

## METODOLOGIA SIMPLIFICADA PARA DOSEAMENTO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM EXTRATOS VEGETAIS

LIZIERO, Daniele Franquini Perez.- Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, SP, Brasil.; CHIARI-ANDRÉO, Bruna Galdorfini. - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, SP, Brasil, Docente da Universidade de Araraquara (UNIARA), Araraquara, SP, Brasil;

KARAHASANOVIC, Amra. - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, SP, Brasil., International University of Sarajevo, Bósnia e Herzegovina; SPAGNOL, Caroline Magnani. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, SP, Brasil; CORRÊA, Marcos Antonio., Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, SP, Brasil.

ISAAC, Vera Lucia Borges. - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, SP, Brasil.

Recebido em: 28/08/2017  
Aprovação final em: 21/09/2017

### RESUMO

Extratos vegetais com ação antioxidante são cada vez mais procurados para o desenvolvimento de cosméticos antienvhecimento. Alguns dos antioxidantes amplamente encontrados nesses extratos são os compostos fenólicos, entre eles os flavonoides, além de ácidos orgânicos, como os ácidos ascórbico, cítrico e gálico. A vitamina C, ou ácido ascórbico (AA), apresenta grande instabilidade química, portanto, a determinação quantitativa do AA em formulações e extratos vegetais é de grande importância e se tornou um desafio para a área cosmética. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo estudar a viabilidade de uso da metodologia farmacopeica de doseamento de AA para aplicação em extratos vegetais, com o intuito de indicar um método que o determinasse de forma simples e seletiva em matrizes vegetais complexas, visto que este é um importante componente antioxidante destes extratos. Para comprovar a seletividade pelo AA, soluções de ácido gálico, cítrico e quercetina a 10% também foram avaliadas pela metodologia. A partir deste ensaio foi comprovada a eficiência do método para a quantificação da solução de AA, assim como descrito pela Farmacopéia Brasileira. O AA foi determinado e as outras substâncias antioxidantes não interferiram nos resultados, isso porque o iodo reagiu com o amido presente em solução logo no início da titulação, caracterizando o teste como seletivo para AA. O método foi considerado linear, preciso e robusto. Ao final deste estudo foram obtidas evidências de que este método pode ser utilizado para quantificação da vitamina C em extratos vegetais de maneira simples e rápida, auxiliando na pesquisa, desenvolvimento e controle de qualidade de fitocosméticos e fitoterápicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ácido ascórbico; Doseamento; Iodimetria; Extratos vegetais.

### SIMPLIFIED METHODOLOGY TO QUANTIFY ASCORBIC ACID IN PLANT EXTRACTS

#### ABSTRACT

Plant extracts with antioxidant activity are increasingly studied for the development of anti-aging cosmetics. Some of the antioxidant substances widely found in these plant extracts are phenolic compounds, such as flavonoids, besides organic acids as ascorbic, citric and gallic acids. Vitamin C, or ascorbic acid (AA), is highly unstable, thus, the quantitative determination of AA in plant extracts and formulations has been a challenge for the Cosmetology. Based on the exposed, this study aimed to investigate the feasibility of using a pharmacopoeia methodology of dosage of AA for use in plant extracts, in order to

indicate a method that would determine the amount of AA in complex matrices, such as plant extracts, in a simple and selective method, since AA is an important antioxidant component of plant extracts. To prove the selectivity by AA, 10% solutions of gallic acid, citric acid and quercetin were evaluated by this methodology. Considering these results it is possible to confirm the efficiency of the method for the quantification of AA solution, as described in Brazilian Pharmacopoeia. The amount of AA was determined and the other antioxidant substances did not interfere in the results, since the iodine reacted with the starch present in solution at the beginning of the titration, characterizing this method as selective for AA. The method was considered linear, precise and robust. At the end of this study, evidences were obtained that this method could be used for the quantification of vitamin C in plant extracts in a fast and simple manner, helping in the research and quality control of phytocosmetics and phytotherapies.

**KEYWORDS:** Ascorbic acid; Dosage; Iodimetry; Plant extracts.

#### INTRODUÇÃO

A ação dos radicais livres sobre a pele é prejudicial, uma vez que promove danos celulares. Este processo promove o surgimento de características inestéticas, acelera o envelhecimento e pode, até mesmo, provocar o surgimento de patologias. Neste sentido, os cosméticos contendo substâncias ativas antioxidantes estão sendo amplamente estudados, visando à proteção da pele contra os danos deletérios promovidos por estas espécies reativas (RODRIGUES, 2003).

Dentre estas substâncias capazes de sequestrar os radicais livres, neutralizando seu efeitos, estão as vitaminas (vitaminas E e C), metabólitos secundários de plantas e os extratos vegetais.

Nos extratos vegetais, a quercetina e os ácidos ascórbico, cítrico e gálico são substâncias constantemente encontradas e que,

*Metodologia simplificada para doseamento...*

reconhecidamente, exercem efeito antioxidante.

A quercetina é um flavonóide amplamente distribuído no reino vegetal. Os flavonóides atuam como antioxidantes por inativarem os radicais livres, tanto em compartimentos celulares lipofílicos, quanto hidrofílicos (HARTMAN & SHANKEL, 1990; ARORA et al., 1998).

O ácido gálico também possui um potencial antioxidante bem caracterizado. Em um estudo realizado em ratos com senescência acelerada e suplementados com ácido gálico, foi verificado que, além de restabelecer a atividade das enzimas antioxidantes CAT e GPx, houve redução da peroxidação lipídica (LI et al., 2005).

O ácido cítrico é um ácido orgânico tricarbóxico presente na maioria das frutas, sobretudo em frutas cítricas, como o limão e a laranja. Age como agente quelante/sequestrante por complexar íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. É utilizado como conservante natural pela sua atividade antioxidante (BAILEY, 1996).

A vitamina C, também chamada de ácido ascórbico (AA), está envolvida em importantes processos metabólicos do corpo humano, como na formação de hidroxiprolina, hidroxilisina, adrenalina, serotonina, ácido homogentísico e carnitina. Além disso, é co-fator enzimático e participa de processos de oxidorredução, aumentando a absorção de ferro e a inativação de radicais livres (PADH, 1991).

A vitamina C aplicada topicamente é capaz de minimizar a resposta inflamatória da pele quando exposta à luz solar (FUCHS & KERN, 1998). Jagetia et al. (2003) demonstraram que esta substância é capaz de reduzir a peroxidação lipídica na pele promovida pela radiação gama. Também, é empregada como clareador cutâneo, pois é capaz de inibir a enzima tirosinase. No entanto, essa vitamina não pode ser sintetizada pelos seres humanos e, por isso, é necessário obtê-la por fontes externas, como a alimentação, a suplementação vitamínica ou, até mesmo, com o uso produtos de uso tópico (TSUMURA et al., 1993, ROSA et al., 2007).

Apesar de todas essas propriedades, o AA é altamente instável, o que dificulta sua aplicação industrial. O tipo de processamento, as características dos produtos, as condições de estocagem e de embalagem, oxigênio, luz, catalisadores metálicos, enzimas, pH e as características dos produtos são fatores que podem estar relacionados com a degradação do AA (TANAKA, 2007; ZERDIN et al., 2003, SALVADOR et al., 2016).

A determinação do AA em formulações farmacêuticas e extratos vegetais tem sido um desafio para o controle de qualidade da área cosmética, com diversos estudos a este respeito (Rocha-Filho, 1997), assim como de outras áreas da Ciência, como o estudo de alimentos (Silva et al., 2017) e de matrizes biológicas (BI et al., 2016; BAGHERI et al., 2017; ABELLÁN-LLOBREGAT et al., 2017). Essa dificuldade tem despertado o interesse da comunidade científica em desenvolver novas metodologias, que sejam mais específicas, sensíveis, exatas e de fácil realização (BI et al., 2016; BAGHERI et al., 2017; ABELLÁN-LLOBREGAT et al., 2017; (SILVA et al., 2017).

Metodologias de maior custo, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e o uso de sensores específicos, podem ser empregadas mas, nem sempre, estão disponíveis para uso. Assim como métodos espectrofotométricos que, apesar de simples, requerem equipamento específico (SILVA et al., 2017). Rocha-Filho, em 1997, avaliou a disponibilidade do AA a partir de emulsões múltiplas A/O/A, em diferentes condições, variando umectantes e tensoativos. Nos sistemas estudados, o autor verificou, via espectrofotométrica em ultravioleta, grande potencial de aplicação para liberação controlada de princípios ativos introduzidos na fase intermediária da emulsão múltipla.

A iodimetria é um método descrito na Farmacopéia Brasileira (2010) para quantificações laboratoriais de AA. Tem a vantagem de ser uma técnica simples, rápida e acessível. Neste método, o AA provoca a redução do iodo a iodeto que em

solução aquosa é incolor. O iodo reduzido não pode reagir com a molécula de amido mas, quando ocorre o consumo total das moléculas de AA, ou quando não há AA em solução, as moléculas de iodo, em presença de iodeto, reagem com as macromoléculas de amido formando complexos de adsorção com os íons triiodeto, conferindo coloração azul intensa à mistura de reação (MAGNANI et al., 2011).

Isto ocorre porque o amido é uma substância formada por dois constituintes chamados de: amilose, solúvel em água e amilopectina, insolúvel em água. A amilose é uma parte do amido que dá a cor azul intensa, quando reage com as moléculas de iodo, formando o complexo de amido-iodo (MAGNANI et al., 2011).

Devido ao fato de a iodimetria ser baseada em uma reação de oxidação, é de grande valia avaliar se outros compostos antioxidantes presentes em extratos vegetais, de composição complexa, poderiam interferir na seletividade do método para o AA, para, então, definir a viabilidade deste método ser utilizado na determinação de AA em extratos vegetais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Titulação do ácido ascórbico

A Farmacopéia Brasileira (2010) indica o método iodimétrico para determinação de ácido ascórbico em medicamentos. Segundo este método, deve ser preparada uma solução de ácido ascórbico da qual devem ser retirados 2 mL, para serem adicionados a 100 mL de água, 25 mL de ácido sulfúrico 10% (p/v) e 1 mL de amido. Posteriormente à preparação, a solução deve ser titulada com iodo 0,05 M (Farmacopéia Brasileira, 2010, Magnani et al., 2011).

Para o preparo da solução de iodo foram pesados 13 g e adicionados 100 mL de solução de iodeto de potássio (KI) a 20%. Em seguida, o volume da solução foi completado para 1 litro com água.

Para o desenvolvimento deste estudo, foi efetuada a quantificação de uma solução a 1% de AA. Em seguida, foram realizadas três titulações, com ácido cítrico, ácido gálico e quercetina, substâncias reconhecidamente antioxidantes,

comumente encontradas em extratos vegetais, que poderiam agir como interferentes no método iodimétrico, fornecendo resultados falso-positivos.

### Titulação do ácido cítrico, ácido gálico e quercetina

Uma solução a 1% de ácido cítrico foi preparada e, desta solução, 2 mL foram adicionados a 100 mL de água e 25 mL de ácido sulfúrico a 10% (p/v) e 1 mL de amido. Em seguida, a solução foi titulada com iodo 0,05 M.

Este mesmo procedimento também foi realizado para o ácido gálico e para a quercetina.

Ao término das titulações, foi realizada a padronização do iodo 0,05M.

### Padronização do Iodo

Em um erlenmeyer, foram colocados 5 mL da solução de iodo 0,05 M, 5 mL de solução de KI a 4%, 1 mL de ácido acético glacial e 1 mL de amido. Este sistema foi titulado com tiosulfato de sódio (6,2379 g/200 mL). O tiosulfato de sódio também foi padronizado.

### Padronização do tiosulfato de sódio

Em um erlenmeyer, foram adicionados 5 mL de KI 20%, 5 mL HCl 6 N, 5 mL de KBrO<sub>3</sub> (2,79.10<sup>-3</sup> mg/mL), utilizado como padrão primário e 1 mL de amido. Esta solução foi titulada com tiosulfato de sódio.

### Determinação da linearidade, robustez e precisão do método

Para verificação da adequabilidade do método em quantificar AA em extratos vegetais, o extrato de *Psidium guajava* L. foi utilizado como modelo. Este extrato foi preparado com 50 g de material vegetal seco, obtido a partir das frutas de goiaba previamente desidratadas e pulverizadas. O extrato foi preparado durante 120 horas, pelo método de percolação, utilizando 1,5 L de etanol 70% (v/v). O volume do extrato obtido foi reduzido a 200 mL com auxílio de rotaevaporador (temperatura máxima de 60 °C) (CHIARI et al., 2012).

Para a determinação da linearidade do método, uma curva analítica foi preparada. Para isto, o extrato fluido obtido foi avaliado em diferentes volumes: 0,5 a 4,0 mL, usando a mesma metodologia farmacopeica descrita anteriormente. A curva analítica foi preparada através da média e desvio padrão de 9 determinações, realizadas em triplicata em 3 experimentos independentes. Por meio de regressão linear, a equação que descreve a relação entre o volume de extrato utilizado e a massa de AA foi obtida, além do coeficiente de linearidade (BRASIL, 2003).

A precisão do método analítico foi determinada em dois níveis: repetibilidade (duas análises realizadas em períodos diferentes no mesmo dia) e precisão intermediária (duas análises realizadas no mesmo período, contudo em dias diferentes). Após as quantificações, em triplicata para 3 volumes diferentes de extrato, o desvio padrão relativo (DPR) foi calculado (DPR = [(Desvio padrão/ Concentração média determinada) x 100]). O método deve ser considerado preciso quando não excede 5% (BRASIL, 2003).

Finalmente, a robustez do método foi avaliada submetendo-o à alteração da temperatura em que o ensaio foi realizado. As titulações foram realizadas em sala fria (20 °C) e comparadas com os resultados obtidos à temperatura ambiente, ambos realizados em triplicata (BRASIL, 2003).

### Análise dos resultados

Os resultados foram analisados por meio do Software GraphPad Prism 5, utilizado, inclusive, para plotagem e regressão linear da curva analítica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Titulação do ácido ascórbico

Os resultados obtidos na quantificação da solução de AA estão descritos na Tabela 1.

Para o cálculo da porcentagem de ácido ascórbico presente nas soluções, os seguintes dados foram utilizados:

- Normalidade do KBrO<sub>3</sub> = 0,101
- Normalidade do tiosulfato = 0,127
- Normalidade do iodo que reagiu com tiosulfato = 0,082

**Tabela 1** - Resultados da quantificação de AA em solução a 1% (massa teórica = 0,02g).

Volume titulado	N iodo*	Massa de AA (g)	% de AA**
2,7 mL	0,082	0,0194	97,17
2,75 mL	0,082	0,0198	98,97
2,75 mL	0,082	0,0198	98,97
		<b>Média</b>	<b>98,37</b>
		<b>Desvio padrão</b>	<b>1,04</b>

\* N iodo: normalidade do iodo.

\*\* em relação à concentração teórica.

A porcentagem média detectada correspondeu a 98,37% da concentração teórica de AA em solução. A variação inferior a 5% pode ser compreendida como um indicativo da exatidão do método, considerando a exatidão como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito (BRASIL, 2003).

#### Titulação do ácido cítrico, ácido gálico e quercetina

Em relação às titulações realizadas com as substâncias antioxidantes comumente encontradas na composição de extratos vegetais, não foram verificados resultados falso positivos. O iodo presente reagiu com o amido logo no início da titulação, desenvolvendo a coloração azul na solução. Desta forma, foi possível verificar que, desde o menor volume de iodo titulado, o ponto de viragem foi visualizado.

Com base nestes primeiros resultados obtidos foi possível comprovar a eficiência do método estudado para a quantificação das soluções de AA, assim como descrito pela Farmacopéia Brasileira, uma vez que a porcentagem de ácido ascórbico quantificada apresentou variação menor que 3% em relação à concentração teórica.

Em relação às titulações realizadas com as substâncias antioxidantes comumente encontradas na composição de extratos vegetais, os resultados obtidos demonstraram que não há interferência destas substâncias no método iodimétrico para a quantificação do AA, uma vez que não foram detectadas.

Estes resultados preliminares indicam viabilidade de utilização deste método na quantificação de

ácido ascórbico em extratos vegetais para serem utilizados em fitocosméticos ou fitoterápicos.

Outros métodos já foram desenvolvidos com a mesma finalidade; entretanto, a maioria emprega recursos tecnológicos de alto custo, como a cromatografia líquida de alta eficiência (Rosa et al., 2007). Sendo assim, utilizar um método titulométrico de baixo custo e de fácil desempenho seria vantajoso principalmente para doseamentos de rotina, ou mesmo para casos em que recursos de alto custo não estão disponíveis, como nas farmácias magistrais, por exemplo.

#### Determinação da linearidade, robustez e precisão do método

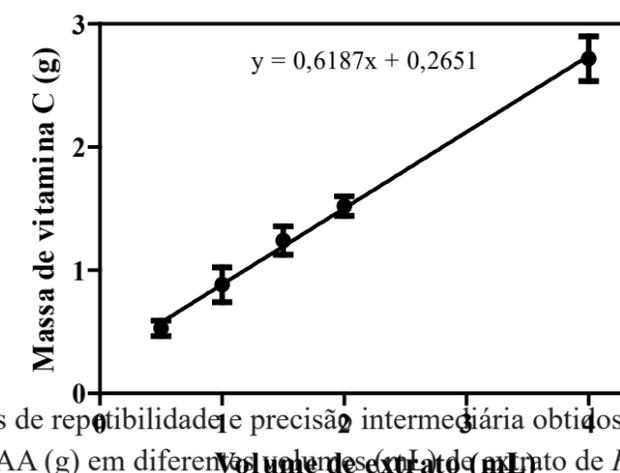
A validação de uma metodologia analítica é requerida quando um novo método é proposto, ou quando alterações na metodologia original são realizadas, uma vez que podem alterar parâmetros na metodologia previamente validada (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Neste estudo, um extrato vegetal modelo foi empregado, para avaliação da linearidade, precisão e robustez do método de quantificação do AA.

O extrato escolhido foi o preparado com etanol 70% das frutas desidratadas de *Psidium guajava* L. Ele contém substâncias bioativas com propriedades antioxidantes e antibacterianas, além de ácido ascórbico, podendo, portanto, ser amplamente empregado na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos (IHA et al., 2008; CHIARI et al., 2012).

A curva analítica obtida por meio da análise da massa de AA em diferentes volumes do extrato está apresentada na Figura 1.

**Figura 1** - Curva analítica demonstrando a

linearidade do método de quantificação de vitamina C (AA) em extratos vegetais.

**Tabela 2** - Resultados de repetibilidade e precisão intermediária obtidos com a determinação da massa de AA (g) em diferentes volumes de extrato (mL) de *P. guajava* L.

Volume (mL)	Repetibilidade	Precisão intermediária
	Média (g) ± Desvio padrão	Média (g) ± Desvio padrão
	DPR (%)	DPR (%)
4mL	0,0027 ± 0,000126 4,6720	0,0027 ± 0,000132 4,7656
5mL	0,0038 ± 0,000182 4,7851	0,0039 ± 0,000175 4,4095
6mL	0,0046 ± 0,000164 3,5677	0,0045 ± 0,000221 4,8877

**Tabela 3** - Resultados que comprovam a robustez do método, obtidos com a determinação da massa de AA (g) em diferentes volumes (mL) de extrato de *P. guajava* L., avaliada em diferentes condições de temperatura.

Volume (mL)	Média (g) ± Desvio padrão DPR (%)
0,5 mL	0,000515 ± 0,0000228 4,4262
5 mL	0,003864 ± 0,000193 4,9946
6 mL	0,004835 ± 0,000159 3,3053

Um coeficiente de correlação superior a 0,99 foi calculado, demonstrando que o método é linear nos diferentes volumes avaliados (0,5 a 4,0 mL), para a quantificação de AA no extrato vegetal (BRASIL, 2003).

De acordo com a Tabela 2, que apresenta os resultados de repetibilidade e precisão intermediária,

o método foi considerado preciso, uma vez que o DPR foi inferior a 5% em todos os níveis testados (BRASIL, 2003).

E, finalmente, o método foi considerado robusto (BRASIL, 2003), como pode ser verificado nos dados apresentados na Tabela 3. Isto pode ser afirmado uma vez que os valores de DPR não ultrapassaram 5% (BRASIL, 2003).

#### CONCLUSÃO

A facilidade de execução, baixo custo e fácil acesso aos reagentes necessários permite propor o método farmacopeico titulométrico de quantificação de AA para a sua quantificação em extratos vegetais complexos. De acordo com este estudo, este método é seletivo, linear, preciso e robusto, podendo ser empregado para quantificação de AA em extratos vegetais. Esta proposta pode auxiliar na pesquisa, desenvolvimento e controle de qualidade de fitocosméticos e fitoterápicos.

#### AGRADECIMENTOS

PIBIC-CNPq, CAPES, FUNDUNESP, PADCF-UNESP.

#### REFERÊNCIAS

ABELLÁN-LLOBREGAT, A.; VIDAL, L.; RODRÍGUEZ-AMARO, R.; BERENQUER-MURCIA, A.; CANALS, A.; MORALLÓN, E. Au-IDA microelectrodes modified with Au-doped graphene oxide for the simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid in urine samples. **Electrochimica Acta**, v.227, p. 275-284, 2017.

ARORA, A.; MURALEEDHARAN, G.N.; STRASBURG, GM. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.24, n.9, p.1355-1363, 1998.

BAILEY, A.E. **Bailey's industrial oil and fat products**. 5th ed., vol.3, New York: John Wiley;

1996.

BAGHERI, H.; PAJOOHESHPOUR, N.; JAMALI, B.; AMIDI, S.; HAJAIN, A.; KHOSHSAFAR, H. A novel electrochemical platform for sensitive and simultaneous determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SnO<sub>2</sub>-Gr ternary nanocomposite. **Microchemical Journal**, v.131, p.120-129, 2017.

BI, H.; DUARTE, C.M.; BRITO, M.; VILAS-BOAS, V.; CARDOSO, S.; FREITAS, P. Performance enhanced UV/Vis spectroscopic microfluidic sensor for ascorbic acid quantification in human blood. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 568-572, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº899, de 29 de março de 2003.

CHIARI, B. G.; SEVERI, J. A.; PAULI-CREDENDIO, P.A.; SYLOS, C.M.; VILEGAS, W.; CORREA, M.A.; ISAAC, V.L.B. Assessment of the chemical profile, polyphenol content and antioxidant activity in extracts of *Psidium guajava* L. fruits. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 331-336, 2012.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. Ed., São Paulo: Atheneu, 2010. v.2.

FUCHS, J.; KERN, H. Modulation of UV-light-induced skin inflammation by D-alpha-tocopherol and L-ascorbic acid: a clinical study using solar simulated radiation. **Free Radical Biology and Medicine**, v.25, n.9, p.1006-1012, 1998.

HARTMAN, P.E.; SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.15, n.3, p.145-182, 1990.

IHA, S.M.; MIGLIATO, K.F.; VELLOSA, J.C.R.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B.; BRUNETTI, I.L.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 18, n.3, p. 387-393, 2008.

JAGETIA, C.G.; RAJANIKANT, G.K.; RAO, S.K.; BALIGA, M.S. Alteration in the glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and lipid peroxidation by ascorbic acid in the skin of mice exposed to fractionated  $\gamma$  radiation. **Clinica Chimica Acta**, v.332, n.1-2, p.111-121, 2003.

LI, L.; NG, T.B.; GAO, W.; LI, W.; FU, M.; NIU, S.M.; ZHAO, L.; CHEN, R.R.; LIU, F. Antioxidant activity of gallic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. **Life Sciences**, v.77, n.2, p.230-40, 2005.

MAGNANI, C.; FERREIRA, G.A.; CHIARI, B.G.; BATISTUTTI, J.P.; CORRÊA, M.A.; ISAAC, V.L.B.; SALGADO, H.R.N. Estabilidade química e comportamento reológico de emulsão contendo ácido ascórbico. **Revista Técnica do Farmacêutico**, v.3, p.14-19, 2011.

PADH, H. Vitamin C: never insights into its biochemical functions. **Nutrition Reviews**, v.49, n.3, p.65-70, 1991.

ROCHA-FILHO, P.A. Disponibilidade do ácido ascórbico a partir de emulsões múltiplas O/A/O. Tese de livre docência (não defendida). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo, Universidade de São Paulo – USP, 1997.

RODRIGUES, H.G.; DINIZ, Y.S.; FAINE, L.A.; ALMEIDA, J.A.; FERNANDES, A.A.H.; NOVELLI, E.L.B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Rev. Nutr.**,

v.16, n.3, p.315-320, 2003.

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

SALVADOR, M.P.; OSHIRO JUNIOR, J.A.; CHIARI-ANDRÉO, B.G. Influência do material de embalagem na estabilidade de formulação cosmética contendo vitamina C. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v.19, p.38-52, 2016.

SILVA, T.L.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAZALLI, M.R.; KAMIMURA, E.S.; MALDONADO, R.R. Comparison between titrimetric and spectrophotometric methods for quantification of vitamin C. **Food Chemistry**, v.224, p.92-96, 2017.

TANAKA, D.L. Influência da desidratação por spray dryer sobre o teor de ácido ascórbico no suco de acerola (*Malpighia* ssp). [Dissertação]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas- UNESP; 2007.

TSUMURA, F.; OHSAKO, Y.; HARAGUCHI, Y.; KUMAGAI, H.; ISHI, K. Rapid enzymatic assay for ascorbic acid in various foods using peroxidase. **J. Food Sci.**, v.58, n.3, p.619-623, 1993.

ZERDIN, K.; ROONEY, M.L.; VERMUE, J. The vitamin C content orange juice packed in an oxygen scavenger material. **Food Chem.**, v.82, p.387-389, 2003.