

QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DE VITAMINA C POR CLAE-UV E ESTUDO DE ESTABILIDADE

Marília Baierle, André de Bairros, Ana Paula Moreira, Rachel Bulcão, Miguel Roehrs, Fernando de Freitas, Juliano Durgante, Natália Brucker, Mariele Charão e Solange Cristina Garcia*

Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre - RS, Brasil

Recebido em 13/4/11; aceito em 4/7/11; publicado na web em 19/8/11

SERUM QUANTIFICATION OF VITAMIN C BY HPLC-UV AND STABILITY STUDY. Vitamin C, an exogenous antioxidant, is essential to human health. In this study, a method was validated to serum vitamin C quantification by HPLC-UV. Its stability with and without the use of tris [2-carboxy-ethyl] phosphine hydrochloride (TCEP), at -20 and -80 °C, in serum and supernatant were also evaluated. Analysis showed $r^2 > 0.99$, precision CV% < 15% and % bias < 15%, being linear, precise and accurate. The stability test revealed that using TCEP in serum storage at -20 and -80 °C or in supernatant at -80 °C the vitamin C levels remain stable for 30 and 12 days, respectively.

Keywords: HPLC; vitamin C; stability.

INTRODUÇÃO

A vitamina C (L-ácido ascórbico) é um dos nutrientes hidrossolúveis mais importantes da dieta humana,¹ pois esta substância não é sintetizada pelo organismo do homem devido à ausência da enzima L-gulonolactona oxidase, a qual catalisa a etapa final da síntese de ácido ascórbico.^{2,3} Diante da incapacidade de síntese endógena de vitamina C, o organismo adquire esta substância através da dieta ou de suplementos vitamínicos.⁴⁻⁶

Os efeitos benéficos da vitamina C em humanos ocorrem devido a sua cofunção em processos enzimáticos^{7,8} e atividade antioxidante através da captura de ânions superóxido ($-O_2^-$) para formação do radical semideidroascorbato, o qual é reduzido pela glutatona reduzida (GSH).^{9,10} Já foi verificado que as concentrações de vitamina C no sangue são positivamente relacionadas à saúde, e inversamente com morbidade e mortalidade, pois esta vitamina está associada positivamente com os níveis de colesterol c-HDL¹¹ e hemoglobina,^{5,7} além de contribuir com a regeneração da vitamina E oxidada, prever o risco de acidente vascular cerebral,¹² auxiliar na terapia da diálise¹³ e prevenir complicações gestacionais.^{14,15} Isso demonstra que a vitamina C pode ser um biomarcador tanto do estado de saúde, como também do status nutricional de um indivíduo.^{5,7,15-19} Entretanto, baixas ou elevadas concentrações desta vitamina no organismo apresentam ações oxidantes.^{20,22} Diante disso, a quantificação de níveis circulantes de vitamina C também é considerada um biomarcador do estresse oxidativo em humanos.^{18,23-26}

Existem vários métodos para a quantificação dos níveis de vitamina C sanguíneos.²⁷⁻³² Os métodos espectrofotométricos são baseados na derivatização da vitamina C ou no seu caráter redutor, apresentando como vantagens o seu baixo custo e rapidez de análise.³³⁻³⁵ Porém outras substâncias presentes em amostras biológicas, tais como íons de ferro ou cobre, açúcares ou ácido glicurônico, citrato e peróxido de hidrogênio, podem interferir significativamente na sua quantificação.³⁶ Nesse sentido, o método padrão para quantificar a vitamina C é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), pois se trata de uma técnica mais sensível e específica que os métodos espectrofotométricos e não necessita de derivatização.³² Os principais detectores utilizados para quantificação desta vitamina são os detectores ultra-

violeta (UV) e eletroquímico (EC).^{8,16,32,37,38} A dosagem de vitamina C também pode ser realizada utilizando detectores de fluorescência ou, ainda, por espectrometria de massa, porém estes métodos não são muito difundidos devido ao alto custo da análise.³²

Outro aspecto peculiar da vitamina C é a sua instabilidade. Em pH biológico, a principal forma desta substância é o ascorbato, o qual é rapidamente oxidado a de-hidroascorbato e, então, depletado no fluido biológico extracelular. A oxidação da vitamina C no plasma é influenciada pela temperatura, luz, pH, saturação de oxigênio, solventes e presença de enzimas oxidantes ou de íons ferro.⁸ Por isso, vários estudos indicam o uso de ditiotreitol (DTT),³⁹ ácido *meta*-fosfórico (AMP),^{16,23} cisteína³¹ ou tris [2-carboxietil] hidrocloreto de fosfina (TCEP)^{8,40} para evitar a oxidação da vitamina C *ex vivo* em amostras de sangue. Neste sentido, Lykkesfeldt⁴⁰ demonstrou que o TCEP mantém os níveis de vitamina C em pH ácido melhor do que o DTT.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi validar um método simples e rápido para a quantificação sérica de vitamina C através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna de fase reversa com detecção ultravioleta (UV) e usando TCEP como agente redutor. Além disso, foi avaliada também a sua estabilidade em soro a -20 e -80 °C no decorrer de 30 dias, com e sem o uso de TCEP.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e reagentes

L-ácido ascórbico, fosfato de sódio di-hidrogênio (NaH_2PO_4), azida sódica (NaN_3), 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), ácido perclórico ($HClO_4$) e hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos da Vetec® (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Tris [2-carboxietil] hidrocloreto de fosfina (TCEP) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Filtro de acetato de celulose 0,22 micra foi adquirido da Sartorius® (Alemanha). Soluções aquosas foram preparadas empregando água purificada através do sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

Condições cromatográficas

O sistema de cromatografia líquida consistiu de uma bomba modelo K 1001, com injetor manual e amostrador de volume fixo

*e-mail: solange.garcia@ufrgs.br

de 20 µL, um degasser *online* modelo K 5004 e um detector UV/VIS modelo K 2501, Knauer® (Alemanha).

A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna de fase reversa C18 Eurospher-100® 250 x 4,6 mm com poro de 5 µm de diâmetro de partícula e pré-coluna Eurospher-100®, 5 x 4 mm, 5 µm de diâmetro de partícula. O controle cromatográfico e o processamento dos dados foram realizados usando o programa Eurochrom 2000 Software®, edição básica 2.05 para Windows, Knauer® (Alemanha).

A fase móvel contendo 25 mM de NaH₂PO₄ e 0,00125% de NaN₃ foi ajustada a pH 2,5 com ácido orto-fosfórico e filtrada através de um filtro de 0,22 micra sob vácuo, previamente à sua utilização na cromatografia. As análises foram realizadas em temperatura ambiente, com fluxo de 1 mL/min, sendo a absorbância monitorada a 245 nm.

Soluções

As soluções de vitamina C e a curva de calibração foram preparadas diariamente com água purificada, sempre ao abrigo da luz. O TCEP foi diluído a 9% em água milli-Q e utilizado em todas as soluções. A solução estoque de vitamina C apresentava uma concentração de 1 g L⁻¹ com adição de 10 µL de TCEP 9% em um balão de 50 mL. A partir desta solução, foi feita uma solução de trabalho de vitamina C com concentração final de 20 mg L⁻¹, contendo também 10 µL de TCEP 9%.

A curva de calibração aquosa foi preparada em balões volumétricos de 5 mL com concentrações de 2, 4, 8, 16 e 20 mg L⁻¹ de vitamina C, na qual todos os pontos receberam 10 µL de TCEP 9%. Posteriormente, 100 µL de cada ponto foram transferidos para o seu respectivo eppendorf âmbar contendo 10 µL de TCEP 9%. A análise foi feita em duplicata. O conteúdo dos eppendorfs foi homogeneizado em vórtex por 10 s e, em seguida, incubados no gelo em ambiente escuro por 15 min.

Após esse período, as alíquotas de cada ponto da curva receberam 100 µL de uma solução de ácido perclórico 10% (v/v), que também continha em sua composição 10 µL de TCEP a 9%; todos os pontos foram novamente homogeneizados por 10 s e mantidos no banho de gelo até sua injeção no cromatógrafo (CLAE-UV).

Preparo das amostras

Amostras de sangue coletadas por venopunção em tubos Vacutainer® sem anticoagulante foram imediatamente centrifugadas a 1500 g por 10 min em uma centrífuga refrigerada a 4 °C (Minifuge Heraeus®, Alemanha), sendo 100 µL de soro posteriormente separados em eppendorfs âmbar já contendo uma alíquota de 10 µL de TCEP 9%, em duplicata. Essa etapa foi realizada em ambiente parcialmente escuro, assim como todo o procedimento de análise da vitamina C. Em seguida, procedeu-se à homogeneização em vórtex por 10 s e os eppendorfs permaneceram em banho de gelo por 15 min. Então, para a desproteinização da amostra, foram adicionados em cada eppendorf 100 µL de ácido perclórico 10% (1:1), mantido em banho de gelo e, após ser realizada nova homogeneização em vórtex por 10 s, o material foi centrifugado por 4 min a 2800 g em uma centrífuga de eppendorfs (HT Centrifuge®, Taiwan). O sobrenadante foi separado e 20 µL foram injetados diretamente no sistema de CLAE, ou mantidos por até 2 h em banho de gelo ao abrigo da luz, até o momento da injeção no cromatógrafo.

Curvas de calibração com adição de padrão no soro

Curvas de calibração com adição de padrão foram preparadas com *pool* de soro humano, sendo a concentração de vitamina C encontrada

no soro sem adição de padrão quantificada como nível basal. Soluções padrões foram feitas partindo-se de uma solução de trabalho de vitamina C com concentração de 250 mg L⁻¹. Todos os pontos foram feitos em balões volumétricos (5 mL) nas seguintes concentrações: 20, 40, 80, 160 e 200 mg L⁻¹, visto que houve uma diluição do padrão com o soro (1:10) resultando em concentrações finais de 2, 4, 8, 16 e 20 mg L⁻¹ em um volume final de 100 µL. A partir daí, procedeu-se como descrito no preparo das amostras.

Validação do método

Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em mostrar que os resultados são diretamente proporcionais às concentrações do analito na amostra, dentro de um intervalo.⁴¹ Para isso foram utilizadas 5 curvas analíticas aquosas de vitamina C com antioxidante TCEP nas concentrações 2, 4, 8, 16 e 20 mg L⁻¹ e 5 curvas analíticas de soro com adição de padrão nas mesmas condições. O soro sem adição de vitamina C foi considerado como basal. As curvas foram preparadas em 5 dias diferentes, com *pool* de soro e a linearidade foi avaliada através da equação da reta e do coeficiente de regressão (r²) das curvas, o qual deve ser superior a 0,98.^{41,42}

Precisão e exatidão

A precisão do método é determinada pelo grau onde múltiplas injeções de padrões se assemelham e a exatidão é o grau para o qual os resultados gerais se aproximam do valor real, podendo ser obtida pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.^{41,42} A exatidão e as precisões intra e interdia foram determinadas em 5 dias diferentes através da análise em triplicata de *pool* de soro com adição de vitamina C em concentrações na faixa de 2 a 20 mg L⁻¹. As precisões intra e interdia foram calculadas através do coeficiente de variação (CV%) das áreas relativas obtidas, já a exatidão foi expressa pela tendenciosidade (% *bias*).

Recuperação

A recuperação foi relatada como a eficiência da desproteinização sem perdas do analito, sendo os resultados expressos em porcentagem. A recuperação foi guiada pela relação entre as áreas dos picos de replicatas de soro com adição de vitamina C (2-20 mg L⁻¹) e as respectivas áreas de padrões aquosos.

Sensibilidade

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, já o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser medida, utilizando-se um determinado método analítico.^{41,42} Neste estudo, LD e LQ foram calculados com base em uma relação sinal-ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente.⁴²

Robustez

A robustez de um método mede a sua sensibilidade diante de pequenas variações;^{41,42} foi testada pela variação de parâmetros como analista, fluxo e uso de padrões de vitamina C de diferentes marcas.

Estabilidade

A estabilidade da vitamina C pelo método cromatográfico foi avaliada em *pool* de soro. Para isso, parte do soro foi separada em alíquotas de 100 µL em duplicatas com e sem adição de 10 µL de TCEP como antioxidante. Então, estas alíquotas foram previamente desproteinizadas com a adição de 100 µL de HClO₄ 10% (1:1) e homogeneização em vórtex por 10 s. Após esta etapa, os eppendorfs

foram centrifugados por 4 min a 2800 g. O sobrenadante foi então separado e armazenado em um novo eppendorf âmbar para cada dia de análise. Outra parte do soro, alíquotada com e sem adição de 10 µL de TCEP, não foi previamente desproteïnizada, sofrendo este procedimento apenas no dia de cada análise. A estabilidade foi avaliada imediatamente após a coleta (dia 0), 1 dia após (dia 1), 3 dias após (dia 2), 6 dias após (dia 6), 9 dias após (dia 9), 12 dias após (dia 12) e 30 dias após a coleta (dia 30). O material preparado nas diferentes condições descritas acima foi armazenado à -20 e à -80 °C, sendo descongelado somente momentos antes da injeção no sistema cromatográfico.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software Statistica® 6.0 através de teste t de Student, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Além disso, amostras com variação máxima de 15% foram consideradas estáveis, de acordo com a ANVISA.⁴²

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de vitamina C sérica é de interesse clínico, pois alterações em seus níveis podem refletir o acesso desta biomolécula aos tecidos.^{8,43} Além disso, é sabido que a vitamina C sérica é considerada um biomarcador do estresse oxidativo com suas concentrações alteradas em um grande número de patologias, tais como doença de Alzheimer e outras desordens neurológicas, especialmente aquelas relacionadas à cognição.^{12,18,24,44}

A separação cromatográfica de vitamina C sérica foi satisfatória com a fase móvel contendo 25 mM de NaH_2PO_4 e 0,00125% de NaN_3 , pois apresentou uma boa separação em relação a outros componentes do soro como ácido úrico. Um típico cromatograma da quantificação de Vitamina C em nível basal de uma amostra de soro é mostrado na Figura 1. O tempo de retenção para vitamina C foi de 5,7 min e o tempo total de corrida cromatográfica foi de 18 min, devido ao ácido úrico que tem um tempo de retenção de 15 min, cujo pico é mostrado também na Figura 1. O método não apresentou interferências no tempo de retenção da vitamina C quando se compararam as análises

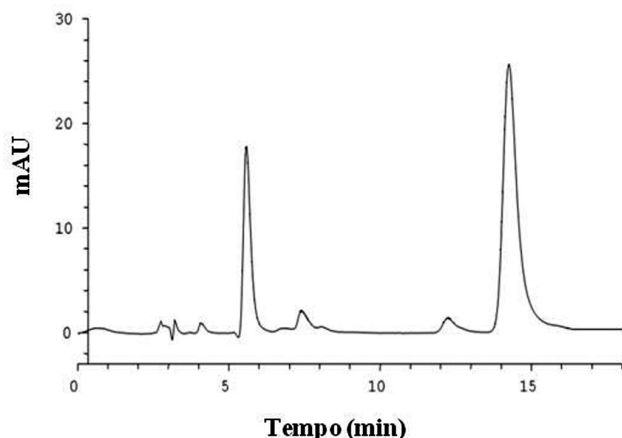


Figura 1. Cromatograma típico do nível basal de vitamina C em uma amostra sérica humana com TCEP após desproteïnização com HClO_4 . As condições cromatográficas foram: coluna C18 (250 X 4 mm; partículas de 5 µm); mantida a temperatura ambiente; alça de amostragem de 20 µL; detector UV $\lambda=245$ nm; fase móvel 25 mM NaH_2PO_4 e 0,00125% NaN_3 (pH 2,5); eluição isocrática com fluxo de 1,0 mL/min; tempo total de corrida cromatográfica: 18 min. Tempo de retenção da vitamina C: 5,7 min e do ácido úrico de 15 min

de padrões aquosos com análises de pool de soro, além disso, os picos cromatográficos apresentaram-se simétricos e com excelente resolução da linha de base.

A equação da reta obtida para curvas com adição de padrão no soro (n=5) foi $y = 0,6338x - 0,122$ e para curvas aquosas (n=5) $y = 0,597x - 0,0146$, e os coeficientes de regressão (r^2) foram 0,9989 e 0,9998 para as curvas com adição e aquosa, respectivamente. As curvas analíticas mostraram excelente linearidade e paralelismo no intervalo de concentração de 2-20 mg L⁻¹, incluindo toda a faixa de concentração provável de vitamina C em um indivíduo, com um coeficiente de correlação $> 0,995$, estando de acordo com a literatura.^{41,42} Neste sentido, as curvas de soro com adição de padrão e aquosa apresentaram comportamento semelhante, o que indica que é possível determinar este analito sem a necessidade de matriz para eliminar prováveis resultados falso-positivos na sua quantificação.

As precisões intra e interdia (expressa por % coeficiente de variação) e a exatidão (% bias) estão representadas na Tabela 1. A precisão intradia foi menor que 7% e a precisão interdia de todas as concentrações foi menor que 15%. A exatidão expressa pela tendenciosidade apresentou valores satisfatórios segundo a literatura, inferiores a $\pm 15\%$.^{41,42} Como pode ser visto ainda na Tabela 1, a análise de recuperação demonstrou que a vitamina C foi preservada durante todos os procedimentos de pré-tratamento da amostra, pois os valores encontrados estão dentro da faixa preconizada que é de $100 \pm 15\%$.^{41,42}

Tabela 1. Valores de precisão (intra e interdia), exatidão e recuperação encontrados para cada concentração de vitamina C

Concentração (mg L ⁻¹)	Precisão intradia (CV %)	Precisão interdia (CV %)	Exatidão (% bias)	Recuperação (%)
2	7,02	9,09	13,36	109,58
4	1,53	12,90	-4,35	98,25
8	1,11	11,11	-0,86	103,48
16	3,69	9,98	-1,87	102,09
20	6,76	13,87	1,38	107,27

O limite de detecção (LD) encontrado foi de 0,51 mg L⁻¹ e o limite de quantificação (LQ) foi de 1,71 mg L⁻¹. Os valores de referência para a vitamina C no soro variam de 6 a 16 mg L⁻¹, concentrações na faixa de 2 a 6 mg L⁻¹ indicam deficiência moderada e abaixo de 2 mg L⁻¹ representam uma deficiência grave,^{45,46} sendo assim o limite de quantificação (LQ) do presente método mostrou-se adequado à análise de vitamina C nas amostras de soro.

O método mostrou ser robusto frente a diferentes condições como analista e uso de padrões de vitamina C de diferentes marcas. O fluxo variou de 0,9 a 1,1 mL/min e os resultados mostraram que quanto maior o fluxo, menor é o tempo de corrida, sem perda da vitamina.

Os parâmetros de especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão obtidos permitem a utilização do método analítico desenvolvido para quantificação de vitamina C em amostras de soro, o qual não incluiu o uso de solventes orgânicos como fase móvel, sendo esta composta apenas por NaH_2PO_4 e NaN_3 , tornando o método mais barato. O emprego de água e metanol na solução de limpeza previne danos no sistema cromatográfico após o trabalho. Além disso, de acordo com os resultados encontrados, apenas a desproteïnização com ácido perclórico 10% é suficiente como tratamento pré-analítico, não sendo necessário o uso de solventes orgânicos ou outras etapas de extração, o que poderia aumentar o custo da análise e/ou prejudicar a quantificação de vitamina C.

A estabilidade da vitamina C é um problema chave na análise desta biomolécula, pois vários fatores atuam negativamente sobre a mesma,

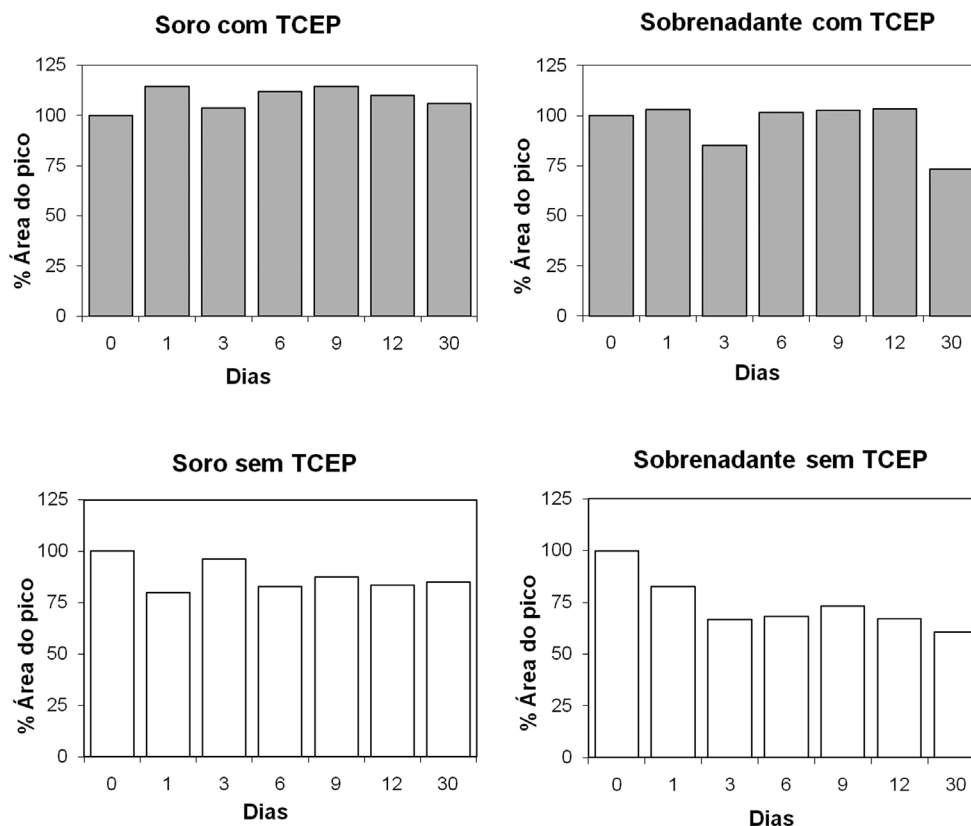


Figura 2. Estabilidade da vitamina C em soro* e em sobrenadante armazenados a temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, com e sem adição do antioxidante TCEP, mostrada em dias. *As amostras de soro congeladas foram desproteinizadas somente no momento da quantificação cromatográfica

como luz, calor, pH elevado, presença de oxigênio ou íons metálicos, por isso é necessário diminuir a influência destas variáveis ao mínimo.³²

A análise da estabilidade em amostras armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, com e sem o antioxidante TCEP, previamente desproteinizadas (sobrenadante) e desproteinizadas somente antes da injeção cromatográfica (soro) pode ser vista na Figura 1S (material suplementar). Os resultados mostraram que houve diferença significativa entre as concentrações de vitamina C das amostras com e sem TCEP ($p < 0,05$), sendo que as amostras sem TCEP não apresentaram quantidades quantificáveis no 30º dia, último dia de análise, o que indica a necessidade de antioxidante para evitar a queda brusca nos níveis de vitamina C, como descrito em outros trabalhos.^{8,40,47} Além disso, quando armazenado com TCEP, o soro demonstrou ser favoravelmente mais estável que o sobrenadante ($p < 0,05$), mantendo sua concentração por 30 dias (variação $< 15\%$) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, resultado contrário às amostras armazenadas sem TCEP, as quais não se mostraram estáveis nem por 24 h (variação $> 15\%$ na área do pico já no 1º dia).

Na Figura 2 são apresentados os resultados da estabilidade em soro e em sobrenadante armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, ao longo de 30 dias. Mais uma vez foram encontradas diferenças significativas entre os níveis de vitamina C das amostras armazenadas com e sem TCEP ($p < 0,05$).

As amostras sem TCEP apresentaram uma queda constante ao longo das análises realizadas em 30 dias, sendo que o soro não se mostrou estável e o sobrenadante permaneceu estável por somente 24 h (variação $< 15\%$).

A adição de TCEP evitou a diminuição dos níveis de vitamina C, mantendo a concentração do analito no soro íntegro por todos os dias em que houve análise. Lykkesfeldt⁴⁰ já havia demonstrado que TCEP mantém os níveis de vitamina C em baixo pH. Já o sobrenadante foi estável até o 12º dia (variação $< 15\%$), ou seja, apenas após esse dia é que houve diferença estatística entre o soro e o sobrenadante.

Em resumo, com o uso de TCEP a concentração inicial de vitamina C em pool de soro encontrada imediatamente após a coleta foi de $4,04 \pm 1,02\text{ mg L}^{-1}$, enquanto que após 30 dias, armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi de $4,01 \pm 0,38\text{ mg L}^{-1}$ e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi de $4,64 \pm 0,11\text{ mg L}^{-1}$, confirmando a necessidade de antioxidante em ambas as temperaturas de armazenamento.

Alguns estudos já demonstraram que a prévia desproteinação da amostra biológica e posterior armazenamento, com a presença ou ausência de algum antioxidante, garantia uma relativa estabilidade da vitamina C,^{8,17,32} porém, os resultados encontrados aqui para o sobrenadante (soro previamente desproteinado) demonstraram um comportamento similar ao soro sem desproteinação prévia somente na presença de TCEP e temperatura de armazenamento de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, ainda assim foi estável por um número menor de dias se comparado ao soro. Já na ausência de TCEP, e também nas análises das amostras armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a prévia desproteinação não favoreceu a estabilidade, não apresentando nenhuma vantagem. Conforme o exposto, a estabilidade da vitamina C parece estar relacionada à temperatura de armazenamento, ou seja, ela aumenta à medida que a temperatura diminui.⁴⁸

Diante disso, foi possível verificar que as melhores condições de armazenamento de amostras para posterior quantificação de vitamina C por CLAE foram o soro com adição de TCEP tanto a -20 quanto a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. No entanto, ainda são necessários mais estudos relacionados à estabilidade da vitamina C em diferentes temperaturas e condições, uma vez que este analito pode ser afetado por diversos fatores, como mencionado anteriormente.

CONCLUSÃO

O presente método de quantificação de vitamina C por CLAE em material biológico mostrou excelente sensibilidade analítica, especificidade, precisão, recuperação e linearidade havendo suficiente

separação da vitamina C dos demais constituintes do soro, ou seja, todos os parâmetros avaliados estão de acordo com as recomendações internacionais e com a legislação vigente no país.^{41,42}

Em relação à estabilidade da vitamina C, conclui-se que é dependente da temperatura de armazenamento, porém se houver adição de TCEP 9% ao soro logo após a coleta, este pode ser armazenado tanto a -20 quanto a -80 °C, mantendo-se as concentrações ao longo de 30 dias. Isto demonstra que há necessidade de antioxidante para quantificação desta vitamina no soro sem a necessidade de prévia desproteinização para armazenamento da amostra. Enfim, o método proposto é simples, de baixo custo quando comparado a outros métodos por CLAE e aplicável à rotina laboratorial. Por outro lado, pode-se sugerir ainda que para trabalhos científicos utilizando amostras de soro de animais de laboratório onde a coleta é, normalmente, no mesmo período para todos os animais, o soro ou sobrenadante poderiam ser utilizados com pequenas perdas, mas praticamente constantes, até 30 dias, se mantidas a -80°C.

MATERIAL SUPLEMENTAR

O material suplementar, disponível gratuitamente na forma de arquivo PDF em <http://quimicanova.s bq.org.br>, apresenta a Figura 1S. Estabilidade da vitamina C em soro* e em sobrenadante armazenados a temperatura de -20 °C, com e sem adição do antioxidante TCEP, mostrada em dias. *As amostras de soro congeladas foram desproteinizadas somente no momento da quantificação cromatográfica.

AGRADECIMENTOS

À CAPES/DAAD (PROBRAL 352/10) e ao CNPq - Edital Universal 2009 (concedida à S. C. Garcia) pelo apoio financeiro. Ao CNPq pela bolsa de doutorado (cota do pesquisador) concedida à M. Baierle e pela bolsa de pesquisadora concedida à S. C. Garcia.

REFERÊNCIAS

- Meister, A.; *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 1905.
- Chattejee, I. B.; Majumder, A. K.; Nandi, B. K.; Subramanian, N.; *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1975**, *258*, 24.
- Nishikimi, M.; Fukuyama, R.; Minoshima, S.; Shimizu, N.; Yagi, K.; *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 13685.
- Naidu, K. A.; *Nutr. J.* **2003**, *2*, 7.
- Aranha, F. Q.; Moura, L. S. A.; Simões, M. O. S.; Barros, Z. F.; Quirino, I. V. L.; Metri, J. C.; Barros, J. C.; *Rev. Nutr.* **2004**, *17*, 309.
- <http://www.nal.usda.gov.br>, acessada em Agosto 2011.
- Costa, M. J. C.; Terto, A. L. Q.; Santos, L. M. P.; Rivera, M. A. A.; Moura, L. S. A.; *Rev. Nutr.* **2001**, *14*, 13.
- Karlsen, A.; Blomhoff, R.; Gundersen, T. E.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *824*, 132.
- Buettner, G. R.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *300*, 535.
- Ratnam, D. V.; Ankola, D. D.; Bhardwaj, V.; Sahana, D. K.; Ravi, M. N. V.; *J. Controlled Release* **2006**, *113*, 189.
- Simon, J. A.; Hudes, E. S.; *J. Am. Coll. Nutr.* **1998**, *17*, 250.
- Myint, P. K.; Luben, R. N.; Welch, A. A.; Bingham, A. S.; Wareham, N. J.; Khaw, K. T.; *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *87*, 64.
- Wang, S.; Geraci, G.; Kuhlmann, M. K.; Levin, N. W.; Handelman, G. J.; *Nephrol. Dial. Transplant.* **2008**, *23*, 120.
- Malta, M. B.; Carvalhaes, M. A. B. L.; Parada, C. M. G. L.; Corrente, J. E.; *Rev. Bras. Epidemiol.* **2008**, *11*, 573.
- Hassan, G. I.; Onu, A. B.; *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.* **2006**, *6*, 293.
- Chung, W. Y.; Chung, J. K. O.; Szeto, Y. T.; Tomlinson, B.; *Clin. Biochem.* **2001**, *34*, 623.
- Janeb, M.; Bingham, S.; Ferrari, P.; Friesen, M. D.; Al-Delaimy, W. K.; Luben, R.; Wareham, N.; Khaw, K. T.; Riboli, E.; *Câncer Epidemiol. Biomarkers Prevention* **2005**, *14*, 1837.
- Paniz, C.; Bairros, A.; Valentini, J.; Charão, M.; Bulcão, P. R.; Moro, A. M.; Grune, T.; Garcia, S. C.; *Clin. Biochem.* **2007**, *40*, 1367.
- Fantini, A. P.; Brazaca-Canniatti, S. G.; Souza, M. C.; Mansi, D. N.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2008**, *28*, 435.
- Lee, S. H.; Oe, T.; Blair, I. A.; *Science* **2001**, *292*, 2083.
- Deaton, C. M.; Marlin, D. J.; *Clinical Techniques in Equine Practice* **2003**, *2*, 278.
- Chen, Q. I.; Espey, M. G.; Sun, A. Y.; Levine, M.; *Free Radical Biol. Med.* **2008**, *80*, 203.
- Lykkesfeldt, J.; Left, S.; Poulsen, H. E.; *Anal. Biochem.* **1995**, *282*, 329.
- Lykkesfeldt, J.; Lxft, S.; Nielsen, J. B.; Poulsen, H. E.; *Am. J. Clin. Nutr.* **1997**, *65*, 959.
- Levine, M.; Wang, Y.; Padayatty, S. J.; Morrow, J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 9842.
- Lykkesfeldt, J.; Lxft, S.; Nielsen, J. B.; Poulsen, H. E.; *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention* **2007**, *16*, 2513.
- Ng, L. L.; Ngkeekwong, F. C.; Quinn, P. A.; Davies, J. E.; *Diabetologia* **1998**, *41*, 435.
- Arya, S. P.; Mahajan, M.; Jain, P.; *Anal. Chim. Acta* **2000**, *417*, 1.
- Bates, C. J.; Bailey, A.; van der Berg, H.; *Inter. J. Vit. Nut. Res.* **1994**, *64*, 283.
- Cheng, M. L.; Liu, T. Z.; Lu, F. J.; Chiu, D. T.; *Clin. Biochem.* **1999**, *32*, 473.
- Zinellu, A.; Sotgia, S.; Deiana, L.; Carru, C.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2006**, *67*, 95.
- Nováková, L.; Solich, P.; Solichová, D.; *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 942.
- Lloyd, B.; Sinclair, H. M.; Webster, G. R.; *Biochem. J.* **1945**, *39*, xvii.
- Costa, M. J. C.; *Relatório Técnico de Pós-Doutorado*, Universidade de Nancy, França, 1992.
- Bradakhan, C. D.; Petrat, F.; Holzhauser, M.; Fuchs, A.; Lomonosova, E. E.; Groot, H.; Kirsch, M.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *58*, 207.
- Song, W. O.; Beecher, G. R.; Ettenmiller, R. R.; *Modern Analytical Methodologies in fat- and Water-soluble vitamins*, John Willey & Sons: New York, 2000.
- Margolis, S. A.; Davis, T. P.; *Clin. Chem.* **1988**, *34*, 2217.
- Kand'ár, R.; Záková, P.; *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 3503.
- Ching, S. Y. L.; Prins, A. W.; Beilby, J. P.; *Ann. Clin. Biochem.* **2002**, *39*, 518.
- Lykkesfeldt, J.; *Anal. Biochem.* **2000**, *282*, 89.
- <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>, acessada em Agosto 2011.
- http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm, acessada em Agosto 2011.
- Emadi-Konjin, P.; Verjee, Z.; Levin, A. V.; Adeli, K.; *Clin. Biochem.* **2005**, *38*, 450.
- Zandi, P. P.; Anthony, J. C.; Khachaturian, A. S.; Stone, S. V.; Gustafson, D.; Tschanz, J. T.; Norton, M. C.; Welsch-Bohmer, K. A.; Breitner, J. C. S.; *Arch. Neurol.* **2004**, *61*, 82.
- Tsuji, H.; Seabra, M. E. G.; Matsubara, B. B.; Burini, R. C.; *Rev. Bras. Patol. Clin.* **1993**, *29*, 83.
- Motta, V. T.; *Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações*, 4ª ed., Editora Médica Missau: Porto Alegre, 2003.
- Margolis, S. A.; Dwever, D. L.; *Clin. Chem.* **1996**, *42*, 1257.
- Hiatt, A. N.; Taylor, L. S.; Mauer, L. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3532.