

FACULDADE DE HIGIENE E SAÚDE PÚBLICA, DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
(Diretor: Prof. Dr. Francisco A. Cardoso)

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ORGÂNICA E BIOLÓGICA (Diretor: Prof. Dr. Dorival da Fonseca Ribeiro)

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO DO MAMÃO
(*Carica papaya*, L. 1753) (*)

DORIVAL DA FONSECA RIBEIRO

E

FRANCISCO A. CARDOSO

I) Introdução

De real importância para o especialista em nutrição é o conhecimento da composição química dos alimentos, do seu teor de princípios necessários ao organismo do homem.

Tal conhecimento é indispensável, por exemplo, para a organização de regimes, feita com critério científico, e não empírico; é imprescindível, também, para a correta tradução dos dados de um inquérito alimentar em termos de princípios nutritivos; ainda mais, conhecidos que sejam os alimentos particularmente ricos em determinados princípios indispensáveis à nossa nutrição, a eles poderemos recorrer de preferência e intensificar o seu consumo por meio de campanhas de educação alimentar. Eis, assim, porque o conhecimento da composição exata dos alimentos se reveste de tanta importância prática.

No Brasil, entretanto, tal problema ainda jaz, em parte, sem solução. Na verdade, o conhecimento da composição dos nossos alimentos é, ainda, fragmentário e incompleto. Em relação a muitos deles podemos nos valer dos dados constantes de excelentes tabelas estrangeiras, organizadas após número suficiente de análises rigorosamente feitas. Mas, no tocante aos nossos alimentos regionais, que não figuram nessas tabelas (ou, ainda que delas constem, não podemos afastar a possibilidade de variações da composição, por influência de diversos fatores), as dificuldades que

(*) Trabalho laureado com o prêmio "Silva Melo", de 1946, da Sociedade Paulista de Medicina Social e do Trabalho.

Recebido para publicação em 9 de abril de 1947.

encontramos são muito grandes. Este é, mais particularmente, o caso dos nossos frutos, no que diz respeito, em especial, ao seu teor vitamínico, pois sabemos que as técnicas de dosagem são em geral delicadas e requerem, via de regra, prévia adaptação ao material considerado, para melhores resultados.

Tendo presentes as considerações atrás expendidas, propusémo-nos a estudar o teor de ácido ascórbico do mamão, a fim de trazer nossa contribuição experimental ao conhecimento da composição dos nossos frutos.

II) O mamão, sua composição.

O mamão é o fruto da *Carica papaya*, L. 1753, família das Caricáceas. Pode ser ingerido verde (neste caso, cozido, em doces, por exemplo), ou após maturação. Esta última forma é a do consumo mais generalizado e, portanto, a ela nos vamos cingir.

Se bem que o nosso trabalho verse apenas sobre o teor de ácido ascórbico, acreditamos seja oportuno fazer breve referência à composição do mamão e ao seu teor não só de vitamina C como também de outras vitaminas.

Para isso, transcrevemos as referências que se seguem.

MacLeod e Taylor (1944) dão a seguinte composição por 100 g: Proteína — 0,699; Ca — 0,0189; Fe — 0,00032; Vit. A — 2.500 U. I.; Tiamina — 0,024 mg; Ácido Ascórbico — 44 mg; Riboflavina — 0,081 mg; Calorias fornecidas — 43.

Segundo Bridges e Mattice (1942) a composição do mamão é a seguinte (adaptados os dados originais para a porção de 100 g): Carboidratos — 5,75; Proteínas — 0,33; Gorduras — 0,5; Água — 88,7; Calorias fornecidas — 29,1. Quanto aos minerais e vitaminas os dados destes autores são (mg em 100 g): Ca — 19; P-13; Fe — 0,25; Vit. A — 2.500 U. I.; Vit. B₁ — 75 γ ; Riboflavina — 180 γ ; Vit. C — 45 mg.

Winton e Winton (1935) registram o resultado das análises feitas por Pratt e Del Rosario, Adriano e Thompson. Transcrevemos, a seguir, as percentagens médias obtidas por este último autor:

Polpa em relação ao fruto — 71; sólidos totais — 12,01; sólidos insolúveis — 2,00; proteína — 0,59; gordura — 0,10; ácidos como ácido cítrico — 0,15; açúcares redutores — 8,99; sacarose — 0,54; fibras — 1,37; cinzas — 0,61.

No que diz respeito ao teor em vitaminas, Fonseca Ribeiro (1942) registra os seguintes valores (p. 100 g): Caroteno — 1.700 γ ; Vit. B₁ — 30 γ ; Vit. B₂ — 20 γ ; Vit. C — 90 mg.

Em relação à vitamina C, que ora nos interessa, organizamos, para fins comparativos, a tabela abaixo (Tabela I), que reúne os dados de alguns autores.

AUTOR	Teor (mg p. 100 g)
Sherman e Lanford (1944)	33 — 35
Cooper, Barber e Mitchell (1938)	25 — 75
Eddy e Dalldorf (1941)	40
Hawley e Carden (1944)	35 — 55
McLeod e Taylor (1944)	44
Bridges e Mattice (1942)	45
Fonseca Ribeiro (1942)	90

(Tabela I)

Como vemos pelos dados atrás coligidos o mamão é fruto rico em várias vitaminas, destacando-se, mesmo, no que diz respeito às vitaminas A e C.

Em relação ao teor de vitamina C devemos registrar as grandes discordâncias existentes entre os vários autores, como se pode observar na tabela atrás inserta e na qual vemos que os valores dados oscilam de 25 mg a 90 mg. Este fato, por si só, já justificaria o trabalho a que nos propusemos, visando estabelecer, de modo definido, a taxa média da vitamina C no mamão. E, ainda mais, mesmo que houvesse concordância dos resultados anteriores, o que não se dá, achamos que não seria destituída de interesse a confirmação dos mesmos em análises de frutos locais, pois não podemos encarar como inexistente a hipótese de variações regionais da composição dos referidos frutos.

Passamos, agora, a fazer uma sinópsse crítica dos principais métodos de dosagem da vitamina C, para fundamentarmos as razões da escolha do método que usamos no presente trabalho.

III) Principais métodos de dosagem da vitamina C.

Mencionemos, de início, os métodos biológicos, hoje pouco usados, pelas relativas dificuldades técnicas que apresentam. Emprega-se, como animal de experiência, a cobaia, e os testes podem ser profiláticos, curativos ou ainda testes especiais, de difícil execução, como o da medida da intensidade das modificações histológicas dos dentes.

Quanto aos métodos físicos, destaquemos o espectroscópico; dá, êste método, resultados precisos, mas é muito trabalhoso e requer a adição de um estabilizador, ao material analisado, que evite a rápida oxidação da vitamina C.

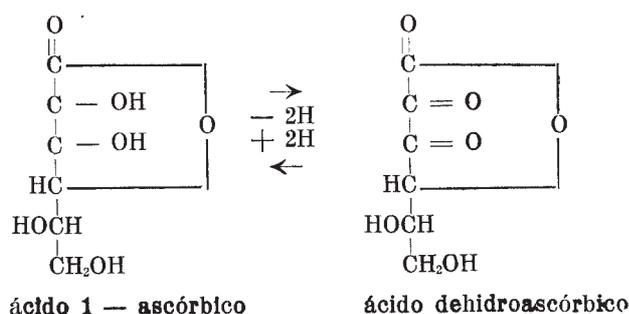
Praticamente, hoje em dia, só são empregados os métodos químicos, com várias modificações, mas baseados, em geral, nas propriedades fortemente redutoras do ácido ascórbico.

Dos métodos químicos, baseados na capacidade redutora do ácido ascórbico, os mais empregados são os que utilizam o 2,6^o — dicloro-

fenol-indofenol, e são modificações da técnica original de Tillmans (1927) (*) cujo nome, pelo seu trabalho de precursor, foi, com justiça, ligado ao referido reativo.

A simples titulação pelo reativo de Tillmans não dá, entretanto, via de regra, resultados satisfatórios, quando se trata da determinação da vitamina em presença de outras substâncias, em substratos de origem vegetal ou animal. Entre as principais causas de erro que contribuem para a imprecisão dos resultados, nas condições supramencionadas, apontamos as seguintes:

a) — A vitamina C pode encontrar-se, na natureza, sob a forma de uma provitamina, o ácido dehidroascórbico, que é uma forma oxidada. Geralmente existe, nos substratos animais ou vegetais, o ácido ascórbico juntamente com o ácido dehidroascórbico. Uma forma pode transformar-se na outra, mediante a reação reversível, abaixo representada:



No organismo, a reação se processa no sentido da transformação do ácido dehidroascórbico em ácido ascórbico. Portanto, é indispensável que, na dosagem da vitamina C nos substratos naturais, seja também computado o ácido dehidroascórbico. Ora, este, ao contrário do ácido ascórbico, não é titulável diretamente pelo 2,6 — dicloro-fenol-indofenol, pois, tratando-se de uma forma oxidada, é destituído de ação redutora. É necessário, portanto, um prévio processo de redução do ácido dehidroascórbico que, em várias técnicas aconselhadas, se faz por intermédio do H_2S . A não observância deste cuidado introduz possível causa de erro, “erro por omissão que, em muitos casos, pode atingir até 100%” (Leser, 1941).

Como exemplo dessa possível causa de erro vamos referir o citado por Fonseca Ribeiro (1942) no qual, em batatas analisadas, o ácido dehidroascórbico se não fôsse computado junto com o ácido ascórbico, induziria a um falso resultado, por omissão, em relação ao total dessas duas substâncias, variável, no caso citado, de 19,8% a 62,5%. Vemos,

(*) Cit. p. Rosenberg (1942).

portanto, a necessidade de, ao analisar uma determinada substância, verificar, em prévias determinações, a existência do ácido dehidroascórbico e, caso isso se dê em quantidade significativa para os fins visados pelo analista, é necessário que este introduza, na sua técnica de dosagem, a fase da transformação do ácido dehidroascórbico em ácido ascórbico, mediante, por exemplo, o tratamento pelo H_2S .

b) — Outra causa de erro, por vezes bastante significativa, é a que deriva do fato de, frequentemente, coexistirem com o ácido ascórbico, nos substratos naturais, substâncias indofenol-redutoras como, por exemplo, sulfatos, tiosulfatos, cisteína, glutathion, compostos sulfidrílicos, compostos orgânicos e inorgânicos ferrosos e férricos, ácido redúctico e reductona, etc., que interferem na reação, reduzindo o reativo de Tillmans, como o faz o ácido ascórbico.

E' mister, portanto, a eliminação desses interferentes, Tillmans-redutores, caso presentes em quantidade significativa. As técnicas inicialmente propostas com êsse objetivo, e que se baseavam na precipitação das substâncias interferentes foram, com vantagem, substituídas pelo processo de dupla dosagem das substâncias redutoras, com a intermediária destruição enzimática do ácido ascórbico.

A ascorbinase, fermento oxidante específico para o ácido ascórbico, descoberto por Szent-Györgyi, permitiu a Tauber e Kleiner (1935) estabelecer o processo de dosagem acima aludido, e que hoje tende a se generalizar, como processo de rotina. Nêle, faz-se uma primeira dosagem global, destroi-se depois o ácido ascórbico pela ascorbinase e, em seguida, procede-se a uma segunda dosagem, que evidenciará, apenas, as substâncias interferentes, o que permitirá, por diferença com a primeira dosagem, estabelecer o teor de ácido ascórbico real.

A técnica original de Tauber e Kleiner, com várias modificações, que a aperfeiçoaram, tem sido empregada em inúmeros trabalhos, merecendo registro, entre outras, as publicações nacionais de Leser (1941); Pimenta (1941); Ribeiro (1941); Ribeiro, Bonoldi e Ribeiro (1942); Ribeiro, Bonoldi e Ribeiro (1942 a); Fonseca Ribeiro e Bonoldi (1943); Bonoldi, Ribeiro e Ribeiro (1944); Bonoldi (1945) e Cardoso (1945).

Para exemplificar o erro a que poderíamos ser conduzidos se não eliminássemos do cômputo as substâncias interferentes, referiremos os dados de Cardoso (1945) que, dosando o ácido ascórbico na urina, verificou que, em muitos casos, tais interferentes existiam em quantidade maior que a do ácido ascórbico real e, em alguns mesmo, a totalidade das substâncias Tillmans-redutoras era representada pelas substâncias interferentes e não pelo ácido ascórbico.

Em face dessas considerações, vemos a necessidade de, além dos cuidados a serem tomados em relação ao ácido dehidroascórbico, eliminarmos também as causas de erro devidas aos interferentes.

Na análise de qualquer substância, deverá o analista, em prévias determinações, assegurar-se da não existência de interferentes em quan-

tidade significativa ou, caso contrário, lançar mão das modificações técnicas que permitem eliminar o erro a eles devido e que, como dissemos, se corporificam na moderna técnica que utiliza a oxidase do ácido ascórbico.

A não observância dessas precauções motivou da parte de Leser (1941) o seguinte comentário, com o qual concordamos integralmente: "Não resta dúvida, pois, de que os valores até agora encontrados para a vitamina C, nos alimentos, são sempre passíveis de crítica, desde que não tenham sido observadas as precauções indicadas, capazes de eliminar erros por excesso ou por falta".

c) — Outra causa de erros é a que decorre da instabilidade do ácido ascórbico diante de uma série de substâncias existentes no substrato vegetal ou ainda diante do próprio oxigênio do ar.

A estabilização do ácido ascórbico, para fins de dosagem, tem, hoje, no emprêgo do ácido metafosfórico a 3% o melhor recurso que se pode desejar. Além de contribuir para a extração da vitamina, desde que a trituração facilite o acesso à célula vegetal, o ácido metafosfórico, na percentagem referida, realiza uma concentração de hidrogeniões favorável à estabilidade da vitamina extraída.

Por todas essas razões é que procuramos nos cercar dos maiores cuidados, adaptando a técnica citada ao caso particular do mamão, como veremos a seguir.

IV) Adaptação da técnica de dosagem para o mamão.

Pelas razões atrás expendidas, resolvemos, inicialmente, adotar, em nosso trabalho, o método da dosagem da vitamina pela técnica modificada de Tauber e Kleiner.

Vários problemas técnicos tiveram de ser por nós previamente resolvidos; dêles salientamos, como principais, a obtenção de satisfatória eliminação dos pigmentos, os quais tornariam difícil a leitura do ponto de viragem e a questão de saber se, no mamão, existiam ou não, em quantidade significativa, o ácido dehidroascórbico e substâncias interferentes Tillmans-redutoras.

Passaremos, agora, a expor o que fizemos no sentido de resolver êsses problemas.

a) Utilização do álcool para eliminação dos pigmentos.

A filtração em papel de filtro comum, numa das fases da técnica usual de dosagem, deixa passar grande quantidade de pigmentos, que conferem ao líquido filtrado coloração amarelo-alaranjada. Isso não impede a leitura do ponto de viragem da reação, mas torna, entretanto, sua determinação exata assás difícil. Propusémo-nos então o problema de afastar êsses pigmentos, sem que, entretanto, tal operação interferisse, de forma alguma, com o resultado das dosagens.

Após várias tentativas, encontramos o que procurávamos no álcool absoluto (comercial), o qual precipita as mucinas e outras substâncias, e estas vão acarretar integralmente os pigmentos referidos, resultando, por filtração, um líquido límpido e incolor, e sem que essas operações tivessem interferido, de qualquer forma, nos resultados da dosagem. Tal conclusão nos foi facultada pelas seguintes experiências:

b) **Experiências destinadas a verificar a influência da precipitação pelo álcool no resultado da dosagem:**

Inicialmente, procuramos verificar se, na técnica em que não se procedia à redução com H_2S , a precipitação pelo álcool modificava o resultado da dosagem. Fizemos, então, as determinações representadas na Tabela II.

Mamão n.º	Amostra n.º	s/ H_2S s/ álcool	Características	s/ H_2S c/ álcool	Características
1	1	60,9	$M(*)=60,40$	59,9	$M = 60,48$
	2	59,9		61,4	
	3	59,9	$\sigma = 0,45$	59,9	$\sigma = 0,75$
	4	60,4		59,8	
	5	60,9	$\frac{\sigma}{M} = 0,7$	61,4	$\frac{\sigma}{M} = 1,2$
2	6	38,4	$M = 38,40$	40,4	$M = 39,58$
	7	38,3		39,4	
	8	38,4	$\sigma = 0,11$	39,8	$\sigma = 0,49$
	9	38,6		38,9	
	10	38,3	$\frac{\sigma}{M} = 0,3$	39,4	$\frac{\sigma}{M} = 1,2$
3	11	66,2	$M = 66,52$	66,7	$M = 66,86$
	12	67,2		68,0	
	13	66,7	$\sigma = 0,39$	66,2	$\sigma = 0,60$
	14	66,2		66,7	
	15	66,3	$\frac{\sigma}{M} = 0,6$	66,7	$\frac{\sigma}{M} = 0,9$

(Tabela II)

Incluimos, a seguir, a interpretação estatística dos dados desta série (Tabela II).

Verifica-se que as médias, quando o álcool é utilizado, são ligeiramente superiores às correspondentes, quando tal reativo não é usado.

(*) Nesta, como nas outras tabelas, M significa média; σ , desvio padrão e $\frac{\sigma}{M}$ coeficiente de variabilidade relativa; os resultados das características vêm apresentados com número de decimais menor do que o empregado durante o cálculo.

Procurando estudar a significância das diferenças entre as médias, pelo emprego do test "t", de Student, observa-se que nos mamões ns. 1 e 3 a diferença não é significativa e, no mamão, 2, o é no nível 5%, mas deixa de ser no nível 1%.

Tal verificação foi feita, entretanto, só para a técnica em que não se usa o H₂S. Importava repeti-la para a técnica mais completa, com fase de redução pelo H₂S.

Procedemos para isso a uma nova série de 15 determinações, cujos resultados estão representados na tabela III.

Mamão n.º	Amostra n.º	c/ H ₂ S s/ álcool	Características	c/ H ₂ S c/ álcool	Características
1	1	63,4	M = 63,08	59,8	M = 61,40
	2	61,8		63,0	
	3	62,3	$\sigma = 0,94$	60,9	$\sigma = 1,15$
	4	63,4		62,4	
	5	64,5	$\frac{\sigma}{M} = 1,5$	60,9	$\frac{\sigma}{M} = 1,9$
2	6	41,9	M = 41,98	42,4	M = 41,76
	7	42,4		42,5	
	8	41,9	$= 0,21$	40,5	$\sigma = 0,84$
	9	41,8		41,0	
	10	41,9	$\frac{\sigma}{M} = 0,5$	42,4	$\frac{\sigma}{M} = 2,0$
3	11	70,7	M = 70,16	68,8	M = 69,58
	12	70,5		70,8	
	13	69,7	$\sigma = 0,41$	70,7	$\sigma = 1,01$
	14	69,7		68,3	
	15	70,2	$\frac{\sigma}{M} = 0,6$	69,3	$\frac{\sigma}{M} = 1,5$

(Tabela III)

Incluimos, a seguir, a interpretação estatística dos dados desta nova série (Tabela III).

Ao contrário do resultado anterior observa-se aqui ligeira predominância das médias, quando não se utiliza o álcool.

A diferença entre as médias não é significativa no caso dos mamões 2 e 3, mas o é no nível de 5% e não no nível de 1%, no caso do mamão 1.

Do confronto dêste resultado com o anterior é lícito concluir que o acaso deve ser o responsável pelas ligeiras diferenças encontradas.

Em consequência desta interpretação, convencêmo-nos, de modo definitivo, da legitimidade do emprego do álcool na técnica de dosagem, o que então passamos a fazer sistematicamente.

c) **Pesquisa do ácido dehidroascórbico.**

Já nos referimos, no capítulo anterior, à necessidade de saber da concomitante existência do ácido dehidroascórbico no substrato, juntamente com o ácido ascórbico.

Para isso devemos lançar mão, por exemplo, do processo da redução prévia com o H_2S , para ulterior titulação com o reativo de Tillmans.

Para evidenciar a existência, no mamão, dessa provitamina e averiguar se isso se dá em quantidade significativa do ponto de vista prático, procedemos da seguinte forma:

Tomamos 4 amostras, 4 de cada mamão, e fizemos a dosagem comparativa, usando as duas técnicas, respectivamente, sem H_2S e com H_2S .

As 4 amostras de cada mamão correspondiam às 4 partes em que esquematicamente dividíamos o fruto e que designamos por partes a, b, c e d. (Para explicação desses símbolos ver pg. 185).

Descreveremos a seguir, rapidamente, a técnica usada.

No processo em que se não usa o H_2S , os reativos necessários e a técnica são os que se encontram às pgs. 185-187 e, por isso, nos dispensamos de incluí-los aqui.

No que diz respeito à técnica que utiliza a fase de redução pelo H_2S , os reativos necessários são os mesmos registrados às pgs. 185-187 acrescidos dos seguintes:

- a) Solução de Na_2CO_3 a 13%;
- b) Gás sulfídrico;
- c) Gás carbônico;
- d) Papel impregnado com acetato de chumbo.

Quanto à técnica propriamente dita, seguimos a que está indicada às pgs. 186-187 com a seguinte modificação: após a adição de álcool e filtração (item 5), procede-se da seguinte maneira:

a) Transferem-se 10 cm^3 para um tubo de ensaio e adiciona-se solução de carbonato de sódio a 13% até a obtenção de pH 6, o que geralmente se consegue com 0,4 a 0,5 cm^3 dessa solução; esta neutralização parcial é realizada com o fim de evitar a formação de enxofre coloidal no seio da amostra tratada, o que ocorre no pH do ácido metafosfórico a 3%.

b) Depois de fortemente agitado o tubo, para o desprendimento de CO_2 , procede-se à passagem de uma corrente de H_2S pelo tempo de 5 minutos; a seguir, coloca-se em banho-maria a 40° pelo prazo de 30 minutos, tendo-se o cuidado de tamponá-lo por meio de um dedo de borracha; eliminamos a seguir o H_2S por uma corrente de CO_2 , até reação negativa do anião sulfureto com o papel de acetato de chumbo umedecido, depois toma-se 1 cm^3 do líquido e titula-se pelo reativo de Tillmans.

Os resultados das dosagens procedidas encontram-se consubstanciados na tabela IV.

Amostra n.º	a		b		c		d	
	s/H ₂ S	c/H ₂ S						
1	137,50	144,73	86,50	91,05	130,00	136,84	129,50	135,79
2	90,50	95,26	70,00	73,70	85,50	90,00	71,50	78,94
3	100,00	105,26	100,00	105,26	83,50	87,89	92,50	97,34
4	141,50	148,94	100,00	107,90	113,50	120,00	120,00	134,21
5	95,00	100,00	53,00	57,72	71,50	76,31	46,00	48,42
6	83,00	87,36	58,00	63,15	92,00	96,84	80,00	84,73
7	60,00	65,78	61,00	65,76	61,00	65,76	63,00	69,47
8	73,50	79,47	70,00	74,73	77,50	81,57	86,00	89,99
9	85,50	89,99	77,50	81,57	91,00	96,31	91,00	96,27
10	100,00	105,26	100,00	105,26	102,50	107,89	110,00	114,73
M	96,65	102,21	77,60	82,61	90,80	95,94	88,95	94,99
σ	25,56	25,05	17,25	17,78	19,26	19,99	24,45	26,09
$\frac{\sigma}{M}$	26,40%	24,50%	22,20%	21,50%	21,20%	20,80%	27,50%	27,50%

(Tabela IV)

Incluimos a seguir o estudo estatístico dos dados atrás mencionados.

Nota-se que os valores obtidos com H_2S são constantemente superiores aos correspondentes sem H_2S e que a variabilidade relativa, em qualquer das porções, apresenta-se mais ou menos constante, o seu valor girando em torno de 25%.

Utilizando-se do teste "t" para pôr em prova a significância das diferenças entre médias com e sem H_2S , em cada uma das partes, verifica-se que as diferenças em todas elas são altamente significantes, como mostra a tabela seguinte (Tabela V).

Porção analisada	Média		Diferença	t	Valor de significância no nível (NGL = 9)	
	s/ H_2S	c/ H_2S			5 %	1 %
					(2,262)	(3,250)
a	96,65	102,21	5,56	16,484	2,262	3,250
b	77,60	82,61	5,01	14,034	2,262	3,250
c	90,80	95,94	5,14	18,064	2,262	3,250
d	88,95	94,99	6,04	5,979	2,262	3,250

(Tabela V)

Relação entre os resultados s/ H_2S e c/ H_2S .

Relacionando-se por quociente as médias c/ H_2S e as s/ H_2S obtêm-se os resultados constantes da tabela abaixo (Tabela VI):

Porção	Média c/ H_2S / Média s/ H_2S
a	105,7
b	106,5
c	105,7
d	106,8
a + b + c + d	106,1

(Tabela VI)

Esses resultados indicam que as médias c/ H_2S valem aproximadamente 6% a mais do que as s/ H_2S .

Chegamos, assim, à conclusão de que o ácido dehidroascórbico existe em pequena proporção. Para o teor médio de ácido ascórbico, de 88,50 mg (*), encontramos a média de 5,44 mg (**) de ácido dehidroascórbico, o que representa 6,1% da quantidade média de ácido ascórbico e 5,8% da quantidade média (93,94) de vitamina C, sob ambas as formas. Dá-se aqui coisa muito diferente de outros casos, como aquele que, atrás transcrevemos de Fonseca Ribeiro em que o teor de ácido dehidroascórbico chega a sobrepujar o de ácido ascórbico. Em conclusão, achamos que, para os fins práticos, no caso do mamão, torna-se dispensável proceder sistematicamente à dosagem do ácido dehidroascórbico, visto como a quantidade existente é muito pequena e, se a desprezarmos, não cometeremos em média, erro superior a 6,1%. Entretanto, para termos resultado mais exato, sem fazermos a redução com o H₂S, devemos proceder a uma estimativa, e que, de acordo com as experiências que acabamos de relatar consistirá em acrescentar, ao valor encontrado para o ácido ascórbico, 6,1%, o que corresponderá à quantidade provável de ácido dehidroascórbico.

Baseados nas verificações feitas e segundo esta nossa interpretação dispensámo-nos de proceder, nas restantes amostras de mamão (112), à relativamente trabalhosa redução pelo H₂S, visto como, do resultado obtido, sem esse detalhe, e referente apenas ao ácido ascórbico poderemos, se o quizermos, inferir aproximadamente o total introduzindo a correção, atrás aludida.

d) **Verificação das diferenças entre as médias dos valores com H₂S nas quatro partes.**

Empregou-se para isso o test "F" para apreciar se, no conjunto, as médias obtidas nas 4 partes eram significativamente diversas umas das outras. O resultado foi o seguinte:

Origem da variação	Valor da variação	Graus de liberdade	Variância
Intraclasses . .	20244,86863	36	562,3574
Interclasses . .	2017,8347075	3	672,6115
Total . .	22262,7033375	39	

(Tabela VII)

Valor aproximado de F no nível 5%: 2,9.

$$F = \frac{672,6115}{562,3574} = 1,196$$

(*) Este resultado é a média das 40 dosagens sem H₂S; sendo a média das 40 dosagens com H₂S igual a 93,94, a quantidade média de ácido dehidroascórbico vale, como salientamos no texto (**), 5,44,

O resultado obtido indica claramente que não é significativa a diferença de médias tomadas no seu conjunto. Procurando analisar mais detidamente as diferenças de médias empregou-se o test "t" para tôdas as seis combinações das médias tomadas duas a duas. Os resultados foram os seguintes:

Combinação	Dif. entre as médias	Valor de t	Valor de significância ao nível	
			5 %	1 %
a — b	19,60	3,077	2,262	3,250
a — c	6,264	1,516	2,262	3,250
a — d	7,216	1,247	2,262	3,250
b — c	-13,331	2,397	2,262	3,250
b — d	-12,379	2,420	2,262	3,250
c — d	0,952	0,236	2,262	3,250

(Tabela VIII)

Verifica-se claramente que apenas as diferenças em que entra a porção **b** são ligeiramente significantes, os seus valores superando os de "t" no nível 5%, mas sendo superados pelo de "t" no nível 1%.

e) Pesquisa de interferentes.

Para eliminar a possibilidade da existência das substâncias interferentes, Tillmans-redutoras, já citadas, fizemos a dosagem global em 60 amostras, de 15 mamões (4 de cada), destruindo, a seguir, o ácido ascórbico, pela ascorbinase, e procedendo, depois, a uma segunda dosagem, que revelaria, apenas, os interferentes, caso presentes. A diferença entre os resultados da primeira e da segunda dosagens nos dará o teor de ácido ascórbico real. No caso do mamão, verificamos, por essa técnica, a inexistência de substâncias interferentes, ao contrário do que os autores já têm registrado para outros frutos, como, por exemplo, a uva, o figo (Ribeiro, 1941), a manga (Pimenta, 1941), a banana (Leser, 1941), etc. Como foi sistematicamente nulo o teor de substâncias interferentes nas 60 amostras de mamão examinadas, tornou-se supérflua a análise estatística.

Graças à verificação minuciosa que fizemos da inexistência dessas substâncias, dispensámo-nos de proceder, nas restantes amostras, (92), à dupla dosagem com a fase intermediária da ascorbinase.

Descreveremos, a seguir, o método usado na determinação da vitamina C, com o auxílio da ascorbinase (cf. Ribeiro, Bonoldi e Ribeiro, 1942 a e Cardoso, 1945).

A ascorbinase, fermento específico que destrói o ácido ascórbico, como o provaram Tauber e Kleiner (1935), pode ser preparada como

se verá adiante, desde que tenhamos inicialmente à disposição os seguintes reativos: 1) solução N de acetato de bário; 2) solução N de sulfato de sódio; 3) solução saturada de sulfato de amônio; 4) tolueno.

Preparação da ascorbinase — Ralam-se 6 pepinos verdes e comprimem-se em flanela de algodão para extrair o caldo. Mede-se, em seguida, em um cálice graduado e, para cada 1000 cm³ de caldo, juntam-se 40 cm³ de uma solução de (CH₃COO)₂ Ba M; agita-se muito bem, deixa-se decantar, retira-se o líquido sobrenadante, desprezando-se o precipitado, mede-se novamente o volume e, para cada 1000 cm³, juntam-se 100 cm³ de uma solução de (NH₄)₂SO₄ saturada; deixa-se decantar e, ao líquido sobrenadante, junta-se sulfato de amônio, até a saturação, precipitando desta maneira a ascorbinase; centrifuga-se, recolhe-se o precipitado, que é lavado com uma solução saturada de sulfato de amônio, centrifuga-se novamente e, ao precipitado suspenso em um pequeno volume de água, junta-se uma gota de toluol e deixa-se dialisar em saco de celofane, pelo espaço de 24 hs.; o conteúdo do saco é filtrado e conservado em geladeira. A ascorbinase assim preparada deve ter sua atividade enzimática determinada, procedendo-se a essa verificação como segue:

Em uma série de 6 tubos de ensaio coloca-se 1 cm³ de uma solução de ácido ascórbico previamente titulado com o reativo de Tillmans e junta-se 1 cm³ de solução tampão pH 6.

O tubo n. 1 reservamos para testemunho, que nos permita calcular a oxidação espontânea. Nos demais tubos acrescentamos 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 cm³, respectivamente, de ascorbinase; em seguida colocamos em banho-maria a 38°, pelo espaço de 15 minutos; após êsse lapso de tempo inibimos a ação da ascorbinase com 2 cm³ da solução de ácido metafosfórico. Deduzimos do total a quantidade de ácido ascórbico transformado por oxidação espontânea do primeiro tubo e teremos a quantidade de ácido ascórbico oxidado pela ação da ascorbinase em cada um dos tubos, mediante titulação pelo reativo de Tillmans.

Com êsses dados calcula-se a quantidade de ascorbinase necessária a cada dosagem.

Findo êsse trabalho preliminar, da preparação da ascorbinase e verificação de sua atividade, temos à disposição o principal reativo para se proceder à determinação do ácido ascórbico no extrativo vegetal. Além dos reativos já citados a propósito quer da dosagem simples direta (pgs. 185-186), quer da valorização do ácido dehidroascórbico pela redução com o H₂S (pg. 179), faz-se necessário mais o seguinte:

Solução tampão aceto-acética 0,2 N, pH 6.

Técnica de dosagem:

A seqüência de operações pode ser assim estabelecida:

1) 1 cm³ da amostra extrativa em ácido metafosfórico a 3% e já tratada pelo álcool (fase 5 da técnica geral, pgs. 186-187) é transferido para

um tubo de ensáio e parcialmente neutralizado com carbonato de sódio a 13% (cerca de 0,5 cm³);

- 2) Coloca-se, a seguir, 1 cm³ de tampão aceto-acético 0,2 N, a pH 6;
- 3) Junta-se a solução de ascorbinase em quantidade apropriada, e de conformidade com a sua atividade;
- 4) Leva-se o conjunto ao banho-maria a 38° C., pelo espaço de 30 minutos;
- 5) Verifica-se o consumo de Tillmans, pelo qual são responsáveis as substâncias Tillmans-redutoras que existem no meio.

f) Pesquisa da igualdade ou desigualdade da distribuição do ácido ascórbico nas diferentes partes do fruto.

E' sabido que, em muitos frutos, o ácido ascórbico se distribui muito desigualmente, nas diferentes partes, como, por exemplo, já foi demonstrado para a laranja-lima (Ribeiro, Bonoldi e Ribeiro, 1942). Afim de verificar, para o mamão, se fato semelhante se dava, procedemos da seguinte forma:

De cada mamão retirávamos uma talhada longitudinal, do pedúnculo à ponta. Isso feito, descascávamos cuidadosamente essa talhada e retirávamos as sementes. A seguir, dividíamos-la em duas por uma secção longitudinal, a meia distância entre a superfície correspondente à casca (externa) e a superfície correspondente às sementes (interna). Depois, por uma secção mediana transversal, dividíamos cada uma das duas porções (externa e interna) em duas outras, uma proximal, junto ao pedúnculo e outra distal, junto à ponta. Resultavam, assim, 4 porções, que designamos por letras, segundo o esquema que se segue.

LETRA	PORÇÃO
a	distal interna
b	distal externa
c	proximal interna
d	proximal externa

(Tabela IX)

De cada uma dessas porções era retirada uma amostra, que era submetida à análise, pela técnica que descreveremos a seguir.

V) **Dosagem; reativos necessários, técnica** (V. Ribeiro, Bonoldi e Ribeiro, 1942 a e Cardoso, 1945).

a) **Reativos necessários.**

- 1) Solução de ácido metafosfórico a 3%;

2) Solução de KIO_3 0,01N; esta solução, sendo guardada em lugar fresco não se altera;

3) Solução de SO_4H_2 a $\frac{1}{4}$;

4) Solução de amido a 1%;

5) Solução de ácido ascórbico, para titulação do reativo de Tillmans. Esta solução deve ser preparada no momento do uso, contendo aproximadamente 50 mg % de ácido ascórbico, cujo conteúdo exato será determinado pela solução de KIO_3 0,01N, conforme técnica de Pimenta (1939). Para isto, colocam-se em um frasco de Erlenmeyer, de 100 cm^3 de capacidade, 50 cm^3 de água destilada, 0,5 g de IK isento de iodato, 1 cm^3 da solução de SO_4H_2 e, com rigor, 1 cm^3 da solução de KIO_3 0,01 N; de uma microbureta contendo a solução de ácido ascórbico recentemente preparada, conforme foi dito acima, verte-se vagarosamente e com agitação constante, no Erlenmeyer, até que a coloração amarela do iodo se torna quase imperceptível; junta-se, então, 1 cm^3 da solução de amido, espera-se o desenvolvimento total da coloração azul e continua-se vertendo da microbureta a solução de ácido ascórbico, porém, desta vez, gota a gota, tendo-se o especial cuidado de agitar fortemente entre uma e outra gota, até que a coloração desapareça totalmente. A quantidade de ácido ascórbico contida por cm^3 da solução, obtém-se dividindo 0,880 pelo número de cm^3 da solução de ácido ascórbico gasto na titulação.

6) Reativo de Tillmans. Pesam-se 200 mg de 2-6 dicloro-fenol-endo-fenol e junta-se 1 litro de água destilada aquecida a cerca de 70°C ; agita-se muito bem até a completa dissolução do sal, filtra-se em papel de filtro analítico, junta-se cerca de 0,5 g de NaHCO_3 , que age como conservador, garantindo pelo espaço de 20 a 30 dias o título do reativo, quando guardado em geladeira e em vidro escuro. A titulação se procede contra uma solução de ácido ascórbico previamente titulado pelo iodato, vertendo-se de uma microbureta a solução de Tillmans em um Erlenmeyer contendo 1 cm^3 da solução de ácido ascórbico e 2 cm^3 da solução de ácido metáfosfórico até o aparecimento de uma leve coloração rósea, que deverá persistir, pelo menos, por 5 minutos. O título do reativo de Tillmans obtém-se pela aplicação da fórmula: $T = \frac{A}{n - 0,07}$ em que $T =$ título do reativo de Tillmans, ou seja n , de mg de ácido ascórbico oxidável por 1 cm^3 do reativo; $A =$ mg de ácido ascórbico presentes em 1 cm^3 da solução; $n =$ n. de cm^3 gastos na titulação; 0,07 = quantidade de reativo de Tillmans necessário para uma viragem nítida para uma prova em branco;

7) Alcool etílico (98-99%).

b) Técnica de dosagem.

1) Cada talhada de um mamão é dividida em 4 partes (a, b, c e d), como já foi explicado;

2) Trituram-se, a seguir, separadamente, as diversas porções, em gral de porcelana;

- 3) Pesam-se, de cada uma delas, 10 g da substância, em um “beaker”;
- 4) Juntam-se, a cada uma das 4 amostras, 20 cm³ da solução de ácido metafosfórico a 3% e deixa-se em contacto durante 30 minutos;
- 5) Juntam-se, a seguir, a cada amostra, 20 cm³ de álcool (98-99°) e filtra-se;
- 6) Coloca-se num Erlenmeyer de 50 cm³ 1 cm³ do filtrado e titula-se pelo reativo de Tillmans.

VI) **Apresentação conjunta dos dados das análises.**

Reunimos no quadro que se segue (Tabela X) os resultados da análise de 38 mamões (incluindo os 10 já mencionados) cada um deles tendo fornecido 4 amostras, correspondendo às 4 partes do fruto (conforme vimos atrás), num total de 152 dosagens (Tabela VI).

Amostra n.º	P O R Ç Ã O			
	a	b	c	d
1	137,5	86,5	130,0	129,5
2	90,5	70,0	85,0	71,5
3	100,0	100,0	83,5	92,5
4	141,5	100,0	113,5	120,5
5	95,0	53,0	71,5	46,0
6	83,0	58,0	92,0	80,0
7	60,0	61,0	61,0	63,0
8	73,5	70,0	77,5	86,0
9	85,5	77,5	91,0	91,0
10	100,0	100,0	102,5	110,0
11	105,6	59,5	80,2	54,2
12	50,4	44,2	57,6	51,8
13	36,0	33,1	31,2	37,4
14	31,7	37,0	33,1	48,0
15	93,1	59,0	76,3	62,4
16	171,4	101,2	185,3	182,4
17	53,3	37,4	48,5	53,8
18	58,6	59,5	60,5	54,2
19	91,2	91,2	96,0	109,0
20	104,6	73,9	71,5	58,6
21	72,5	52,8	86,9	59,5
22	45,6	53,8	54,7	87,4
23	49,0	62,2	42,2	56,3
24	62,2	57,6	55,7	25,9
25	57,6	57,6	33,1	31,6
26	38,9	33,6	59,0	64,8
27	45,6	50,4	62,2	103,2
28	20,0	19,2	28,8	24,0
29	49,0	52,8	53,8	56,6
30	53,3	46,1	76,8	63,4
31	62,5	64,4	71,7	73,7
32	115,0	69,6	98,6	62,0
33	88,2	93,6	89,9	87,9
34	58,2	56,0	68,1	55,1
35	66,8	46,1	66,7	58,9
36	60,0	52,7	74,7	38,6
37	90,7	74,6	92,9	58,8
38	83,7	71,0	91,3	86,2

As características estatísticas constam do quadro seguinte:

Porção	M	σ	σ/M
a	75,82	31,71	41,8 %
b	62,79	20,06	31,9 %
c	75,14	29,02	38,6 %
d	70,93	30,83	43,5 %
a + b + c + d	71,17	28,76	40,4 %

(Tabela XI)

São bastante frizantes as diferenças desses resultados em relação aos das 10 observações utilizadas para a verificação do efeito do H₂S. Todas as médias sofrem uma acentuada redução e as variabilidades um sensível aumento. O aspecto conjunto não se modifica, entretanto, intensamente; a menor média continua a pertencer à porção b, a maior à porção a, que continua a exceder ligeiramente as das porções c e d.

A explicação das diferenças dos resultados dos dois grupos de mamões, tomados separadamente, diferenças estatisticamente apuradas, reside no fato de que, nos 10 primeiros mamões o grau de maturação não era tão avançado quanto nos 28 restantes. De um modo geral, nos frutos muito maduros, o teor de vitamina C é menor do que naqueles de maturidade menos adiantada. Como, na prática, todos eles são igualmente consumidos, acreditamos que para o nosso trabalho seria útil analisarmos frutos em ambas as condições e foi o que o fizemos.

Procedendo-se de forma análoga à empregada no estudo das diferenças entre médias com H₂S obtiveram-se para o test "F" os resultados seguintes:

Origem da variação	Valor da variação	Graus de liberdade	Variância
Intra-classe	121614,19	148	821,72
Inter-classe	4090,08	3	1363,36
Total	125704,27	151	

(Tabela XII)

$$F = \frac{1363,36}{821,76} = 1,66$$

Valor aproximado de F no nível 5%: 2,7.

Foram obtidos, para o test "t" os seguintes resultados:

Combinação	Diferença entre as médias	Valor de t	Valor de significância ao nível de	
			5%	1%
a — b	13,0289	4,13	2,02	2,71
a — c	0,6816	0,30	"	"
a — d	4,8868	1,24	"	"
b — c	-12,3474	3,53	"	"
b — d	-8,1421	2,37	"	"
c — d	-4,2053	1,50	"	"

(Tabela XIII)

As conclusões, aqui, são aproximadamente iguais às do caso com H₂S, isto é, as médias, tomadas no seu conjunto, não apresentam diferenças significantes; apenas as diferenças em que entra a porção b são significantes, as combinações de b com a e de b com c o sendo mesmo no nível de 1%.

Como vimos pela análise estatística, a média global assume o valor de 71,17 mg p. 100 g o que mostra a grande riqueza do mamão em ácido ascórbico, o que ainda se torna mais evidente, se compararmos com o teor de outros frutos. Na verdade, lançando mão dos dados registrados por Fonseca Ribeiro (1942) para o teor de vitamina C de vários frutos vemos que o mamão, atribuindo-se-lhe a taxa por nós encontrada, ocupa a primazia; assim, temos: (Tabela XIV)

	Teor em Vit. C (mg p. 100 g)
Mamão	71,17
Morango	58
Laranja (em geral)	50
"Grape-fruit"	44
Limão (em geral)	30
Manga	30
Abacaxi	28
Tangerina	28
Melancia	19
Abacate	16
Melão	10
Banana	10
Figo (fresco)	8
Pêssego	7
Maçã	6
Ameixa	5
Pera	3
Uva	3

(Tabela XIV)

Da consideração do teor de ácido ascórbico que encontramos no mamão e da posição desse fruto, nesse particular, em relação aos outros (como vimos na tabela XIV), tendo-se em vista o seu preço módico, seu agradável paladar, sua abundância durante praticamente todas as estações do ano, é lícito concluir que o seu consumo deve ser incrementado, por tôdas as formas.

VII) Conclusões:

1) O mamão, fruto da *Carica papaya*, L. 1753, em estado de maturação, é rico em ácido ascórbico, sendo o seu teor médio 71,17 mg p. 100 g de fruto.

2) O ácido dehidroascórbico encontra-se em pequena quantidade, estimável em 6,1% do teor de ácido ascórbico.

3) Adotada a estimativa de 6,1% de ácido dehidroascórbico, pode-se estimar o teor médio total da vitamina C do mamão (ácido ascórbico + ácido dehidroascórbico) em 75,51 mg p. 100 g do fruto.

4) Não existem no mamão substâncias Tillmans-redutoras interinterentes, o que dispensa a dosagem dupla diferencial, com destruição intermediária do ácido ascórbico, pela ascorbinase.

5) No seu conjunto, não existem diferenças estatisticamente significativas no teor de ácido ascórbico nas diferentes partes do fruto, sendo, entretanto, digna de registro, a menor quantidade encontrada na porção distal externa do fruto.

6) Deve-se incrementar, em nossa população, o consumo do mamão, como excelente fonte, que é, de vitamina C.

S U M Á R I O

Os A. A. estudaram o teor de ácido ascórbico do mamão (*Carica papaya*, L. 1753) e sua distribuição em 4 porções diferentes do fruto: a) porção distal interna; b) porção distal externa; c) porção proximal interna; d) porção proximal externa. Trabalhando com 38 amostras diferentes de frutos maduros e dosando o ácido ascórbico nas quatro partes de cada amostra verificaram:

- 1) O teor médio de ácido ascórbico no fruto integral é de 71,17 mg por 100 g;
- 2) O teor de ácido dehidroascórbico representa 6,1% do valor do ácido ascórbico;
- 3) A soma de ácido ascórbico e ácido dehidroascórbico fornece a cifra de 75,51 mg de vitamina C para 100 g de fruto integral;
- 4) Não existem diferenças estatisticamente significativas no teor de vitamina C nas quatro diferentes porções examinadas, embora

haja tendência para ligeira diminuição na porção distal externa do fruto;

- 5) Não existem, praticamente, substâncias estranhas Tillmans-reduutoras no mamão, o que dispensa a dosagem dupla diferencial, com destruição intermediária do ácido ascórbico, pela arcorbinase.

S U M M A R Y

The authors studied the contents of ascorbic acid in the papaw (*Carica papaya* L. 1753), and its distribution in four different portions of the fruit: a) the distal internal; b) the distal external; c) the proximal internal; d) and the proximal external portion.

Working with 38 different samples of ripe fruits and dosing the ascorbic acid contents in the four portions of each sample, they found the following results: 1) The average contents of ascorbic acid in the whole fruit is 71,17 mg per 100 g; 2) The contents of dehydroascorbic acid represent 6,1% of the value of ascorbic acid; 3) Summing the ascorbic and dehydroascorbic acids they obtained the following figure: 75,51 mg of vitamin C for 100 g of the whole fruit; 4) There are no statistically significant differences in the amount of vitamin C in the four different portions examined, although there is a slight tendency for less in the distal external portion of the fruit; 5) There is practically no foreign Tillmans-reducing matter in the papaw, dispensing the double differential dosage, with the intermediate destruction of ascorbic acid by the ascorbic acid oxidase.

Bibliografia citada.

- BONOLDI, V. (1945) — “Do teor da vitamina C em diversos estágios de soja germinada” — Tese, São Paulo, 1945.
- BONOLDI, V., RIBEIRO, R. F. e RIBEIRO, O. F. (1944) — “Sobre a oxidação do ácido ascórbico levada a efeito em presença do ion cúprico e suas relações com determinada concentração de xantina, antagônica dessa oxidação” — Rev. Fac. Med. Vet. São Paulo, 2: 233-246, nov., 44.
- BRIDGES, M. A. e MATTICE, M. R. (1942) — “Food and Beverage analyses” — Lea and Febiger, Philadelphia, 1942, 2nd ed.
- CARDOSO, F. A. (1945) — “Avaliação do estado nutritivo de uma coletividade pela dosagem da vitamina C na urina; significação sanitária desse método” — Rev. Med. Cir. São Paulo, 5: 245-270'45.
- COOPER, L. F., BARBER, E. M. e MITCHELL, H. S. (1938) — “Nutrition in health and disease” — J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1938, 7th ed.
- EDDY, W. H. e DALLDORF, G. (1941) — “The avitaminoses” — Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1941, 2nd ed.
- FONSECA RIBEIRO, D. (1942) — “Vitaminas. Noções fundamentais, teor nos alimentos” — Imprensa da Univ. S. Paulo, 1942.
- FONSECA RIBEIRO, D. e BONOLDI, V. (1943) — “Da proteção do ácido ascórbico “in vitro” pela xantina, substâncias correlatas e extrato hepático total ou não, contra agentes da oxidação” — Rev. Fac. Med. Vet. São Paulo, 2: 87-97, dez. '43

- HAWLEY, E. E. e CARDEN, G. (1944) — "The art and science of nutrition" — The C. V. Mosby Co., St. Louis, 1944, 2nd. ed.
- LESER, W. S. P. (1941) — "Da importância na higiene alimentar em nossa população, do suprimento de vitamina C pela *Musa chinensis*, Sweet, (banana nanica), e *Musa paradisiaca*, L., sub-espécie *sapientum*, Schum., variedade maçã, (banana maçã) e da exigência de se praticar o doseamento da vitamina C, com redução pelo gás sulfídrico e oxidação pela ascorbinase" — Tese, São Paulo, 1941.
- McLEOD, G. e TAYLOR, C. M. (1944) — "Rose's Foundation of nutrition" — The MacMillan Co., New York, 1944, 4th ed.
- PIMENTA, N. (1939) — "Dosagem da vitamina C. Técnica simplificada de padronização das soluções de ácido ascórbico" — O Hospital, 16: 439, set. '39.
- PIMENTA, N. (1941) — "Da proteção do ácido ascórbico observada em dosagens pelo método enzimático. Experimentação na manga (*Mangifera indica* L.)". Tese, S. Paulo, 1941.
- RIBEIRO, O. F. (1941) — "Doseamento do ácido ascórbico em vegetais sulfatados" — Rev. Fac. Med. Vet. São Paulo, 2: 3-7, '41.
- RIBEIRO, R. F., BONOLDI, V. e RIBEIRO, O. F. (1942) — "Sobre a distribuição de vitamina C nas diferentes partes de "*Citrus limetta* risso (laranja lima)" — Rev. Fac. Med. Vet. São Paulo, 2: 23-27, set.'42.
- RIBEIRO, R. F., BONOLDI, V. e RIBEIRO, O. F. (1942a) — "Sobre o tempo de ação do SH₂ no doseamento do ácido ascórbico. Conteúdo de ácido ascórbico no pimentão (*Capsicum annum*, L.) — Rev. Fac. Med. Vet. São Paulo, 2: 29, set. '42.
- ROSENBERG, H. R. (1942) — "Chemistry and physiology of the vitamins" — Interscience Publishers, Inc. New York, 1942.
- SHERMAN, H. C. e LANFORD, C. S. (1944) — "Essentials of nutrition" — The Mac Millan Co., New York, 1944, 2nd ed.
- TAUBER, H. e KLEINER, I. S. (1935) — "An enzymic method for the estimation of true vitamin C" — J. Biol. Chem. 110: 559, '35.
- WINTON, H. L. e WINTON, K. B. (1935) — "The structure and composition of foods" — John Wiley & Sons, Inc., New York, 1935.