

SOBRE O TEOR DE VITAMINA "C" NO LEITE DE SÃO PAULO

RENATO FONSECA RIBEIRO

Químico chefe do Instituto Adolfo Lutz

LÚCIA ACHÉ

Química do Instituto Adolfo Lutz

Os recentes progressos na química das vitaminas têm permitido refazer com mais precisão o doseamento dos diferentes fatores nas substâncias alimentares, corrigindo as cifras anteriormente obtidas. Cada vez mais, os processos químicos substituem as dosagens biológicas, principalmente porque estas são de muito mais difícil realização que aquelas e porque, via de regra, o curto espaço de tempo exigido por um método químico torna realizável a pesquisa em série no mesmo substrato ou em substâncias diferentes.

Os métodos químicos anteriormente utilizados para doseamento da vitamina "C", fosse o do iodo ou do azul de metileno ou do 2-6 diclorofenolindofenol, etc., estavam sujeitos a grandes causas de erros, quer por excesso, quer por omissão.

Erros por excesso, porque os reativos, não sendo específicos, doseavam, juntamente com a vitamina "C", outras substâncias não anti-escorbúticas, tais como a cistina, a glutathione, etc. e erros por omissão, visto que a vitamina "C" se encontra na natureza sob três formas conhecidas (ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico e ascorbinógeno) das quais uma — o ácido ascórbico — reage com os reativos habituais da vitamina "C".

Foi principalmente a descoberta de um fermento agindo especialmente sobre o ácido ascórbico — a ascorbinase — que veio assegurar uma garantia de êxito no doseamento mais preciso da vitamina "C".

O método se baseia na determinação inicial do conjunto de substâncias capazes de agir como vitamina "C", em face dos reativos, principalmente o de Tillmans, e na doseagem ulterior, no mesmo substrato, depois de ter sido destruído pelo fermento o ácido cevitâmico; é evidente que a diferença entre essas duas titulações dará o valor real do ácido cevitâmico.

E' de grande conveniência que tenhamos os valores das diferentes vitaminas nos nossos alimentos e o pouco que se tem feito até o presente com respeito ao fator anti-escorbútico em nosso meio, precisa ser inteiramente revisto em outras bases de processos de investigação adotando-se o método específico da ascorbinase.

Nas linhas que se seguem daremos os primeiros resultados de uma série de investigações adotando-se o método da ascorbinase Tauber e Kleiner modificado por Leser.

MÉTODOS PARA O LEITE

a) Reativos:

1 — Reativo de Tillmans. Extraem-se aproximadamente 200 mg. de 2-6 di-clorofenolindofenol (Merck ou Kodak) em H₂O aquecida a $\pm 60^{\circ}\text{C}$. passando-se o extraído em filtro até o esgotamento completo do corante. E' recomendavel este modo de operar porque certos reativos de Tillmans não sendo absolutamente puros deixam resíduos que ficam sobre o filtro. Completa-se o volume de um litro e junta-se uma ponta de faca de bicarbonato de sódio (aproximadamente 1,5 gr.). Assim preparado, o reativo conserva-se sem perder o título, na geladeira, por mais de 30 dias, sendo, não obstante, conveniente titular semanalmente. A titulação pôde ser feita pelo método de Pimenta, devendo esse título corresponder a 5 cc. do reativo para 1 mg. de ácido ascórbico.

2 — Ácido metafosfórico a 3%.

3 — Gás sulfídrico, que pôde ser preparado em aparelho de Kipp.

4 — Gás carbônico. Usar-se-á um torpedo de CO₂ ou um aparelho de Kipp.

5 — Solução tampão aceto-acética, 0,2M, de pH = 6; medem-se 51 cc. da solução 0,2M de ácido acético em um balão de um litro e completa-se o volume de 0,2M de acetato de sódio.

6 — Solução de fermento. Técnica de Fujita e Sakamoto com a modificação de Leser: rala-se, em ralador comum de cozinha, a parte cortical do pepino (*Cucumis sativus*) e expreme-se em pano. A cada 10 cc. do caldo obtido juntam-se 4 gotas de solução molar de acetato de bário e filtra-se; adicionam-se, então, 0,5 cc. de solução saturada de sulfato de amônio e separa-se por centrifugação ou em filtro o depósito formado; satura-se com sulfato de amônio, centrifuga-se para separar o precipitado de ascorbinase e lava-se esse precipitado 4-5 vezes com solução saturada de sulfato

de amônio. Suspende-se o depósito com água e dializa-se por 24 horas em saco de papel celofane, contra água corrente, se possível em câmara fria, adicionando-se previamente algumas gotas de toluol. Filtra-se e conserva-se em geladeira. A estabilidade é satisfatória por 30 dias. A atividade do fermento é determinada fazendo-se agir quantidades variáveis desta solução em uma quantidade fixa de ácido ascórbico durante 15 minutos, em pH 6 e a 38°C.. A atividade do fermento é interrompida no momento desejado pela junção de 1-2 cc. de ácido metafosfórico a 3%.

b) *Técnica:*

1.º tempo — A 5 cc. de leite juntam-se 2-4 cc. de ácido metafosfórico a 3% e titula-se pelo Tillmans contido em uma microbureta. Cerca de 3 gotas ou seja, 0,10 cc. equivalem-se ao "blank" e por isso essa cifra deve ser deduzida da leitura da bureta. *Nota:* a coloração rósea da viragem fica absorvida no precipitado de caseína facilitando a leitura.

2.º tempo — Passar uma corrente SH_2 em 15 cc. de leite por 5 minutos, arrolhar o recipiente e deixá-lo na obscuridade por 12 horas. Normalmente o máximo de eficiência do SH_2 só se manifesta em pH maior que 4 o qual é sempre o caso do leite não fermentado, razão por que não há necessidade de correção.

3.º tempo — Passar uma corrente de CO_2 no leite anteriormente tratado até prova negativa no papel de acetato de chumbo e dosear em 5 cc. pelo Tillmans como no tempo 1.º. A outros 5 cc. junta-se a quantidade calculada do fermento, "x" cc. do tampão de pH 6 e incubar 30 minutos a 38°C.. Juntam-se 2-4 cc. de PO^3H^2 e titula-se pelo Tillmans.

CÁLCULO

A primeira titulação dá unicamente indicação da quantidade total de ácido ascórbico e de outras substâncias Tillmans-redutoras existentes. *Nota:* Em todos os nossos exames (leite pasteurizado) o resultado foi sistematicamente — zero.

A segunda titulação indica o valor do ácido ascórbico existente mais as substâncias interferentes que se encontram no substrato, assim como as que apareceram mercê dos agentes redutores SH_2 e somadas ao ácido ascórbico que se formou pela hidrogenação do ácido dehidroascórbico.

A terceira titulação dosa todas as substâncias anteriores, menos o ácido ascórbico.

A diferença entre a 2.^a e a 3.^a titulações indica, portanto, o valor da vitamina "C" do substrato. O número em cc. que indica esse valor, multiplicado pelo fator de Tillmans e por 20 dará o resultado percentual da vitamina "C".

RESULTADO

Para demonstração da eficiência dos métodos fizemos os dois tipos de prova seguintes:

1.º — *Doseamento repetido no mesmo substrato.*

Número	Resultado mgrs. %
1	0,7056
2	0,7448
3	0,7448
4	0,7056
5	0,7056
6	0,6654
7	0,7056
8	0,7448
9	0,7056
10	0,7056
11	0,7056
12	0,7448
13	0,7056
14	0,6654
15	0,7056
16	0,7448

2.º — *Prova de recuperação* — Fizemos vários ensaios sobre um mesmo leite ao qual juntámos quantidades variáveis de ácido ascórbico e constatámos que os resultados encontrados eram sensivelmente iguais ao teor vitamínico do leite adicionado da quantidade juntada.

AMOSTRAS DE LEITE DE SÃO PAULO

Em conjunto de diferentes amostras do leite do consumo da cidade de São Paulo, foram encontrados resultados da pagina imediata importando notar-se que as doseagens antes da passagem do H₂S foram sempre negativas, demonstrando que todo o ácido ascórbico se encontra sob fórmula oxidada.

As amostras por nós utilizadas para a determinação da vitamina "C" foram aquelas mesmas colhidas pelo Serviço de Policiamento da Alimentação Pública em sua fiscalização quotidiana. Isto quer dizer que são amostras do leite tal qual é entregue ao consumo.

E afim de se julgarem possíveis diferenças entre leites de procedências diversas, damos a seguir os resultados da análise de leites de duas uniões distribuidoras:

A 1.^a coluna significa a quantidade de ácido ascórbico após a passagem do SH₂ e CO₂ em mg. %;

A 2.^a coluna significa o resto da oxidação em mg. %;

A 3.^a coluna significa a quantidade de ácido ascórbico verdadeiro em mg. %.

UMA USINA DISTRIBUIDORA

Mgrs. de ácido ascórbico %, depois da passagem de SH ₂ e CO ₂	Resíduo de oxidação	Ácido ascórbico real em mgrs. %.
3,42	2,59	0,8208
3,55	2,59	0,9234
3,48	2,63	0,8550
3,48	2,59	0,8550
3,83	2,90	0,9234
3,45	2,87	0,5814
2,66	2,01	0,6498
3,33	2,73	0,5940
3,33	2,73	0,5940
3,55	2,56	0,9918
3,48	2,53	0,9576
3,59	2,80	0,7860
3,62	2,66	0,9576
3,32	2,62	0,7040
3,29	2,62	0,6720
3,29	2,52	0,7680
3,12	2,38	0,5780
3,26	2,38	0,8840
3,33	2,38	0,9520
4,08	3,10	0,5792
4,16	3,06	0,1000
4,32	3,34	0,9792
4,16	3,26	0,8975
4,19	3,17	1,0192

(*) Nota — Conservamos os valores de ácido ascórbico real obtidos com as 4 decimais, nas outras duas colunas fizemos a aproximação. O mesmo critério adotamos na página seguinte.

OUTRA USINA DISTRIBUIDORA

Mgrs. de ácido ascórbico %, depois da passagem de SH ₂ e CO ₂	Resíduo de oxidação	Ácido ascórbico real em mgrs. %.
3,55	2,59	0,9576
3,48	2,46	1,0602
3,52	2,59	0,8234
3,48	2,59	0,8892
3,45	2,77	0,6840
3,48	2,87	0,6156
3,20	2,37	0,8250
3,26	2,44	0,8250
3,20	2,40	0,8780
3,28	2,56	0,7182
3,48	2,39	1,0944
3,48	2,59	0,8892
3,48	2,80	0,6840
3,52	2,83	0,6840
3,52	2,83	0,6840
3,69	2,81	0,8760
3,28	2,56	0,7182
3,28	2,40	0,8892
3,48	2,80	0,6840
3,59	2,80	0,7866
3,69	3,00	0,6840
3,69	3,00	0,6840
3,69	3,00	0,6840
3,61	3,52	0,9600
3,45	2,49	0,9800
3,52	2,72	0,8000
3,26	2,46	0,8000
3,26	2,56	0,7040
3,26	2,56	0,7040
3,32	2,68	0,6400
3,36	2,68	0,6720

Conforme era previsto o teor em vitamina "C" no leite é muito reduzido, não podendo esse alimento ser considerado como fonte útil de ácido ascórbico; os nossos resultados concordam razoavelmente com os referidos por Drose e Bramsel que apresentam com valores para o leite cru 1,65%, para o leite fervido, 1,2%, para o leite

pasteurizado por curto tempo, 1,50%, e, para o pasteurizado por longo tempo, 0,99%.

Seja dito que muito mais altos são os valores apresentados no livro de Rudolph onde o teor de vitamina "C" para o leite cru é expresso pela cifra de 5,28% e de 4,15% para o leite fervido uma vez.

Agradecemos a colaboração prestada por DD. Candida Fonseca, Catarina Libonatti Mormano, Lygia Arantes e Snr. Nelson Cagno, todos da Secção de Química Aplicada.

RESUMO

Em um conjunto de 57 amostras de leite de consumo da cidade de São Paulo, a doseagem do ácido ascórbico pelo método específico da ascorbinase revelou valores colocados entre 1,0944 e 0,5780 com média de 0,7881.

BIBLIOGRAFIA

- DROSE, W. e BRAMSEL, H. — 1941 — Vitamin — Tabellen der gebräuchlichsten Nahrungsmittel — ed. Von Johann Ambrosius Barth — Leipzig.
- RUDOLPH, Willi — 1939 — Vitamin C und Ernährung — ed. Ferdinand Enke — Stuttgart.
- TAUBER, H. e KLEINER, I. — 1935 — Jour. Biol. Chem. 110, 559.
- LESEER, W. P. — informação pessoal do autor.