

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SUCO DE MARACUJÁ EM PRODUTOS INDUSTRIALIZADOS*

Emiko Ikejiri INOMATA **
Myrna SABINO **
Waldomiro PREGNOLATTO **
Maria Sylvia CONCILLIO **

RIALA6/553

INOMATA, E.I.; SABINO, M.; PREGNOLATTO, W. & CONCILLIO, M.S. —
Determinação do teor de suco de maracujá em produtos industrializados.
Rev. Inst. Adolfo Lutz, 43(1/2):9-14, 1983.

RESUMO: Com a finalidade de controlar a qualidade, autenticidade e concentração de produtos de maracujá industrializados, foi desenvolvido um método químico baseado na extração dos aminoácidos livres, separação da D,L alanina, que é um componente constante e natural desta fruta, por cromatografia em papel circular, revelação com ninidrina e dosagem espectrofotométrica do derivado colorido. Foi determinado o conteúdo de D,L alanina em 25 amostras de sucos genuínos de maracujá de procedências diferentes, em épocas diferentes; o teor médio de D,L alanina encontrado foi de 27,0 mg/100 ml do suco. Em 32 sucos diferentes industrializados, o teor de D,L alanina livre encontrado variou de 4,5 a 30,0 mg por 100 ml. A sensibilidade do método permite a determinação do conteúdo de suco de maracujá nesses produtos até a concentração de 1,0% m/v. Foram também determinados outros componentes do maracujá.

DESCRITORES: maracujá (*Passiflora edulis*), suco; D, L alanina, determinação em suco de maracujá.

INTRODUÇÃO

É elevado o consumo de suco natural de maracujá, no Brasil, pelas suas qualidades nutritiva e refrescante.

A determinação do suco de maracujá que entra na composição dos produtos industrializados (refrescos, aperitivos, concentrados) constitui um sério problema para os laboratórios incumbidos de controlar a qualidade e autenticidade de tais produtos.

A literatura registra alguns trabalhos sobre métodos químicos para separação e dosagem dos aminoácidos em produtos naturais, através da cromatografia em coluna^{4, 5, 6, 10, 11}, em camada delgada^{3, 8, 12}, e em papel^{1, 2, 7}, mas não registra nenhum método confiável para

a determinação da concentração do suco deste fruto nos produtos industrializados.

Baseados em trabalhos como o de UNDERWOOD & ROCKLAND¹³, passamos a verificar quais os aminoácidos livres existentes no suco de maracujá, sua constância qualitativa e quantitativa, e variação em função da variedade e origem geográfica do fruto. As experiências preliminares nos indicaram ser a alanina um componente razoavelmente constante e específico no maracujá, daí ter sido escolhida para a finalidade proposta.

A separação da D, L alanina dos demais aminoácidos foi feita através da cromatografia circular em papel e quantificada por espectrofotometria, no visível, do composto resultante da reação com ninidrina. Paralelamente foi feita uma reavaliação dos diversos componentes do suco de maracujá⁹.

* Realizado na Seção de Química Biológica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Sucos de maracujá, preparados no laboratório do Instituto Adolfo Lutz, e sucos industrializados.

Equipamento

Espectrofotômetro Vis-uv.

Cuba para cromatografia em papel circular, de 40 x 40 cm

Papel Whatman n.º 1, 40 x 40 cm

Reagentes

Isopropanol a 10,0% em água

N-butanol p.a.

Ácido acético p.a.

D, L alanina p.a.

Ninidrina p.a.

Acetona p.a.

Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Solução padrão de D, L alanina p.a. —

Preparar uma solução estoque de 0,1 mg/ml em isopropanol a 10,0%, m/v, em água. Manter essa solução em refrigerador.

Solução de sulfato de cobre — Preparar uma solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, a 0,04%, m/v, em água.

Solvente para cromatografia

N-butanol ácido acético, água (4:1:1). Preparar imediatamente antes de usar.

Revelador

Solução de ninidrina a 0,04%, em m/v, em acetona p.a. Conservar em refrigerador.

Papel para cromatograma

Recortar a folha de papel Whatman n.º 1 no tamanho de 40 x 40 cm (desde que a cuba seja do tamanho recomendado), fazer um pequeno orifício no centro, onde deverá ser adaptado um pavio feito com tiras do mesmo papel. Num raio de 2 cm ao redor do centro, marcar os pontos de partida (até 6 no máximo) onde serão aplicadas as soluções das amostras e do padrão.

Amostra

a) Preparação

Triturar o maracujá, sem a casca, no liquidificador. Filtrar o suco em gase e conservá-lo no congelador. Transferir 10 ml do filtrado para frasco Erlenmeyer de 125 ml, adicionar 20 ml de isopropanol a 10%, v/v. Agitar durante 30 minutos e, em seguida, filtrar em papel de filtro.

b) Cromatografia

Aplicar no papel, através de micropipeta, de 40 a 60 μl da solução isopropanólica de maracujá e, num segundo ponto de partida, aplicar exatamente 20 μl da solução de D, L alanina padrão. Transferir o papel para a

cuba e desenvolver o cromatograma com o solvente, segundo a técnica, ficando o pavio imerso no solvente contido numa pequena cápsula, através da qual o solvente fluirá. O papel fica em posição horizontal. Quando o solvente atingir a distância de 18 cm, retirar o papel da caixa e secar em corrente de ar. Uma vez seco, revelar pulverizando com a solução de ninidrina e aquecer em estufa a 60°C, por 30 minutos. Aparecem zonas circulares de coloração azul-violeta, em diferentes Rf. Só será utilizado na técnica o conteúdo da zona que aparece a um Rf compreendido entre 0,5 e 0,6. (Recomenda-se cromatografar sempre junto com a amostra de suco a D, L alanina padrão, pois a saturação da cuba e a variação da temperatura ambiental influem no valor do Rf.

Confirmação da D, L, alanina: para confirmar que na zona compreendida entre Rf 0,5 e 0,6 continha D, L alanina, foi feita uma cromatografia em papel bidimensional, usando-se na segunda fase, como solvente, fenol-amônia (4:1). Este aminoácido foi identificado pela posição indicada pelo padrão no próprio cromatograma, e não pelo Rf como se faz usualmente.

c) Avaliação

Recortar a mancha de D, L alanina padrão e a correspondente à do maracujá do mesmo Rf, transferi-las para tubos de centrifuga e elui-las com 4 ml da solução eluente. Agitar e esperar 30 minutos. Centrifugar a 3.000 rpm, por 5 minutos. Ler a absorbância do sobrenadante a 520 nm no espectrofotômetro, usando como branco a solução eluente previamente tratada com pedaços de papel utilizado na cromatografia. Calcular o teor de D, L alanina no suco de maracujá natural através da fórmula:

$$\frac{f \times A_a}{A_p \times V} = \text{mg de D, L alanina por 100 ml de suco, nas condições propostas}$$

A_a = absorbância da amostra

A_p = absorbância do padrão

V = volume em ml da solução da amostra cromatografada

f = fator de diluição da amostra. O fator de diluição é a relação entre o volume final e volume inicial da amostra.

Para produtos industrializados, preparar diluições isopropanólicas apropriadas do produto e proceder como para o suco de maracujá natural, preparado no laboratório. Calcular a porcentagem de suco natural de maracujá no produto, usando a fórmula:

$$\frac{C \times 100}{27} = \text{porcentagem de suco natural de maracujá no produto}$$

C = quantidade de D, L alanina em mg por 100 ml calculada na fórmula anterior

27 = valor médio em mg por 100 ml de alanina no suco natural de maracujá

RESULTADOS

Usando-se a técnica descrita, avaliou-se inicialmente a quantidade de D, L alanina presente em sucos de maracujá preparados em laboratório. Os frutos eram quase sempre originários de diferentes áreas do Estado de São Paulo e de algumas áreas do norte do País mas, na maioria, foram obtidos em supermercados e feiras livres, em diferentes épocas, durante o período de um ano. Foram preparadas em laboratório, 25 amostras de sucos a partir de 25 diferentes amostras do fruto. Os valores do aminograma dos aminoácidos livres presentes no suco de maracujá estão relacionados na tabela 1. Na tabela 2 encontram-se os valores de alanina, com teor médio de 27 mg por 100 ml, sendo que o valor

máximo encontrado foi de 29 mg, e o mínimo, de 25,5 mg. Usaram-se para cada tomada da amostra 5 kg de maracujá.

Foram feitos também testes de recuperação da alanina, usando-se como suporte suco de maracujá comercial, contendo 15 mg do aminoácido por 100 ml, ao qual se adicionaram 10 mg de D, L alanina por 100 ml. Na tabela 3 encontram-se os resultados obtidos em 5 determinações, cuja média é de 99,0%.

Para testar a reprodutibilidade do método, foram preparadas 6 diluições aquosas diferentes, a partir de um suco testemunho de concentração conhecida, cujas concentrações foram determinadas seguindo-se rigorosamente a técnica descrita. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4.

TABELA 1

Aminograma: porcentagem do total de aminoácidos livres no suco de maracujá natural, preparado no laboratório

Rf	Aminoácidos	%
0,1-0,2	cistina	2,9
0,2-0,3	lisina, taurina, histidina, arginina, asparagina	2,9
0,3-0,4	glicina, ácido aspártico, serina	32,0
0,4-0,5	ácido glutâmico, treonina	30,4
0,5-0,6	alanina, prolina	23,0
0,6-0,7	tirosina, triptofano	3,3
0,7-0,8	fenilalanina, metionina, valina	3,0
0,8-0,9	leucina, isoleucina	2,5

TABELA 2

Teor de D, L alanina livre em sucos de maracujá natural, preparados no laboratório

Amostra n.º	Alanina livre mg/100 ml	N.º	Alanina livre mg/100 ml	N.º	Alanina livre mg/100 ml
1	27,0	10	28,2	18	27,0
2	28,0	11	26,5	19	27,0
3	28,8	12	26,5	20	25,5
4	29,0	13	27,2	21	28,5
5	25,5	14	26,0	22	27,0
6	27,0	15	27,0	23	26,0
7	26,0	16	26,2	24	25,5
8	28,5	17	26,0	25	26,8
9	28,0				

* Teor médio — 27,0 mg/100 ml.

TABELA 3

Recuperação de D, L alanina adicionada a suco de maracujá

Amostra n.º	Porcentagem de alanina recuperada
1	101,0
2	98,5
3	98,0
4	98,0
5	99,5
Média	99,0

TABELA 4
Reprodutibilidade do método

Amostra n.º	Diluição do suco testemunho	Valores encontrados
	v/v %	v/v %
1	2,0	1,9
2	5,0	4,8
3	10,0	9,6
4	15,0	15,0
5	25,0	25,2
6	50,0	48,0

Usando-se a técnica atrás descrita foram colhidas para análise fiscal 32 amostras de suco de maracujá integral exposto ao consumo em cinco supermercados distintos, pertencentes a sete produtores diferentes, sendo que o produto F foi encontrado somente em quatro supermercados e o G, somente em três. Todos os produtos foram analisados pelo método descrito e os resultados encontram-se na tabela 5, onde se relacionou o teor de D, L alanina encontrado — concentração do suco. Das 32 amostras analisadas, somente 8 correspondiam, de fato, a suco de maracujá integral.

Para nos certificarmos de que o método pode ser aplicado com relativa segurança em análises ditas de fiscalização, verificou-se a estabilidade da D, L alanina no suco mantido em condições ambientais, durante 3 meses, com determinação do seu teor de 15 em 15 dias, mas a variação dos resultados obtidos após esse tempo não foi significativa.

Aproveitando o material disponível, procedemos a uma análise bromatológica dos sucos, com pesquisa e determinações de alguns componentes como Ca, P etc. Os resultados encontram-se na tabela 6.

TABELA 5
Teor de D, L alanina livre e porcentagem do suco de maracujá natural nos produtos industrializados

Amostra n.º	Marca do produto	d,l alanina livre mg/100 ml suco	Porcentagem de suco natural
1	A	4,5	16,66
2	A	5,5	20,37
3	A	6,0	22,22
4	A	7,5	27,77
5	A	8,0	29,63
6	B	27,0	100,00
7	B	30,0	111,11
8	B	25,0	92,59
9	B	26,0	92,29
10	B	28,0	103,70
11	C	18,0	66,66
12	C	15,0	55,55
13	C	14,0	51,85
14	C	16,0	59,26
15	C	17,5	64,81
16	D	7,5	27,77
17	D	8,0	29,63
18	D	8,5	31,48
19	D	8,0	29,63
20	D	7,0	25,92
21	E	19,0	70,37
22	E	20,0	74,07
23	E	20,5	75,92
24	E	21,0	77,77
25	E	22,0	81,48
26	F	20,5	75,92
27	F	20,0	74,07
28	F	19,0	70,37
29	F	18,5	68,52
30	G	27,5	101,85
31	G	26,0	96,29
32	G	25,0	92,59

TABELA 6

Composição percentual e determinações diversas no suco de maracujá natural

Determinações	Porcentagem (%)
Perda por aquecimento a 105°C m/v	86,73
Glicídios redutores, em glicose m/v	3,00
Glicídios não redutores em sacarose m/v	1,44
Acidez em solução normal v/v	15,15
Cinzas, m/v	1,18
Lipídios (substâncias solúveis em éter) m/v	0,36
Protídios m/v	1,43
Vitaminas C m/v	0,026
Cálcio (em Ca) p/p	0,18
Fosfato (em P) p/p	0,025
Colina	não encontrada
Betaina	não encontrada

CONCLUSÃO

Em função dos valores máximos e mínimos de D, L alanina encontrados, produtos comerciais, apresentando concentrações entre 94,00 e 107,00% de suco, devem ser considerados como genuínos.

A sensibilidade do método permite a determinação do conteúdo do suco de maracujá em

produtos industrializados na concentração de até 1,0% de suco.

O método apresentado é simples, reproduzível e realizável em laboratórios modestos, e constitui uma ferramenta útil em busca de fraude em produtos de maracujá. Recomenda-se, todavia, um estudo experimental colaborativo para a efetivação do processo.

RIALA6/552

INOMATA, E.I.; SABINO, M.; PREGNOLATTO, W. & CONCILLIO, M.S. — Chemical determination of passion-fruit juice of industrial products. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 43(1/2):9-14, 1983.

ABSTRACT: Free alanine, a stable natural component of passion-fruit was separated from the aminoacids which were previously extracted from the passion-fruit juice. Circular filter paper chromatography and spectrophotometric determination of the violet derivate of D, L alanine obtained with nuhydrin were determined. A mean content of 27.0 mg per 100 ml of juice was obtained in 25 samples of passion-fruit juice prepared in the laboratory. Values ranging from 4.5 to 30.0 mg per 100 ml were found in 32 samples of industrial juice. The sensitivity of the method allows detection of free alanine in passion-fruit juices diluted 100 times.

DESCRITORES: purple granadilla (*Passiflora edulis*), juice; D, L alanine in purple granadilla, determination; passion-fruit.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CURZON, G. & GILTROW, J. — A chromatographic colour reagent for a group of amino acids. *Nature (Lond.)*, 172:356-7, 1953.
2. DENT, C.E. — A study of behaviour of some sixty amino acids and other ninhydrin reacting substances on phenol-collidine. Filter paper chromatograms with notes as to the occurrence some of them in biological fluids. *Biol. J.*, 43:169-80, 1948.

3. MARTIN, A.J.P. & SYNGE, R.L.M. — A new form chromatogram employing two liquid phases. 1. A theory of chromatography. 2 Application to the micro-determination of the higher mono-amino-acids in protein. *Biochem. J.*, 35: 1358-68, 1941.
4. MAYER, S.W. & TOMPKINS, E.R. — Ion exchange as a separations method. IV. A theoretical analysis of the column separations process. *J. Am. Chem. Soc.*, 69:2866-74, 1947.
5. MOORE, S. & STEIN, W.H. — Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J. biol. Chem.*, 192: 663-81, 1951.
6. MOORE, S. & STEIN, W.H. — Chromatography of amino acids on starch columns. Solvent mixtures for the fractionation of protein hydrolysates. *J. biol. Chem.*, 178:53-77, 1949.
7. MOORE, S. & STEIN, W.H. — Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. biol. Chem.*, 176:367-88, 1948.
8. SANGER, F. — The free amino groups of insulin. *Biochem. J.*, 39:507-15, 1945.
9. SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz — *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. v. 1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2.^a ed. São Paulo, 1976. p. 140-42.
10. SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. & MOORE, S. — Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, 30:1190-206, 1958.
11. STEIN, W.H. & MOORE, S. — Chromatography of amino acids on starch columns. Separation of phenylalanine, leucine, isoleucine, methionine, tyrosine and valine. *J. biol. Chem.*, 176:337-65, 1948.
12. TRISTRAM, G.R. — Observations upon the application of partition chromatography to the determination of the monoamino-acids in proteins. *Biochem. J.*, 40:721-33, 1946.
13. UNDERWOOD, J.C. & ROCKLAND, L.B. — Nitrogenous constituents in citrus fruits. 1. Some free amino acids citrus juices determined by small-scale filter-paper chromatography. *Food Res.*, 18:17-29, 1953.

Recebida para publicação em 29 de setembro de 1982.