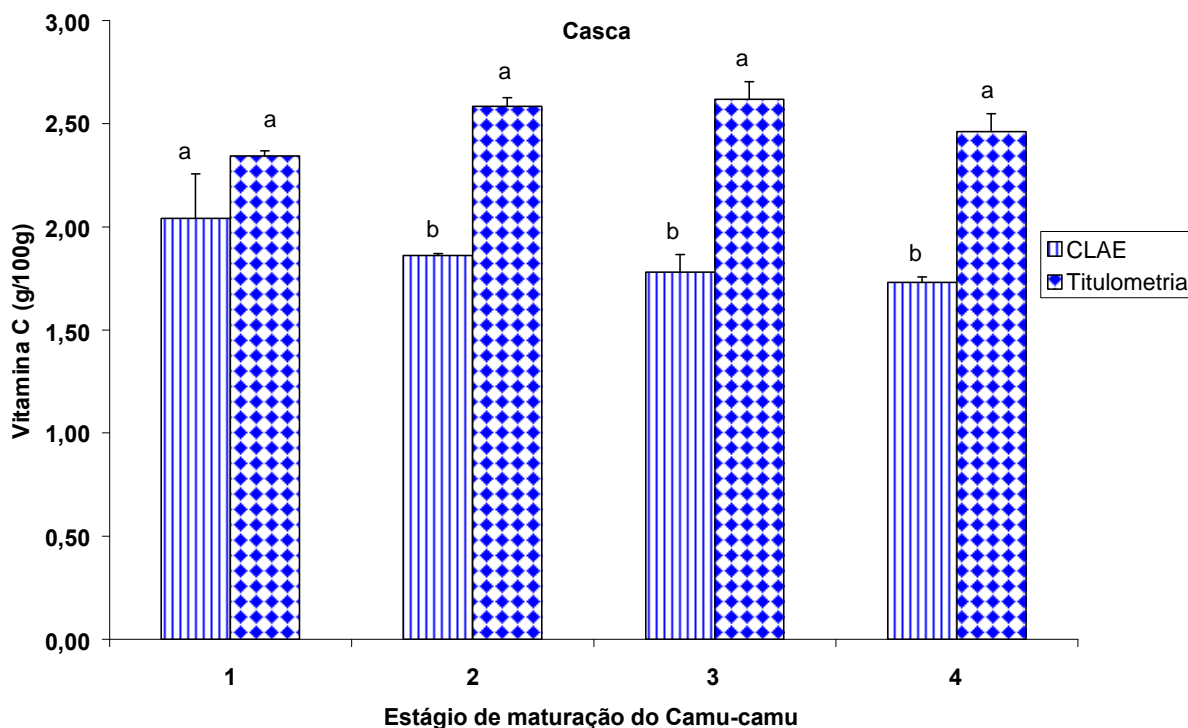


Figura 27.- Comparação entre os métodos: Cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica e titulometria de Tillman na determinação de teor de vitamina C na casca dos frutos de camu-camu.

*Análise realizada em Julho de 2007

Excetuando os valores médios encontrados no Estágio 01, nas figuras 26 e 27 pode-se apreciar que os valores por titulometria de Tillman foram maiores. Estes resultados eram previsíveis devido aos interferentes redutores que não são eliminados no processo de extração da vitamina C e que na titulometria são contabilizados. O sistema CLAE melhora os resultados em relação à metodologia na qual os interferentes são separados.

Mediante os resultados obtidos e apresentados nas Figuras 28 e 29 pode-se concluir que a forma mais adequada de armazenamento da amostra a testar vitamina C é como fruto inteiro a -80 °C.

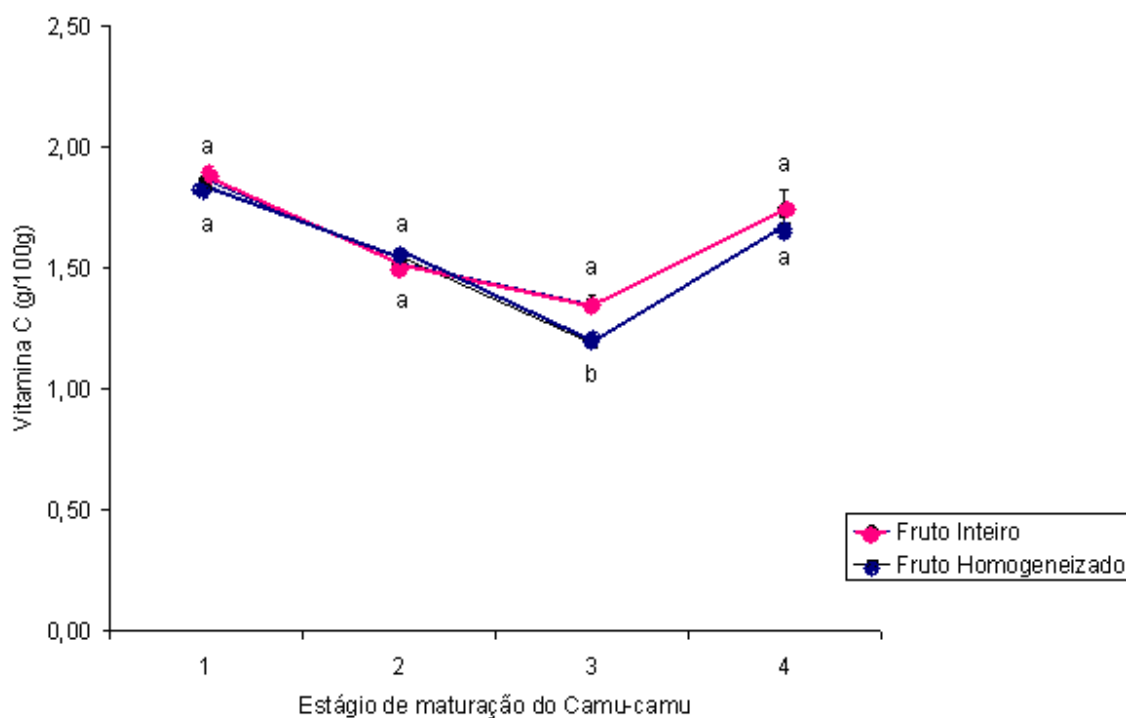


Figura 28.- Teor de vitamina C, determinado por titulometria de Tillman, na polpa do fruto de camu-camu, depois de armazenado do fruto a -80 °C, inteiro ou homogeneizado. Letras iguais no mesmo estágio, não há diferença significativa (Dosagens realizadas em Julho de 2007).

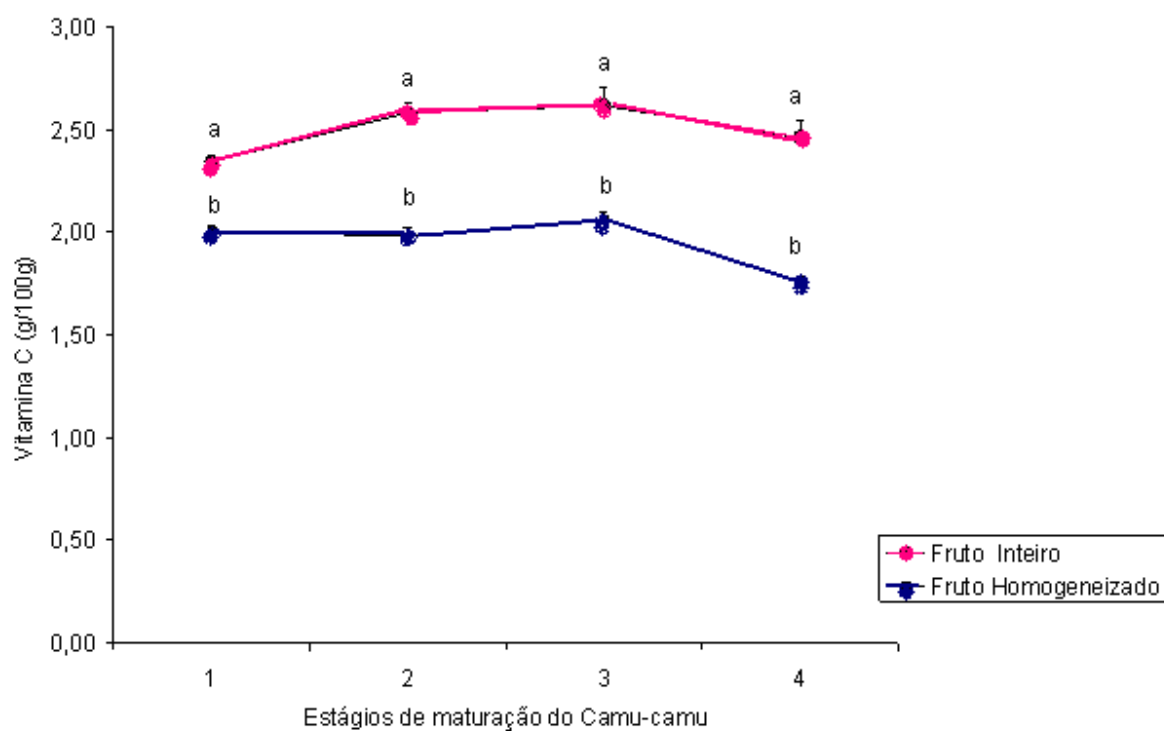


Figura 29.- Teor de vitamina C, determinado por titulometria de Tillman, na casca do fruto de camu-camu, depois de armazenado o fruto a -80°C , inteiro ou homogeneizado. Letras iguais no mesmo estágio, não há diferença significativa (Dosagens realizadas em Julho de 2007).

Capítulo V

DISCUSSÃO

O alto teor de vitamina C contido nos frutos de camu-camu (*Myrciaria dubia*) torna este fruto um interessante modelo para o estudo e caracterização sob vários aspectos, tanto em abordagens moleculares para identificação e isolamento de genes, como para a utilização destes como alimento nutracêutico na produção de cosméticos e como justificativa para o incentivo da produção e consumo desse fruto pela população. A determinação dos teores de ácido ascórbico nos diferentes estágios de maturação do fruto é importante para orientar o produtor no momento da colheita, para que o mesmo possa selecionar o fruto de maior teor em vitamina C.

A casca do Camu-camu analisada neste estudo apresentou teor de vitamina C significativamente maior que o teor encontrado na polpa, independentemente do estágio de maturação do fruto (Tabelas 4 e 5). PINEDO (2002) argumenta que o aumento de ácido ascórbico na casca é devido à maior exposição dos frutos aos raios solares, favorecendo assim a fotossíntese, produtora dos carboidratos que são transformados em vitamina C. No presente trabalho, a casca do fruto apresentou 28% maior teor de ácido ascórbico que a polpa do fruto. A síntese de ácido ascórbico depende da disponibilidade de hexosas (sobretudo glicose) e conseqüentemente da atividade fotossintética (NAKASONE *et al.*, 1966). Portanto a radiação solar é um fator importante na produção de vitamina C pela célula.

Embora na primeira análise, realizada em duplicata, não tenha sido possível verificar diferença nos teores de vitamina C entre os quatro estágios de maturação do

fruto (Tabela 4 e 5), a polpa, na segunda análise, realizada em tréplicas, apresentou maior teor nos primeiros dois estágios de maturação. JUSTI *et al* (2000), encontrou também que o estágio 01 de maturação do fruto de camu-camu apresentou teor de vitamina C mais alto, provavelmente devido à transformação bioquímica que sofre o ácido ascórbico à medida que o fruto vai amadurecendo. Durante esse processo de maturação, o ácido ascórbico vai sofrendo transformação para a produção de açúcares, que acentuam o sabor adocicado dos frutos. Diversos autores observaram que, independentemente da matriz estudada e da estação climática, o acúmulo de vitamina C decresce à medida que o fruto vai amadurecendo. Este decréscimo de vitamina C é devido à atuação das enzimas: ácido ascórbico oxidase (ascorbato oxidase), fenolase e citocromo oxidase. (BUTT, 1980 in PROENÇA, 2002). Este mesmo achado foi observado na polpa de acerola: Frutos imaturos apresentavam 4,89 g de vitamina C por 100g de polpa, no fruto em processo de maturação o valor médio encontrado foi de 3,93 g/100g e no fruto maduro o valor foi de 1,79 g/100g (VISENTAINER, 1997). LOPEZ, 1963 in ANDRADE (1991b) também observou uma redução no teor de vitamina C à medida que a acerola amadurecia e concluiu que o processo de amadurecimento do fruto reduz proporcionalmente o conteúdo de vitamina C. ANDRADE (1991b), entretanto, ao determinar a variação do conteúdo de vitamina C durante o amadurecimento do fruto de camu-camu em 06 estágios de maturação, obteve um acúmulo de vitamina C no estágio 03 de maturação até o último estágio. A variação do teor de vitamina C foi de 2,49 g/100g a 3,13 g/100g de polpa, passando por um mínimo da concentração de vitamina C na polpa no estágio 02. Nossos resultados apontam para a redução do teor de vitamina C nos frutos de camu-camu à medida que este amadurece. Este resultado está em acordo com demais autores que afirmam que o conteúdo de vitamina C na

maioria dos frutos tende a diminuir durante o processo de maturação (NAKASONE *et al.*, 1966)

A polpa, obtida por processamento mecânico de despulpamento de frutos de camu-camu, apresentou teor de vitamina C cerca de 30% inferior ao valor encontrado para a polpa do fruto de camu-camu, porém, devido ao reduzido número de repetições (duas) não foi possível verificar se esta diferença era significativa (Tabelas 4 e 8). Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram encontrados por DIB TAXI (2001) em frutos de camu-camu procedentes da Amazônia, cuja polpa foi também obtida por despulpamento. DIB TAXI (2001) encontrou teores de ácido ascórbico de 1,43 g/100g e 1,79 g/100g de polpa processada e do fruto inteiro, respectivamente, observando também uma redução no teor de vitamina C de cerca de 20% também. Esta redução no teor de vitamina C do fruto que sofreu o despulpamento mecânico seria esperada devida à oxidação da vitamina C durante o processamento.

Consultando tabelas de composição de vitaminas em alimentos procedentes de diferentes partes do mundo, verifica-se que para um mesmo fruto, há uma variação quanto ao teor de vitamina C; assim um estudo detalhado da composição química do fruto de camu-camu em três estágios de maturação foi realizado por ZAPATA & DUFOUR (1993), onde o fruto originário de Iquitos Peru apresentou variação na concentração de ácido ascórbico de 1,8 g/100g a 2,88 g/100g de fruto.

A ampla variação do teor de vitamina C descrito na literatura, entre diferentes populações do fruto camu-camu deve-se, em grande parte, às diferenças genéticas. Este fato foi observado por meio de isoenzimas, isoladas de populações de camu-camu oriundas de Iquitos (Peru), Uatumã (Amazonas) e de Boa Vista (Roraima) (TEIXEIRA *et*

al., 2004). Diferenças nas condições de desenvolvimento da planta e conseqüentemente do fruto, como as variações climáticas, umidades e as características do solo também interferem no teor de vitamina C dos frutos (JUSTI *et al.*, 2000). Variações do teor de vitamina C em frutos de diferentes partes da mesma planta foram também observadas (FALADE, 1981), isto porque o teor de vitamina C no fruto também é influenciado pelo tamanho dos frutos e a posição na árvore; devido à menor ou maior luminosidade que recebe (FONSECA *et al.*, 1969).

Segundo YUYAMA (2001), o cultivo em terra firme resulta em melhor desenvolvimento da espécie de camu-camu (*Myrciaria dubia*) o que pode implicar em uma produção dos frutos com maior teor de vitamina C, já que em terra firme tem-se maior controle da qualidade dos frutos, quando comparado com o camu-camu em habitat silvestre, cuja colheita, ocorre apenas uma vez ao ano e não tem um bom controle, devido ao ambiente de várzeas de rio.

Os valores médios de vitamina C obtidos pelo método cromatográfico (CLAE), tanto para a polpa quanto para a casca de camu-camu foram menores que os valores obtidos por Titulometria. Além disto a tabela 06 apresenta as diferenças encontradas pela metodologia CLAE entre os estágios 1 e 2 versus 3 e 4 na polpa diferente dos resultados obtidos por titulometria de Tillman na polpa dos frutos de camu-camu, os quais, mediante esta metodologia apresentam diferença significativa entre os quatro estágios de maturação do fruto (Tabela 11). O teor de vitamina C na casca parece não acompanhar o teor observado na polpa, durante o processo de maturação. Estes resultados provavelmente sejam devidos aos interferentes redutores, corantes como as antocianinas, compostos fenólicos e flavonóides cuja concentração aumentam à medida que o fruto amadurece, e que devem interferir com o método titulométrico

devido à intensificação da cor rosa (GÜÇLU *et al.*, 2004 in SANTOS DA ROSA, 2005). Embora a titulometria de Tillman apresente a vantagem de ser rápida, podendo ser aplicada com amostras em grande escala, a precisão do teor de vitamina C é influenciado pelos interferentes redutores, presentes na amostra, o que prejudica a avaliação do teor de vitamina C nos frutos por essa metodologia.

A metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência CLAE, com coluna de troca iônica, apresentou maior sensibilidade. Os cromatogramas obtidos nas figuras 23, 24 e 25, evidenciam perfis de apenas um pico da vitamina C resolvido no nível da linha base, apresentando também uma curva uniforme, o que constata que os interferentes redutores foram eliminados.

No presente estudo foi possível observar também que o armazenamento do fruto tanto inteiro quanto na forma de polpa homogeneizada, a uma temperatura de -80°C, por cerca de 10 meses reduz significativamente o teor de vitamina C na casca e polpa do camu-camu (Tabela 12)

Outras metodologias devem também ser testadas para caracterização do BAG da Embrapa. Um maior número de populações deve ser caracterizado para melhor selecionar variedades para introdução no mercado. Aliados ao alto teor de vitamina C do camu-camu, outras características agronômicas devem ser consideradas, tais como produtividade, tamanho dos frutos, grau brix, etc.

Conseguiu-se observar que a melhor forma de armazenar a amostra para preservar a vitamina C é na forma de fruto inteiro e não em forma de homogeneizada por que mesmo a temperatura de -80° C, o teor de a vitamina C foi reduzido (Figura 28 e 29),

VILAS BOAS (1999) verificou perda de vitamina C semelhantes em frutas e verduras armazenadas a temperatura abaixo de zero.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A amostra de polpa do camu-camu, no seu primeiro estágio de maturação (01), avaliada nesse estudo, apresentou maiores teores de vitamina C, sendo este o estágio ideal de colheita para fins de uso industrial.

Em relação à polpa processada para fins alimentares foi observada redução nos teores da vitamina C, porém os níveis da vitamina C ainda permanecem altos quando se compara com outras polpas (estimativas relatadas para acerola e outros frutos).

Testes em tecnologia de alimentos com o fruto de camu-camu são necessários para desenvolver um adequado processamento de despulpamento, diminuindo assim as perdas de matéria prima tão valiosa.

O método cromatográfico (CLAE) apresentou sensibilidade e precisão em relação ao método titulométrico de Tillman.

Para as determinações de teores de vitamina C em amostras a grande escala, deve-se optar pelo método titulométrico de Tillman, devido ao menor tempo de análise, praticidade e menor custo, em relação ao método de CLAE. No entanto, deve-se ter em conta que há uma superestimativa dos valores reais de vitamina C dos frutos, devido à presença de compostos coloridos que interferem no método titulométrico.

O armazenamento do fruto de camu-camu inteiros preserva mais a vitamina C no fruto.

Determinações dos teores de vitamina C em uma amostra representativa do BAG da Embrapa são necessárias.

Capítulo VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE J. S, GALEZI MAM, ARAGÃO CG, CHÁVEZ-FLORES WB. Valor nutricional do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) cultivado em terra firme da Amazônia Central. *Ver Brás Frut Cruz das Almas* 13(3). Pp: 307-311. 1991. (a)

ANDRADE, S. J. Curvas de maturação e características nutricionais do Camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh, cultivado em terra firme na Amazônia Central Brasileira. Universidade Estadual de Campinas. Dissertação (Doutor em Ciências de Alimentos). Pp: 127. 1991. (b).

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., Arlington: AOAC International, 1995. Method 967.22

ARANHA, F.Q. *et al.*, Normalização dos níveis séricos de ácido ascórbico por suplementação com suco de acerola (*Malpighia glabra* L.) ou farmacológica em idosos institucionalizados. *Rev. Nutr. Campinas*. v.17, (3). Pp: 309-317. 2004.

ARANHA, F.Q.; BARROS, Z. F.; MOURA L. S.; GONÇALVES, M.; BARROS, J.; METRI, J. C.; SOUZA, M. The Role of Vitamin C in organic changes in aged people. *Rev. Nut Campinas*. v 13 (2). Pp: May/Aug 2000.

<http://www.scielo.br/pdf/rn/v13n2/7911.pdf>

ARLIN, MAHAN. Nutrición y dietoterápica. *Ed. Interamericana* - Mc. Graw-Hill. Octava edición. 1995.

ASSUNÇÃO, R.B. & MERCADANTE, A.Z. Carotenoids and Ascorbic Acid from Cashew apple *Anacardium occidentale* L.: Variety and Geographic effects. *Food Chem.* 81. Pp: 495 – 502. 2003.

BARRELA-ARELLANO D, SOARES, EF, AGOSTINI TS, CECHI HM; *IFT Annual Meeting: Book os Abstracts*, June 3-7. Anaheim, Califórnia, USA. 1995

BARREIROS, A.; DAVID, J.; DAVID, J. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Química Nova*.v 29 (1). 2006.

BENASSI, M. T.; ANTUNES, A. J. A comparison of meta-phosphoric and oxalic acids as extractant solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*. v 31. Pp: 507-513. 1988.

BENDICH, A. Physiological Role of Antioxidants in the Immune System. *Journal of Dairy Science* Vol: 76 (9). Pp: 2789 – 2794. 1993.
<http://jds.fass.org/cgi/reprint/76/9/2789.pdf>

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.* Campinas, v. 12 (2). Pp: 123-130. 1999.
<http://www.scielo.br/pdf/rn/v12n2/v12n2a01.pdf>

BSOUL, S.A; TEREZHALMY, G.T. Vitamin C in health and disease. *J Contemp Dent Pract*, 5 (2). Pp: 1-13. 2004.

CALZADA BENZA JC. 143 Frutales nativos. Libreria El Estudiante. La Molina, 314p. 1980

CARR A.; FREI B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 69. Pp: 1086–107. 1999. <http://www.ajcn.org/cgi/content/full/69/6/1086>

CGIAR. Micronutrient Project. *Food and nutrition Bulletin*, vol. 21(4). 2000.

CHEN Z, YOUNG TE, LING J, CHANG SU-C, GALLIE DR (2003). Increasing Vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *PNAS* 100 6: 3525-3530

CLEMENT, C. R.; MÜLLER, C. H. & FLORES, W. B. Recursos genéticos de espécies frutíferas nativas da Amazônia. *Acta Amazonica* 12. Pp: 677-695. 1982.

COSTA CARVALHO, M. J.; TERTO. Q, A.; SANTOS. P, L.; RIVERA. A, M.; MOURA. A, L. Supplementation with West Indian Cherry and its Effects on the Blood levels of Vitamin C and Hemoglobin in Preschool Children. *Revista de Nutrição*. 14(1): Campinas. Pp: 13-20. Jan./abr. 2001. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732001000100003&lng=pt&nrm=iso

- COUTURIER, G.; MAUÉS, M. Biologia floral e fenologia reprodutiva de camu-camu. *Revista Brasileira de Botânica*. V 25. n 4. Pp: 441-448. 2002.
- DAVEY, M. W.; DEKEMPENEER, E.; KEULEMANS, J. Rocket - powered High-performance liquid chromatographic analysis of plant ascorbate and glutathione. *Analytical Biochemistry*. v. 316. Pp. 74 - 81. 2003.
- DAVEY, M. W.; MONTAGU, M.; V.; INZE, D.; SANMARTIN, M.; KANELIS, A.; SMIRNOFF, N.; BENZIE, I. J. J.; STRAIN, J. J.; FAVELL, D.; FLETCHER, J.; Plant. L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.*, v. 80, n. 7. Pp. 825-860. 2000.
- DE ANGELIS, R.C. Compostos Bioativos e Antioxidantes nos Alimentos. *Rev Nutr em Pauta* v 65. Pp: 6-11. 2004.
- DELLAPENNA D. Nutritional Genomics: Manipulating Plant Micronutrients To Improve Human Health. *Science* 285: 375-379. 1999.
- DHARIWAL, R.K., HARTZELL, W.O., LEVINE, M. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid measurements in human plasma and serum. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.54, n.4, p.712-716, 1991

DIB TAXI, C. M. A. Suco de camu-camu (*Myrciaria dubia*) microencapsulado obtido através de secagem por atomização. Tese de Doutorado Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, 2001.

FALADE, J. A. Vitamin C and other chemical substances in cashew apple. *Journal of Horticultural Science*, Ashford. v. 56, n. 2, Pp: 177-179. 1981.

FONSECA, H.; NOGUEIRA, J. N.; MARCONDES, A. M. S. Teor de ácido ascórbico e beta-caroteno em frutas e hortaliças brasileiras. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Venezuela*. v. 19. n. 1, Pp: 9-16. 1969.

FRUSCIANTE, L.; BARONE, A.; CARPUTO, D.; ERCOLANO, M. R.; DELLA ROCCA, F.; ESPOSITO, S. Evaluation and use of plant biodiversity for food and pharmaceuticals. *Fitoterapia* V 71, Supplement 1, Pp: S66-S72. 2000.

GLASER, R.; RABIN, B.; CHESNEY, M.; COHEN, S.; NATELSON, B. Stress induced immunomodulation: implications for infectious diseases. *JAMA* Pp: 281:2268–2270. 1999.

GONZAGA MOTA, D. Alimento nutracêutico: O potencial do camu-camu, *Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh como alternativa de cura e nutrição. Monografia de aperfeiçoamento / especialização na Universidade Federal de Lavras. 2003.

GÜÇLU, K.; SÖZGEN, K. TÜTEM, E.; ÖZYÜREK, M.; APAK, R. Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper (II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals. *Talanta*, In Press, 2004.

HANCOCK, R.; VIOLA, R. Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. *Trends in Biotechnology* 20 (7). July 2002.

HARK, LISA. Vitamin C: Its Role in Health and Prevention. 1998.

www.heartinfo.org

HERMES-LIMA, M. Oxidative stress and medical sciences. In: K.B. Storey;. (Org.). *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Pp. 369-382. 2004.

IMAI T, KARITA S, SHIRATORI GI, HATTORI M, NUNOME T, ÔBA K, HIRAI M. L-galactono-G-lactone dehydrogenase from sweet potato: purification and cDNA sequence analysis. *Plant Cell Physiol* 19(2): 1350-1358 Pp. 1998

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, Selenium and Carotenoids: Applications in Dietary Planning. *National Academy of Sciences. Food and Nutrition Board*. Washington, DC. 2003

INSTITUTE OF MEDICINE. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese,

Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington DC: National Academic Press; 2002. Disponível em: <http://www.nap.edu/ca-talog/10026.html> 2006.

JESSICA A. RADZIO, ARGELIA LORENCE, BORIS I. CHEVONE AND CRAIG L. NESSLER. L-Gulonolactone oxidase expression rescues vitamin C- deficient *Arabidopsis (vtc)* mutants. 2003

JUSTI, K.C.; VISENTAINER, J.V.; SOUZA, N.E. & MATSUSHITA, M. Nutritional composition and Vitamin C stability in stored Camu-camu (*Myrciaria dubia*) pulp. *Arch Latinoam Nutr.* 50: 405 – 408, 2000.

KELLER R, SPRINGER F, RENZ A, KOSSMANN J. Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorilase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence. *Plant J* 19: 131-141 Pp. 1999.

KRELING, J. Estresse oxidativo em sistemas biológicos. Maçã e suas propriedades antioxidantes. Monografia Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer *Am J Med.* 2002. 30;113 Suppl 9B:71S-88S. Review.

LISENBEE, C. S.; LINGARD, M. J.; TRELEASE R. N. Arabidopsis peroxisomes possess functionally redundant membrane and matrix isoforms of monodehydroascorbate reductase. *Plant J.* v 43. Pp: 900 - 914. 2005.

LUDWIG, M.M. A nova rainha da vitamina C: camu-camu saúde e vitalidad. São Paulo: Azul, 1996. p.15-23.

LYNCH, S. R.; COOK. J. D. Interaction of Vitamin C and Iron. *Annals of the New York Academy of Sciences.* V 355. Pp: 32 - .43. December 1980.

MARCHIONI, D. M. L.; SLATER, B.; FISBERG, R. M. Aplicação das Dietary Reference Intakes na avaliação da ingestão de nutrientes para indivíduos. *Revista de Nutrição* v 17. n 2 Campinas Apr./June 2004.

MCVAUGH, R. 1969. Botany of the Guyana highland. Part VIII. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 18(2):55-286.

MENDOZA, O.; PICÓN, C.; GONZÁLES T., J.; CÁRDANAS M.,R.; PADILLA T.; C.; MEDIÁVILLA G., M.; LLERAS, E.; DELGADO DE LA F., F. 1989. Informe de la expedición de recolección de germoplasma de camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K.) en la amazonía peruana. Informe Técnico N°11. Programa de Investigación en Cultivos Tropicales. INIA. Lima. 19p.

MOSER, U.; BENDICH, A. Vitamin C. In: MACHLIN, L. J. Handbook of vitamins. 2. ed. New York: Marcel Dekker Inc. Pp. 195-232. 1991.

MURRAY, R.; GRANNER, D.; RODWELL, MAYES. Bioquímica de Harper. *Ed. Manual Moderno*. 1993.

NAKASONE, H. Y.; MIYASHITA, R. K. & YAMANE, G. M. - Factors affecting ascorbic acid content of the acerola (*Malpighia glabra* L.). *Proceeding American Society Horticultural Science, Alexandria*, v. 89 p. 161-6, mar. 1966

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. Dietary Reference Intakes DRIs for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. 2000.

<http://www.iom.edu/Object.File/Master/21/372/0.pdf>

NESSLER, CRAIG L.; RADZIO, JESSICA A.; LORENCE, ARGELIA.; CHEVONE, BORIS I. L-Gulonolactone oxidase expression rescues vitamin C-deficient *Arabidopsis* (*vtc*) mutants. *Journal Plant Molecular Biology*. V 53 (6). 2003.

NUNES, M.C.N.; BRECHT, J.K.; MORAIS, A.M.M.B.; SARGENT, S.A. Physical and chemical quality characteristics of strawberries after storage are reduced by a short delay to cooking. *Postharvest Biology*, 6: 17-28, 1995.

OSTERGAARD, J.; PERSIAU, G.; DAVEY, M. W.; GAUW, G.; VAN MONTAGU, M. Isolation of a cDNA coding for L-galactono- γ -lactone dehydrogenase, an enzyme

involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. *J Biol Chem* 272: 30009-30016 p. 1997.

PATERAKI, I.; SANMARTIN M, KALAMAKI M, GERASOPOULOS D, KANELIS A.
Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *J of Experimental Botany* 55: 403. 1623 – 1633 Pp. 2004.

PAULING LINUS. 1986. *Papers:* <http://profiles.nlm.nih.gov/search/> e
<http://profiles.nlm.nih.gov/MM/B/B/R/N/>

PETERS, C.M.; VÁSQUEZ, A. Estudios ecológicos de camu-camu (*Myrciaria dubia* L).
Producción de frutos en poblaciones naturales. *Acta Amazonica*, 16/17 (vol. único).
Pp: 161-174. 1988.

PINEDO A, R. Manutenção dos atributos de qualidade do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) desidratado, durante armazenamento. Universidade Estadual de Campinas. Dissertação (Mestre em Engenharia Química). 2002.

PORTELA, MARIA LUZ. Vitaminas y Minerales en Nutrición. *Ed. Lopez*. 1994.

PROENÇA, J.; CUSTÓDIO NOGUEIRA, R.; BURITY, H.; DA SILVA JUNIOR J. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola.

Pesquisa Agropecuária Brasileira. 37 (4). Brasília 2002.

<http://www.scielo.br/pdf/pab/v37n4/9078.pdf>

RIBEIRO, S.I.; MOTA, M. G.; PADINHA, M.L. Recomendações para o Cultivo do Camu camuzeiro (*Myrciaria dubia* H. B. K.) Mc Vaugh no Estado do Pará. Belém. 2002. Embrapa Amazônia Oriental. Circular Técnica, 31. Pp:9. <http://www.cpatu.embrapa.br/online/circular/Circ.tec.31.pdf>

RIBEIRO, S. I.; MOTA, M. G. da C.; SILVA, J.F. da; CORRÊA, M. L. P. Camu-camu a nova modalidade de consumo de vitamina C *In Natura*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. (Embrapa Amazônia Oriental. Recomendações Técnicas, 4).

RIBEIRO, S. I.; MOTA, M. G. da C.; CORRÊA, M. L. P. Banco Ativo de Germoplasma de camucamuzeiro (*Myrciaria dubia* H. B. K.) Mc Vaugh na Amazônia Oriental. 2001. *Comunicação Embrapa Amazônia Oriental CPATU*.

RIBEIRO, S. I.; MOTA, M. G. da C.; CORRÊA, M. L. P. Banco Ativo de germoplasma de camucamuzeiro *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc. Vaugh na Amazônia Oriental. In: Simposio de Recursos Geneticos para America Latina e Caribe - SIGERALC 3. 2001, Londrina. Anais Recursos Genéticos: conservar para a vida. Londrina. 2001.

RIBEIRO, S. I.; CORRÊA, M. L.; MOTA, M. G.; MONTEIRO, L. Avaliação de Acessos de Camucamuzeiro *Myrciaria Dubia* (H. B. K.) Mc. Vaugh oriundos do Alto Solimões.

- File Memória técnica da unidade de Embrapa Amazônia Oriental. Belém no prelo. 2002. http://www.cpatu.embrapa.br/memoria_tecnica/eup_0008.pdf
- RICE, M. E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neuroscience*, v 23. Pp: 209 – 216. 2000.
- RIZZOLO, A. *et al.*, Evaluation of sampling and extraction procedures for the analysis of ascorbic acid from pear fruit tissue. *Food Chemistry*, v. 77, p. 257-262. 2002.
- ROCA, N. A. Estudio químico bromatológico de la *Myrciaria paraensis* (Berg). Tesis de Grado. Facultad de Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú 1965.
- RODRÍGUEZ LÓPEZ, GUADALUPE. Nutrientes Antioxidantes como Agentes Preventivos de Cáncer, una revisión. *RESPYN Revista de Salud Pública y Nutrición*. v 7 (3). Julio – Setiembre. 2006
- ROQUE, P. O Camu-camu. *Manchete Rural*. 88: 47 – 47. 1994.
- SANCHEZ – MORENO, C.; PLAZA, L.; DE ANCOS, B. & CANO, M.P. Vitamin C, provitamin A carotenoids, and other carotenoids in high pressurized orange juice during refrigerated storage. *J. Agric. Food Chem.* 51: 647 – 653. 2003.

SANTOS DA ROSA, J. Desenvolvimento de um método rápido para análise de vitamina C por Cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna de troca iônica. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Rio de Janeiro. 2005.

SIQUEIRA EGLE.; GONÇALVES DE ALMEIDA, S.; ARRUDA, S. The Adverse role of Iron in the Organism. Artigo de revisão. *Comunicação Ciências da Saúde*. v 17 (3). Pp: 227-234. 2006.

SIENDONES E, GONZÁLEZ-REYES JA, SANTOS-OOCANA NAVAS P, CÓRDOBA F. Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean; L-galactono -lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. *Plant Physiol* 120: 907-912 Pp. 1999.

SILVA, L. M. Estudo de Genes Expressos em Frutos de Camu-camu: Seqüenciamento de ESTs. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal do Amazonas. 120 p, 2006

SMIRNOFF.; N, WHEELER G.L. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *CRC Crit Rev Plant Sci* 19:267-90; *CRC Crit Rev Biochem Mol Biol* 35: 291-314 Pp. 2000.

SOUZA FILHO, M.; LIMA, RJ.; NASSU, TR.; BORGES M. Physico-chemical and Sensory Characterization of Nectars from Native Fruits from the North and

Northeast of Brazil: Exploratory Study. *Brazilian Journal of Food Technology*., 5:139-143, 2002.

STONE, I. Fifty years of research on ascorbate and the genetics of scurvy. *Orthomolecular Psychiatry*, v. 13, n. 4. Pp. 280-286. 1984.

STROCKER, K.; HENNING, H. M. Análisis de vitaminas: métodos comprobados. Madrid: Paz Montalvo, 1967, 428p.

TEIXEIRA, A. S.; CHAVES, L. da Silva.; YUYAMA, K. Esterases for examining the population structure of Camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh-Myrtaceae). *Acta Amazônica*. 34 (1). Manaus. 2004

TERADA, M.; WATANABE, Y.; KUNITOMA, M.; HAYASHI, E. Differential rapid analysis ascorbic acid and ascorbic acid 2-sulfate by dinitrophenylhydrazine method. ***Annals of Biochemistry*, 4: 604-8, 1979**

VANDAMME EJ. Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. *J Chem Tech Biotechnol* 53. Pp: 313-327. 1992.

VILAS BOAS, E. V. DE B. Nutrição Humana e Saúde – Alimentos e nutrientes. Lavras: UFLA/FAEPE/DCA. v. 1, p. 56-58. 1999

VILLACHICA, H. El cultivo del camu-camu (*Myrciaria dubia* H. B. K. Mac Vaugh) en la Amazonía Peruana. Tratado de Cooperación Amazónica - TCA: UNDP: UNAMAZ. Lima – Perú. 1996. 95p.

VIOLA, R.; HAUPT, S.; HANCOCK, R.; McRAE, D. Synthesis of L-ascorbic acid in the Phloem. *BMC Plant Biology*. 3. Pp: 1 – 13. 2003.
<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/3/7>

VISENTAINER, J.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E. & VIEIRA, O.A. Caracterização Físico – química de Acerola *Malpighia glabra* L. produzida em Maringá, Paraná, Brasil. *Arch Latino Am Nutr*. 47: 70 – 72, 1997.

WALTZ, B *et al.*, A 4-wk intervention with high intake of carotenoid-rich vegetables and fruit reduces plasma C-reactive protein in healthy, nonsmoking men. *Am J Clin Nutr*, Karlsruhe, v. 82 (5). Pp: 1052-1058. 2005. <http://www.ajcn.org/cgi/reprint/82/5/1052>

WELCH, R.W.; WANG, Y.A.; CROSSMAN, J.B.; JR, PARK K.L.; KIRK AND M, LEVINE. Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. *J Biol Chem*.;v 270 (21). Pp: 12584-92. 1995.

WHEELER, G. L.; JONES, M. A.; SMIRNOFF, N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393: 365-369 Pp. 1998.

WOODALL, A. A.; AMES, B. N. Diet and oxidative damage to DNA: The importance of ascorbate as an antioxidant. In: PACKER, L.; FUCHS, J. Eds. Vitamin C in Health and Disease, Vitamin C in health and disease. New York. Marcel Dekker Inc. Pp: 193–203. 1997

YUYAMA, K.; AGUIAR, J. L. P.; YUYAMA, K. L. O.; SILVA, I. A. Variabilidade genética de camu-camu silvestre da Amazônia. Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe. *Resumo*. Pp: 459-461. 2001.

YUYAMA, K.; AGUIAR, J. P. L.; YUYAMA, K. L. O.; Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. *Acta Amazônica* 32(1): Pp: 169-174 2002.

YUYAMA, K. L. O. YUYAMA, K.; AGUIAR, J. P. L.; LOPES, T. M.; FÁVARO, D. I. T.; BERGL, P. C. P.; VASCONCELOS, M. B. A. Teores de elementos minerais em algumas populações de camu-camu. *Acta Amazônica* 33 (4). Pp: 549 – 554.

YUYAMA, K. & SIQUEIRA, J.A.S. Efeitos do tamanho da semente e do recipiente no crescimento de mudas de camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Acta Amazonica* 29. Pp: 647-650. 1999

ZANATTA, C. F.; CUEVAS, E.; BOBBIO, F. O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE A. Z. Determination of Anthocyanins from Camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. *J. Agric. Food Chem.* **53** (24). Pp: 9531 -9535. 2005.

ZAPATA, S. M.; DUFOUR, J. P. Camu-camu *Myrciaria dubia* (H. B. K.) Mc Vaugh
Chemical composition of fruit. Journal Science Food Agriculture. 61. Pp: 349 – 351.
1993.

APÊNDICE

Preparação das Soluções para o Método titulométrico de Tillman:

Solução de Tillman (DFI – 2,6 dicloro fenol indofenol 0,02%): 0,05 g de DFI foi triturado em gral ou almofariz com pequenas quantidades de água destilada aquecida (60 °C) e em seguida filtrado por uma vez (papel de filtro sem coloração azul) e coletado em balão volumétrico de 250 ml, alcançando por tanto como volume final 250 ml.

Quando tudo esteve triturado e filtrado, juntaram-se as últimas porções de água 0,031 g de NaHCO_3 (bicarbonato de sódio anhidro), filtrou-se e completou-se o volume.

Solução de ácido oxálico 0,5%: 5 g de ácido oxálico foram dissolvidos inicialmente em 500 ml de água destilada, posteriormente foi transferido para balão volumétrico e ajustou-se o volume a 1000ml. A solução foi armazenada em geladeira.

Solução padrão de ácido ascórbico: 0,025 g de ácido ascórbico de Sigma 99% de pureza, pesado em balança analítica, foi dissolvido em 200 ml de ácido oxálico 0,5% (gelado), transferido para balão volumétrico e o volume foi ajustado com ácido oxálico 0,5% para 500ml.