

## VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE QUATRO ÁCIDOS ORGÂNICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM POLPAS DE FRUTAS CONGELADAS

José Soares dos Santos\*, Maria Lúcia Pires dos Santos e Alana dos Santos Azevedo

Departamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Estrada do Bem Querer, km 4, CP 95, 45083-900 Vitória da Conquista – BA, Brasil

Recebido em 26/06/2013; aceito em 28/10/2013; publicado na web em 03/02/2014

VALIDATION OF METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF FOUR ORGANIC ACIDS IN FROZEN FRUIT PULP BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. Validation of a rapid method for the determination of ascorbic, citric, fumaric and tartaric acids in stored pulp fruit and its application as a quality parameter was performed. The validation parameters showed that for the four evaluated acids, the method presented low limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), indicating good precision and accuracy, thus representing an important tool for quality assessment of stored fruit pulp. The results showed that the concentration of organic acids generally decreased with longer storage time in the fruit pulp under study. Amongst all the organic acids under investigation, ascorbic proved the least stable.

Keywords: HPLC-UV; stored fruit pulp; organic acids.

### INTRODUÇÃO

No Brasil, a fruticultura desempenha um importante papel na geração de renda no meio rural. Entretanto, a maior parte da produção é desperdiçada no local da colheita. Para viabilizar o aproveitamento da produção excedente, o processamento da fruta na forma de polpa congelada surgiu como um importante segmento da cadeia produtiva, pois propicia a sua comercialização no período de entressafra com as características nutricionais e organolépticas praticamente inalteradas.<sup>1-3</sup>

Devido à ausência de conservantes, aromatizantes e acidulantes sintéticos, as polpas de fruta vêm conquistando mercados em substituição ao consumo de refrigerantes e sucos industrializados. Além do consumo *in natura*, o produto é utilizado também como matéria-prima para fabricação de iogurtes, sorvetes, refrescos e doces.<sup>4,5</sup>

A partir da década de 1990 o Brasil se estabeleceu como o maior produtor e exportador de polpa de frutas tropicais, propiciando um grande aumento do consumo desse produto por milhões de pessoas no mundo. Com isso, fica evidente a necessidade de um controle de qualidade das polpas congeladas, particularmente durante o período de armazenamento.<sup>6</sup>

A polpa congelada é normalmente armazenada a uma temperatura de -18 °C por um período máximo de seis meses.<sup>7,8</sup> Entretanto, devido a problemas relacionados com a condensação do ar que circula nas câmaras de armazenamento, pode ocorrer a perda da textura, aroma, sabor e cor das polpas. Os ácidos orgânicos são os componentes mais importantes na formação dessas propriedades nas frutas. A determinação desses ácidos permite avaliar o processo de maturação das frutas e de frescor dos sucos e polpas.<sup>9,10</sup>

Vários métodos para avaliação de ácidos orgânicos estão disponíveis na literatura especializada, como por exemplo: espectrofotometria molecular, eletroforese capilar e cromatografia gasosa. Entretanto, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica mais empregada pela simplicidade, rapidez e estabilidade do método.<sup>2,11-13</sup> Pode-se destacar dois estudos que relatam o uso dessa técnica na avaliação dos teores de ácidos orgânicos em bebidas. Um utilizou CLAE na determinação dos ácidos tartárico,

málico, ascórbico e cítrico em polpas de acerola, açai e caju<sup>2</sup> e o outro utilizou a mesma técnica na determinação dos ácidos tartárico, málico, láctico e succínico em amostras de vinho.<sup>13</sup> O primeiro estudo avaliou também a estabilidade do suco de caju com base nas variações das concentrações dos ácidos orgânicos durante 14 dias de estocagem.<sup>2</sup>

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivos: (a) desenvolver um método para separar e determinar simultaneamente os ácidos ascórbico, cítrico, fumárico e tartárico em uma variedade de polpas de frutas congeladas utilizando CLAE com detector UV; (b) avaliar a influência do tempo de estocagem na qualidade das polpas de fruta tropicais produzidas e comercializadas no Sudoeste da Bahia, Brasil.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Coleta e conservação das amostras

Um conjunto de 60 amostras de polpas das frutas congeladas utilizadas neste trabalho foi obtido em supermercados da cidade de Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. Foram selecionadas 15 unidades de um mesmo lote de polpas de cada uma das quatro frutas (abacaxi, cacau, goiaba e umbu), visando realizar seis medições periódicas dos teores dos ácidos orgânicos ao longo de 300 dias. As amostras foram armazenadas na própria embalagem em que é comercializada (filme plástico contendo 100 g), e mantidas congeladas sob temperatura de aproximadamente -20 °C. Periodicamente uma embalagem de polpa de cada fruta era retirada do conjunto de amostras congeladas para processamento das determinações dos ácidos orgânicos. As demais embalagens foram mantidas congeladas até a análise, de acordo com o cronograma (50, 100, 150, 200, 250 e 300 dias, respectivamente).

#### Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultra pura, obtida pelo sistema de purificação Millipore (Millipore, São Paulo, Brasil).

As soluções estoque (1000 mg L<sup>-1</sup>) dos ácidos fumárico, tartárico e cítrico (Synth, São Paulo, Brasil, com níveis de pureza de 99,5; 99,0 e 99,9%, respectivamente) e ascórbico (Ecibra, São Paulo, Brasil,

\*e-mail: zesoares@uesb.edu.br

grau de pureza 99,8%) foram preparados pela diluição apropriada de uma massa obtida de seus respectivos padrões de grau analítico (PA). Para obtenção das curvas analíticas, as soluções de referência foram preparadas por diluição serial das soluções estoque dos respectivos ácidos orgânicos em água ultra pura.

A fase móvel utilizada para separação dos ácidos orgânicos foi uma solução aquosa de metanol 5% (v/v), grau HPLC (J. T. Baker, New Jersey, USA), com pH ajustado para 2,1 com ácido perclórico (Nuclear, São Paulo, Brasil). A fase móvel foi filtrada através de uma membrana de acetato de celulose 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) para remover todas as impurezas.

### Equipamento e condições cromatográficas

A determinação dos ácidos orgânicos foi realizada com o uso de um sistema contendo um cromatógrafo a líquido composto de uma bomba series 200, válvula de amostragem com *loop* de injeção de 20  $\mu\text{L}$  e detector Series 200 UV/VIS (Perkin Elmer, USA). A separação dos analitos foi realizada utilizando-se uma coluna de fase reversa RP-C18 (250 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula, Thermo, USA). A amostra injetada no sistema cromatográfico foi submetida a uma eluição isocrática empregando um fluxo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$  com detecção a 215 nm.

### Preparo das amostras

Embalagens de 100 g de polpas de frutas congeladas foram homogeneizadas em liquidificador doméstico com água ultrapura e o volume ajustado em balão volumétrico de 200 mL. Alíquotas de aproximadamente 1 mL da mistura foram diluídas com a fase móvel na proporção de 1:9. A seguir, filtrou-se em filtros de seringa, PTFE (Politetrafluoretileno) de 0,2 mm (Verical Chromatography Co., LTD, Thailand) e finalmente foram injetadas no cromatógrafo.

### Avaliação da performance do método

A avaliação do desempenho e das características analíticas do método foi realizada com base na análise dos seguintes parâmetros: seletividade,<sup>14</sup> linearidade,<sup>15</sup> limites de detecção e quantificação,<sup>16-21</sup> exatidão e precisão.

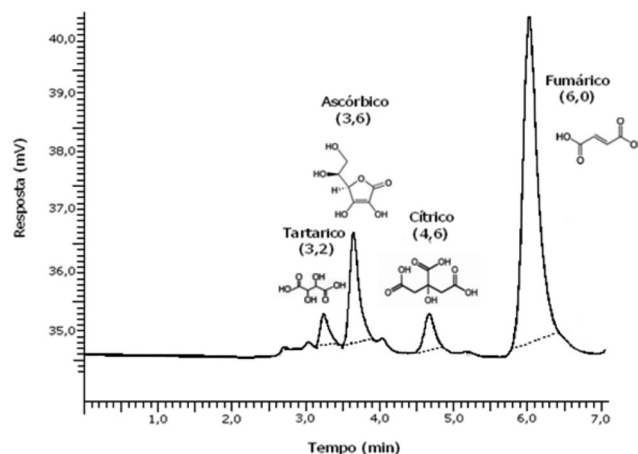
## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Validação do método

As condições cromatográficas foram otimizadas para obter um menor tempo de análise aliado a uma boa resolução entre os picos dos ácidos ascórbico, cítrico, fumárico e tartárico e outros interferentes das amostras. De acordo com o cromatograma da Figura 1, pode-se observar uma boa seletividade do método devido à inexistência de

interferentes nas proximidades dos picos de cada um dos ácidos em estudo.

Inicialmente testaram-se os parâmetros cromatográficos resultantes dos estudos realizados previamente.<sup>2,13</sup> Entretanto, o sistema de eluição que permitiu a melhor resolução dos quatro ácidos testados foi: 5:95 (v/v) de metanol-água (acidificada com ácido perclórico, até pH 2,1) com uma vazão de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . A coluna de separação utilizada aliada à composição e vazão da fase móvel proporcionou uma boa separação cromatográfica, que permitiu detectar nitidamente os analitos em 8 min de corrida.



**Figura 1.** Separação cromatográfica da solução analítica contendo: 250 mg  $\text{L}^{-1}$  dos ácidos tartárico e ascórbico, 500 mg  $\text{L}^{-1}$  de ácido cítrico e 50 mg  $\text{L}^{-1}$  de ácido fumárico

Para a construção da curva analítica foi utilizada uma padronização externa a partir de sete níveis de concentração das soluções padrão dos ácidos. As faixas de linearidade apresentadas foram: 10 a 250 mg  $\text{L}^{-1}$  para os ácidos tartárico e ascórbico, 20 a 500 mg  $\text{L}^{-1}$  para o ácido cítrico e de 2 a 50 mg  $\text{L}^{-1}$  para o ácido fumárico. Os respectivos padrões foram preparados no momento da injeção e injetados em triplicata. A linearidade foi avaliada interdiária e estimada pela análise de regressão linear através do método mínimo dos quadrados. Conforme apresentado na Tabela 1, as faixas de linearidade, obtidas individualmente para cada ácido, apresentaram coeficientes de correlação acima de 0,99, o que demonstra a validade do método.

Os valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) apresentados na Tabela 1 foram obtidos pela determinação dos analitos a partir de diluições sucessivas e decrescentes da solução padrão de menor concentração. O limite de detecção instrumental foi definido como três vezes o ruído da linha de base e o limite de quantificação instrumental foi considerado quando a relação sinal ruído apresentar-se superior a 10:1. Os valores de LD e LQ do método foram estimados pela divisão dos valores dos LD e LQ instrumental pelo fator de diluição da amostra durante o seu preparo (20 vezes).

**Tabela 1.** Coeficiente de correlação (r), limites de quantificação (LQ), detecção (LD) e equação da reta (y), obtidos no método de validação para os ácidos orgânicos por CLAE-UV

Ácidos orgânicos	Tartárico	Ascórbico	Cítrico	Fumárico
Coeficiente de Correlação (r)	0,9924	0,9903	0,9961	0,9905
LD instrumental ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0,35	1,00	2,40	0,09
LQ instrumental ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	1,00	3,40	8,20	0,30
LD método ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0,017	0,050	0,120	0,004
LQ método ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0,050	0,170	0,410	0,015
Equação da reta (y)	43,17 + 0,17x	20,29 + 1,64x	-21,21 + 0,22x	41,42 + 9,71x

Esses resultados demonstram que o método é adequado para detectar e quantificar os níveis de concentração dos ácidos tartárico, ascórbico, cítrico e fumárico presentes nas amostras de polpa de fruta.

A exatidão foi determinada em função da recuperação do analito pela sua quantificação na matriz em estudo através do emprego do padrão analítico. As amostras foram fortificadas em três níveis de concentração. No nível 1, as amostras foram fortificadas com 60, 50, 180 e 10 mg L<sup>-1</sup> dos ácidos tartárico, ascórbico, cítrico e fumárico, respectivamente. No nível 2 as concentrações adicionadas foram de 140, 130, 380 e 26 mg L<sup>-1</sup> dos ácidos tartárico, ascórbico, cítrico e fumárico, respectivamente. Finalmente, no nível 3 as concentrações adicionadas nas amostras foram de 220, 210, 580 e 42 mg L<sup>-1</sup> dos ácidos tartárico, ascórbico, cítrico e fumárico, respectivamente. Para obter o valor da porcentagem do analito recuperado calculou-se a relação entre a concentração média determinada previamente e a concentração teórica correspondente após a adição do analito, multiplicada por 100.<sup>9-17</sup> Os valores obtidos encontram-se na Tabela 2, e demonstram resultados aceitáveis para recuperação em matrizes complexas.

A precisão do método foi avaliada levando em consideração a repetibilidade e a precisão intermediária. Para obtenção da repetibilidade, em um mesmo dia, foram realizadas sete determinações cromatográficas dos teores dos ácidos orgânicos em cada uma das amostras de polpa de frutas fortificadas em três níveis. Os níveis de fortificação são semelhantes aos empregados na obtenção da exatidão. Após dois dias repetiu-se todo o procedimento descrito determinando-se, assim, a precisão intermediária.<sup>9-13</sup> Os valores encontrados para ambos os parâmetros encontram-se na Tabela 2 como o desvio padrão relativo (DPR) com resultados em torno de 20%.<sup>18,19</sup> Estes resultados são considerados admissíveis de acordo com a literatura e comprovam que a metodologia permanece constante e confiável.

### Influência do tempo de estocagem na estabilidade dos ácidos orgânicos nas polpas congeladas

As taxas de degradação dos ácidos orgânicos, particularmente do ácido ascórbico (vitamina C) em frutas e legumes são afetados por fatores como pH, temperatura, umidade, luminosidade e tempo de armazenamento. Com isso, as perdas da qualidade nutricional e do frescor das polpas de frutas congeladas podem ser avaliadas com base na redução dos teores dos ácidos orgânicos durante o período de estocagem.

No Brasil, os prazos de validade dos alimentos não são estipulados pela agência nacional da vigilância sanitária (ANVISA), como era de se esperar. A comissão interministerial de saúde e agricultura – CISA, através da resolução CISA/MA/MS nº 10, de 31 de julho de 1984, estabeleceu que a data de vencimento da qualidade do produto alimentício será indicada pelo próprio fabricante.<sup>22</sup> Mas, para isso, o fabricante fica obrigado a apresentar um estudo de estabilidade de seus produtos para a ANVISA. Deve-se destacar que o prazo de validade é o tempo médio que um produto não apresenta deterioração, desde que respeitadas as condições de armazenamento indicadas na embalagem.

Como a maioria dos fabricantes de polpas de frutas comercializadas no Brasil estabelecem prazos de validade de 24 meses, os estudos do frescor das polpas congeladas neste trabalho foram realizados a partir dos 50 primeiros dias de estocagem.

Os resultados da Tabela 3 revelam que os padrões de distribuição dos ácidos orgânicos nas polpas de frutas sofreram alterações durante o período de estocagem. Os ácidos cítrico, ascórbico e tartárico nos primeiros 50 dias de estocagem apresentaram-se nas ordens decrescentes de concentração em cada uma das quatro polpas avaliadas (abacaxi > umbu > cacau > goiaba, umbu > goiaba > cacau > abacaxi e umbu > goiaba > cacau > abacaxi, respectivamente). Após 300 dias de estocagem a ordem dos níveis de concentração para esses mesmos ácidos nas polpas foram alteradas para: (abacaxi > goiaba > umbu > cacau, umbu > abacaxi > goiaba > cacau e umbu > cacau > abacaxi > goiaba, respectivamente). Tal fato indica que entre as polpas avaliadas, as de abacaxi e goiaba foram aquelas que apresentaram as maiores estabilidades com relação aos teores do ácido cítrico durante todo o período de estocagem. Em relação aos teores do ácido ascórbico, as polpas que apresentaram as maiores estabilidades foram as de umbu e abacaxi. O mesmo foi observado para as polpas de umbu e cacau com relação ao ácido tartárico.

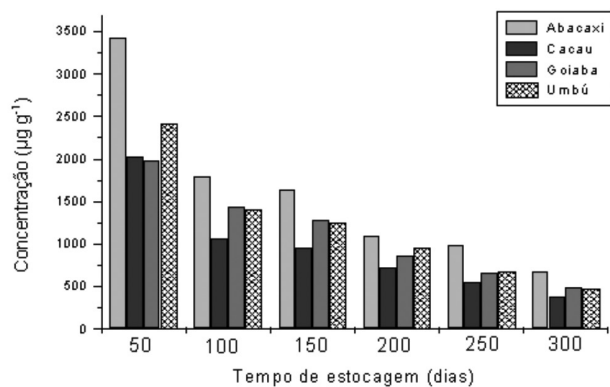
Por outro lado, verificaram-se reduções progressivas nos teores dos quatro ácidos analisados ao longo do período de estocagem nas polpas de frutas congeladas. Com base no gráfico da Figura 2, é possível observar uma redução dos teores do ácido cítrico nas polpas de cacau e goiaba, que se inicia a partir dos primeiros 50 dias de armazenamento. Entretanto, para as polpas de abacaxi e umbu tal redução foi iniciada a partir dos 100 primeiros dias de armazenamento, indicando uma maior estabilidade nos teores do ácido cítrico nas polpas congeladas dessas últimas duas frutas durante os três primeiros meses.

**Tabela 2.** Recuperação (exatidão), repetibilidade e precisão intermediária obtidos no método de validação para ácidos orgânicos por CLAE-UV

Polpas	Ácidos	Recuperação (%)			Repetibilidade (%DPR)			Precisão intermediária (%DPR)
		Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 1	Nível 2	Nível 3	
Abacaxi	Tartárico	85,5	87,5	83,4	16,4	17,2	15,8	15,7
	Ascórbico	95,7	93,1	89,4	18,4	16,7	17,8	18,3
	Cítrico	95,6	91,3	85,4	18,2	17,2	18,2	16,4
	Fumárico	84,6	89,4	103,4	12,9	18,9	14,7	18,1
Cacau	Tartárico	66,8	84,8	96,2	17,7	12,6	17,6	14,4
	Ascórbico	76,4	78,4	87,8	15,4	14,4	14,8	17,6
	Cítrico	87,9	75,9	71,4	17,1	15,8	15,7	19,5
	Fumárico	96,2	87,3	85,7	18,9	16,7	18,2	15,8
Goiaba	Tartárico	87,7	86,5	94,5	19,3	12,6	17,3	12,6
	Ascórbico	92,3	96,9	88,7	16,4	15,5	16,4	18,5
	Cítrico	74,9	76,1	96,9	18,5	17,1	18,3	16,4
	Fumárico	85,2	88,4	73,7	16,3	16,8	17,3	14,8
Umbu	Tartárico	83,9	93,6	98,3	19,6	19,4	18,4	19,4
	Ascórbico	78,5	85,4	79,5	19,6	18,3	19,3	12,6
	Cítrico	94,7	84,5	86,2	19,2	15,6	17,6	14,7
	Fumárico	99,3	76,9	93,6	16,4	16,2	18,9	18,9

**Tabela 3.** Valores de concentração em  $\mu\text{g g}^{-1}$  dos ácidos tartárico, ascórbico, cítrico e fumárico nas polpas de fruta estocadas durante um período de 300 dias

Estocagem	Ácidos	Abacaxi	Cacau	Goiaba	Umbu
50 dias	Tartárico	749 ± 2	833 ± 2	997 ± 19	2537 ± 65
	Ascórbico	224 ± 3	321 ± 8	585 ± 8	970 ± 25
	Cítrico	3426 ± 2	2032 ± 14	1986 ± 6	2425 ± 12
	Fumárico	3,0 ± 0,5	11 ± 2	12,5 ± 2,0	2,0 ± 0,3
100 dias	Tartárico	746 ± 8	846 ± 27	843 ± 5	1800 ± 67
	Ascórbico	275 ± 9	46 ± 2	265 ± 8	489 ± 17
	Cítrico	1789 ± 38	1062 ± 15	1431 ± 10	1400 ± 33
	Fumárico	< LD	< LD	< LD	< LD
150 dias	Tartárico	624 ± 5	735 ± 35	634 ± 5	1526 ± 25
	Ascórbico	247 ± 17	39 ± 4	174 ± 2	438 ± 9
	Cítrico	1645 ± 25	953 ± 27	1278 ± 8	1253 ± 11
	Fumárico	< LD	< LD	< LD	< LD
200 dias	Tartárico	496 ± 12	572 ± 7	428 ± 6	1068 ± 26
	Ascórbico	127 ± 14	18 ± 6	94 ± 2	409 ± 6
	Cítrico	1095 ± 9	720 ± 26	862 ± 2	954 ± 26
	Fumárico	< LD	< LD	< LD	< LD
250 dias	Tartárico	378 ± 5	483 ± 6	321 ± 3	834 ± 14
	Ascórbico	109 ± 12	12 ± 2	67 ± 1	324 ± 11
	Cítrico	984 ± 7	560 ± 14	657 ± 3	675 ± 16
	Fumárico	< LD	< LD	< LD	< LD
300 dias	Tartárico	275 ± 8	296 ± 6	128 ± 5	721 ± 12
	Ascórbico	68 ± 4	< LD	48 ± 2	275 ± 8
	Cítrico	674 ± 4	383 ± 12	489 ± 8	467 ± 6
	Fumárico	< LD	< LD	< LD	< LD

**Figura 2.** Variação dos teores de ácido cítrico nas polpas de frutas ao longo do tempo de estocagem

### Cinética de degradação das polpas armazenadas

Os parâmetros cinéticos de degradação dos ácidos orgânicos nas polpas congeladas (taxa de degradação e meia-vida) foram determinados conforme procedimento apresentado na literatura.<sup>23</sup> Os valores das concentrações remanescentes dos ácidos tartárico, ascórbico e cítrico, em cada um dos quatro tipos de polpa de fruta, foram ajustados ao modelo de cinética de primeira ordem em função do tempo de estocagem.

Os resultados da Tabela 4 revelam que as maiores taxas de degradação foram observadas para o ácido ascórbico nas polpas de cacau e goiaba, cujos valores das constantes de degradação foram de 0,01924 e 0,00985  $\text{dias}^{-1}$ . As magnitudes das constantes de velocidade demonstram a sensibilidade do ácido ascórbico na temperatura de armazenamento para as polpas dessas duas frutas. Já nas polpas de

umbu o ácido ascórbico apresentou índices de estabilidades muito bons, quando comparado com os demais ácidos, resultando em um dos melhores tempos de meia vida, 159,31 dias. Tal valor de meia vida contrasta com os valores de 36,02 e 70,36 dias, observados para as polpas de cacau e goiaba, respectivamente.

Devido às elevadas taxas de degradação apresentadas, o período de validade das polpas de fruta poderia ser obtido com base na cinética de degradação do ácido ascórbico. Considerando-se como concentração mínima aceitável o valor equivalente a 50% do teor inicial do ácido encontrado no produto (meia vida), o prazo de validade remanescente do produto poderia ser estimado em 1 mês para as polpas de cacau e de 5 meses para as polpas de umbu.

**Tabela 4.** Constantes de degradação (K), tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) e coeficientes de correlações (r) obtidos pela cinética de degradação de primeira ordem dos ácidos orgânicos nas polpas de frutas congeladas por um período de 300 dias

Polpas	Ácidos	Parâmetros cinéticos de primeira ordem		
		K ( $\text{dia}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (dia)	r
Abacaxi	Tartárico	0,00416	166,59	0,9697
	Ascórbico	0,00537	129,05	0,9103
	Cítrico	0,00590	117,45	0,9742
Cacau	Tartárico	0,00406	170,70	0,9413
	Ascórbico	0,01924	36,02	0,9478
Goiaba	Cítrico	0,00603	114,92	0,9797
	Tartárico	0,00774	89,53	0,9613
Umbu	Ascórbico	0,00985	70,35	0,9886
	Cítrico	0,00556	124,64	0,9943
Umbu	Tartárico	0,00512	135,09	0,9934
	Ascórbico	0,00435	159,31	0,9299
	Cítrico	0,00611	113,42	0,9878

### CONCLUSÕES

Neste estudo, um método rápido e reprodutível, que utilizou CLAE em fase reversa, foi validado na determinação simultânea dos ácidos ascórbico, cítrico, fumárico e tartárico em polpas de frutas tropicais congeladas. Ficou evidente um decréscimo nos teores dos quatro ácidos avaliados ao longo do período de estocagem, evidenciando-se a perda do frescor das polpas de fruta. Com isso é necessário que o consumo desse produto seja o mais rápido possível, para que não haja perda dos nutrientes com um longo período de estocagem. Por fim, os parâmetros de validação demonstraram que o método apresentou baixos valores dos limites de quantificação e detecção, boas precisão e exatidão, constituindo-se em uma importante ferramenta na avaliação da estabilidade dos ácidos orgânicos nas polpas de frutas congeladas.

### REFERÊNCIAS

- Paglarini, C. S.; Silva, F. S.; Porto, A. G.; Santos, P.; Leite, A. L. M. P.; *Enciclopédia Biosfera* **2011**, 7, 1391.
- Scherer, R.; Rybka, A. C. P.; Godoy H. T.; *Quim. Nova* **2008**, 31, 1137.
- Soares, L. C.; Oliveira, G. S. F.; Maia, G. A.; Monteiro, J. C. S.; Silva, A. J.; *Rev. Bras. Frutic.* **2001**, 23, 387.
- Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Morales, M. T.; Fett, R.; *Ciência Rural* **2006**, 36, 1283.
- Salgado, S. M.; Guerra, N. B.; Melo, A. B. F.; *Rev. Nutr.* **1999**, 12, 303.

6. Pereira, J. M. A. T. K.; Oliveira, K. A. M.; Soares, N. F. F.; Gonçalves, M. P. J. C.; Pinto, C. L. O.; Fontes, E. A. F.; *Alim. Nutr.* **2006**, *17*, 437.
7. Amaro, A. P.; Bonilha, P. R. M.; Monteiro, M.; *Alim. Nutr.* **2002**, *13*, 151.
8. Brunini, M. A.; Durigan, J. F.; Oliveira, A. L.; *Rev. Bras. Frutic.* **2002**, *24*, 651.
9. Lu, F.; Zhang, J. Y.; Liu, S. L.; Wang, Y.; Ding, Y. T.; *Food Chem.* **2011**, *127*, 159.
10. Igual, M.; Martínez, E. G.; Camacho, M. M.; Navarrete, N. M.; *Food Chem.* **2010**, *118*, 291.
11. Spínola, V.; Mendes, B.; Câmara, J. S.; Castilho, P. C.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 1049.
12. Scherer, R.; Rybka, A. C. P.; Ballus, C. A.; Meinhart, A. D.; Teixeira, J. F.; Godoy, H. T.; *Food Chem.* **2012**, *135*, 150.
13. Lima, L. L. A.; Schuler, A.; Guerra, N. B.; Pereira, G. E.; Lima, T. L. A.; Rocha, H.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1186
14. Aragão, N. M.; Veloso, M. C. C.; Andrade, J. B.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 2476.
15. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
16. Cassiano, N. M.; Barreiro, J. C.; Martins, L. R. R., Oliveira, R. V.; Cass, Q. B.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1021.
17. Beck, R. C. R.; Cardoso, S. G.; Athayde, M. L.; Codevilla, C.; Oliveira, F. K.; Dalmora, S. L.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1225.
18. Friedrich, R. B.; Ravanello, A.; Cichota, L. C.; Rolim, C. M. B.; Beck, R. C. R.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1052.
19. Celeghini, R. M. S.; Sousa, I. M. O.; Silva, A. P.; Rodrigues, R. A. F.; Foglio, M. A.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 875.
20. Marchini, L. C.; Moreti, A. C. C. C., Otsuk, I. P.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2005**, *25*, 8.
21. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução 899, de 29/05/2003, que trata da validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Brasília, 2003
22. [http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/10\\_84.htm](http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/10_84.htm), acessada em Setembro 2013.
23. Demczuk, B. J.; Fachin, D. T.; Ribani, R. H.; Freitas R. J. S.; *B. Ceppa* **2008**, *26*, 229.