

# SEPARAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DO SUCO DE LARANJA POR MEIO DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Yuriko Marina SOBU\*  
Hideko YAMANAKA\*  
José ZUANON NETTO\*

■ **RESUMO:** Foi investigada a separação de ácido málico, cítrico e tartárico, via cromatografia em camada delgada. Para amostra de suco de laranja, os ácidos devem ser previamente precipitados na forma de sais de chumbo e então dissolvidos em solução  $\text{HNO}_3$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . O melhor sistema foi definido como celulose-éter/ácido fórmico/ $\text{H}_2\text{O}$  (80:16:12). Os bons resultados obtidos indicam a possibilidade de determinação quantitativa desses ácidos no suco de laranja.

■ **PALAVRAS-CHAVE:** Ácidos orgânicos; cromatografia em camada delgada; suco de laranja.

## Introdução

A concentração de ácido málico tem sua importância na autenticidade de suco de morango,<sup>13</sup> maçã,<sup>5</sup> laranja,<sup>14,18</sup> sendo também importante parâmetro a ser monitorado na matéria-prima para obtenção de vinho de boa qualidade.<sup>3</sup>

De acordo com a literatura, o ácido málico tem sido analisado através da polarimetria,<sup>8,19</sup> cromatografia em papel,<sup>6</sup> cromatografia líquida de alta eficiência,<sup>2</sup> potenciometria<sup>7</sup> e método enzimático associado com espectrofotometria<sup>1</sup> e fluorimetria.<sup>12</sup> Em análise rotineira, as indústrias cítricas empregam kits contendo enzima malato-desidrogenase na forma solúvel.

Em se tratando da determinação dos ácidos orgânicos contidos em frutos cítricos, o método proposto pela AOAC<sup>19</sup> é muito trabalhoso. Estudos preliminares indicaram a possibilidade de separação e identificação do ácido málico em mistura contendo ácido cítrico e tartárico, empregando a cromatografia em camada delgada.

\* Departamento de Química Analítica - Instituto de Química - UNESP - 14800-900 - Araraquara - SP - Brasil.

Este tipo de cromatografia passou a ser amplamente aplicado, após publicação em 1960 do trabalho pioneiro de Seiler & Seiler,<sup>15</sup> à análise tanto de substâncias inorgânicas para separação de cátions<sup>9,10,21</sup> e de ânions<sup>16,22</sup> como de substâncias orgânicas das mais variadas funções químicas,<sup>12</sup> como ácidos carboxílicos, açúcares, vitaminas, álcoois, alcalóides, corantes, aminoácidos etc.

Nesse trabalho, propõe-se desenvolver metodologia analítica para separação dos ácidos málico, cítrico e tartárico no suco de laranja.

## Material e métodos

### Materiais

Suco de laranja natural e obtido no mercado, das marcas: Daily, Santal (Parmalat) e Só-suco (A. M. Francisco Jr. ME); ácido málico - Riedel-de haenag, Hannover, Alemanha; ácido cítrico (sal trissódico diidratado), ácido tartárico e xilose - Sigma Chemical Co, St Louis, USA; metanol, sílica gel G, celulose microcristalina e clorofórmio - Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro (RJ); éter etílico - Grupo Química Industrial Ltda, Penha (RJ); ácido fórmico - reembalado pela Carlo Erba do Brasil S.A., São Paulo (SP); butanol, acetato de sódio anidro, acetato de chumbo triidratado - Reagen, Quimibrás Indústrias Químicas S.A., Rio de Janeiro (RJ); hidróxido de amônio - Labsynth, Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema (SP).

Conjunto espalhador regulável 0-2 mm, cuba de vidro de 22 x 22 x 10 cm (Desaga), placas de vidro de 20 x 20 cm, capilares, soluções aquosas de ácido málico (0,0250 g/10 mL), ácido cítrico (0,0800 g/10 mL) e ácido tartárico (0,0800 g/10 mL), soluções aquosas da mistura dos 3 ácidos; fase estacionária: sílica gel G e celulose microcristalina; fase móvel 1: benzeno/metanol/ácido acético (90:16:16), fase móvel 2: butanol/ clorofórmio(70:30), fase móvel 3: etanol/ hidróxido de amônio/ H<sub>2</sub>O (100:16:12), fase móvel 4: etanol/hidróxido de amônio/H<sub>2</sub>O (100:2:12), fase móvel 5: éter etílico/ácido fórmico/H<sub>2</sub>O (80:16:12); nebulizadores e reagentes de detecção: 0,2 g xilose dissolvida em 0,6 mL de água e homogeneizada com 11,3 mL de metanol, 0,2 mL de anilina e 7,9 mL de acetona (xii.) e 0,3 g de verde de bromocresol dissolvido em 100 mL da mistura H<sub>2</sub>O:metanol (1:4) contendo 8 gotas de solução NaOH 30% (brom.)

### Métodos

O preparo da amostra de suco de laranja para separação cromatográfica consiste na separação das pectinas, precipitação dos ácidos málico, cítrico e tartárico na forma de sais de chumbo<sup>20</sup> e posterior solubilização em água adicionando pequenos incrementos de solução HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> até dissolução total.

Para separação cromatográfica empregou-se o desenvolvimento ascendente simples, em cromatoplaças de 250 micra de espessura de sílica gel G (30 g/60 mL água) e de celulose microcristalina (25 g/90 mL água). As referidas cromatoplaças, uma vez preparadas, foram secas ao ar durante aproximadamente três horas e ativadas a 105°C durante 30 e 10 minutos, respectivamente, aplicando-se então cerca de 10 µL das soluções padrões individuais, da mistura de padrões e da amostra de suco de laranja. Para aplicação de grande volume de amostra, foi empregada pipeta de 0,20 mL em um sistema desenvolvido por Cazetta.<sup>4</sup>

## Resultados e discussão

As soluções padrões de ácido málico, cítrico e tartárico foram preparadas em concentrações correspondentes àsquelas presentes no suco de laranja.<sup>17</sup>

As cromatoplaças foram desenvolvidas (10 cm) à temperatura de 25°C ± 1, com saturação da cuba. Após a nebulização, no caso da xilose (xli.), as cromatoplaças foram aquecidas em estufa a 105°C por 5 minutos. As manchas correspondentes a cada ácido são de coloração amarela e marrom com verde de bromocresol (brom.) e xli., respectivamente.

Constam da Tabela 1 os resultados obtidos empregando-se a sílica gel G, as fases móveis 1 a 5 e os reveladores xli. e brom.

Tabela 1 - Valores de R<sub>f</sub> das soluções padrões de ácido málico, cítrico e tartárico

| Fase móvel | 1     | 2     | 3     | 4    | 5     |
|------------|-------|-------|-------|------|-------|
| Revelador  | brom. | brom. | brom. | xli. | brom. |
| málico     | n.i.  | n.i.  | 0,29  | n.i. | n.i.  |
| cítrico    | n.i.  | n.i.  | n.i.  | n.i. | 0,71  |
| tartárico  | n.i.  | 0,06  | n.i.  | n.i. | 0,54  |
|            |       |       |       | xli. | 0,77  |

Fase estacionária: sílica gel G.  
Fase móvel 1. Benzeno/metanol/ácido acético (90:16:16); 2. Butanol/clorofórmio (70:30); 3. Etanol/hidróxido de amônio/H<sub>2</sub>O (100:16:12); 4. Etanol/hidróxido de amônio/H<sub>2</sub>O (100:2:12); 5. Éter/ácido fórmico/H<sub>2</sub>O (80:16:12).

Reveladores: xilose (xli.), verde bromocresol (brom.).

Das fases móveis estudadas, somente a fase 5 apresenta separação dos três ácidos, porém com valores de R<sub>f</sub> próximos, no caso do málico e do cítrico. Em razão disso, empregou-se a fase móvel 5 com a substituição da fase estacionária sílica gel G por celulose microcristalina. Nesse caso, apenas xilose como revelador apresentou bons resultados. Verifica-se, através da Tabela 2, que esta mudança no sistema

cromatográfico melhora significativamente a separação dos três ácidos. Na Tabela 2 encontram-se os valores de  $R_f$  das soluções padrões, da mistura das soluções padrões e do suco de laranja. Verifica-se que ocorre boa separação da solução contendo a mistura de ácidos. A mistura das soluções padrões foi submetida ao mesmo tratamento empregado na amostra do suco de laranja. Ajustando-se o pH da solução obtida pela dissolução dos sais de chumbo, no intervalo de 1 a 12, obteve-se boa separação cromatográfica, independente do valor de pH; já no caso de amostra de suco de laranja, melhores resultados são obtidos a um pH em torno de 3. Nas amostras de suco de laranja analisadas não foi possível a revelação do ácido tartárico, o que, entretanto, ocorreu quando da adição prévia ao suco do ácido em questão.

Tabela 2 - Valores de  $R_f$  das soluções padrões, mistura de padrões e amostra de suco de laranja

| Substância      | $R_f$             |
|-----------------|-------------------|
| Ácido málico    | 0,55              |
| Ácido cítrico   | 0,43              |
| Ácido tartárico | 0,33              |
| Mist. padrões   | 0,32; 0,44 e 0,55 |
| Suco laranja    | 0,44 e 0,55       |
| Suco laranja*   | 0,32; 0,44 e 0,55 |

Fase estacionária: celulose microcristalina; Fase móvel: éter/ácido fórmico/H<sub>2</sub>O (80:16:12); Revelador: xilose.  
\* Amostra na qual foi adicionado ácido tartárico.

Empregando-se esse sistema cromatográfico, os limites de detecção para os ácidos málico, cítrico e tartárico são 0,00874, 0,0128 e 0,0250 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

## Conclusão

A separação das pectinas do suco de laranja não é suficiente para separação cromatográfica dos ácidos orgânicos, havendo necessidade da separação prévia, através de sua precipitação com acetato de chumbo.

As experiências com os dois adsorventes e as diferentes fases móveis indicaram como melhor sistema cromatográfico o constituído por celulose - éter/ácido fórmico/H<sub>2</sub>O (80:16:12).

Estudos da solubilidade dos sais de chumbo dos ácidos orgânicos indicaram que o malato é mais solúvel do que o tartarato e o citrato; os três sais são solúveis em solução de HNO<sub>3</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>.

O ácido tartárico não foi detectado nas amostras naturais de suco, fato que ocorreu quando a essas amostras adicionou-se o referido ácido.

A separação cromatográfica dos ácidos málico e cítrico no suco de laranja depende do pH, tanto que não ocorre em pH 1, mas sim no valor 3. Em se tratando da mistura das soluções padrões dos três ácidos, independentemente do valor de pH (intervalo 1 a 12), ocorreu a separação.

Os bons resultados cromatográficos obtidos através da aplicação de grandes volumes da amostra indicaram a viabilidade de desenvolver metodologia para separação e posterior determinação quantitativa dos ácidos málico e cítrico em suco de laranja.

SOBU, Y. M., YAMANAKA, H., ZUANON NETTO, J. Separation of organic acids from orange juice by TLC. *Ecl. Quím.* (São Paulo), v.20, p.95-100, 1995.

■ **ABSTRACT:** The separation and identification of malic, citric and tartaric acids have been investigated by TLC. In orange juice sample the method requires previous precipitation as lead salts and dissolution in 0.5 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. The optimal chromatographic system was defined as cellulose - ether/formic acid/H<sub>2</sub>O (80:16:12). The successful results suggest the possibility of quantitative determination of these acids in orange juice sample.

■ **KEYWORDS:** Organic acid; TLC; orange juice.

## Referências bibliográficas

- 1 ALMERIABED, A. M., TOWNSHEND, A. *Anal. Chim. Acta*, v.221, p.337, 1989.
- 2 CACCAMO, F. et al. *J. Chromatog.*, v.362, p.47, 1986.
- 3 CARRAU, J. L. *Ciência Hoje*, v.2, p.65, 1984.
- 4 CAZETTA, J. O. Metodologia para determinação quali-quantitativa de cátions inorg. em amostras veg. por cromatog. planar e espectrofotometria. Araraquara, 1992. 61p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.
- 5 EVANS, R. H., VAN SOESTBERGEN, A. W., RISTOW, K. A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v.66, n.6, p.1517, 1983.
- 6 FITELSON, J. *J. Off. Anal. Chem.*, v.52, p.646, 1969.
- 7 GODINHO, O. E. S. et al. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v.71, p.1028, 1988.
- 8 HARTMANN, B. G., HILLIG, F. *Assoc. Off. Agric. Chem.*, v.16, p.277, 1933.
- 9 MOHMMAD, A. et al. *J. Chromatogr.*, v.642, p.445, 1993.
- 10 OGUMA, K. *J. Chromatogr.*, v.42, p.96, 1969.
- 11 PUCHADES, R. et al. *Food Chem.*, v.42, p.167, 1991.
- 12 RANDEATH, K. *Cromatografia de capa fina*. Bilbao: Urmo, 1974.
- 13 REYES, F. G. R., WROLSTAD, R. E., CORNWELL, C. J. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v.65, p.126, 1982.
- 14 ROBARDS, K., ANTOLOVICH, M. *Analyst*, v.120, p.1, 1995.

- 15 SEILER, H., SEILER, M. *Helv. Chim. Acta*, v.43, p.1939, 1960.
- 16 SEILER, H., KAFFENBERGER, T. *Helv. Chim. Acta*, v.44, p.1282, 1961.
- 17 SINCLAIR, W. B. *The Biochemistry and Physiology of The Lemon and Other Citrus Fruits. The Reagents of the University of California*. Oakland: Division of Agriculture and Natural Resources, 1984, p.114.
- 18 TING, S. V., ROUSEFF, R. L. *Citrus fruits and their products*. New York: Marcel Dekker, 1986, p.197.
- 19 WILLIAMS, S. (Ed.) *Official Methods of Analysis*. 14. ed. Arlington-Virginia, 1984, p.422.
- 20 ———. *Official methods of Analysis*. 14. ed. Arlington-Virginia, 1984, p.423.
- 21 ZUANON NETTO, J. J. *Ecl. Quim.*, v.16, p.9, 1991
- 22 ZUANON NETTO, J., LONGO, A., HANAI, L. W. *An. Farm. Quim.*, v.18, p.103, 1978.

Recebido em 21.2.1995  
Aceito em 30.3.1995