

# ÁGUA DE COCO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E PELO MÉTODO TITULOMÉTRICO<sup>1</sup>

Edna Mendes Aroucha<sup>2</sup>  
Romeu Vianni<sup>3</sup>

## RESUMO

No presente trabalho comparam-se dois métodos de quantificação de ácido ascórbico, a cromatografia líquida e a titulometria, na água de coco (endosperma líquido), em cinco estádios (4°, 6°, 8°, 10° e 12° mês) de maturação dos cocos Anão Verde e Anão Vermelho. A determinação titulométrica foi realizada conforme o método 43.064 descrito pela AOAC (1), e a metodologia de cromatografia líquida de alta precisão (HPLC), segundo Bradbury e Singh (7). Os valores encontrados, nos devidos estádios de maturação, em ambos os cultivares, variaram de 0,72 mg AA/100 mL a 2,39 mg AA/100 mL, por titulometria, e de 0,95 mg AA/100mL a 3,15 mg AA/100mL pela HPLC. Esses resultados confirmam que a água de coco não é uma fonte expressiva de ácido ascórbico. Os valores deste ácido determinados pela HPLC apresentaram-se superiores aos do método titulométrico, sendo significativa a diferença entre eles. Dessa forma, constata-se que a quantificação de ácido ascórbico por cromatografia líquida, além de mais prática, demonstra também maior sensibilidade na detecção.

Palavras-chaves: *Cocos nucifera*, HPLC, estágio de maturação, vitamina C.

---

<sup>1</sup> Parte da tese de mestrado apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Viçosa. Aceito para publicação em 15.02.2002.

<sup>2</sup> Laboratório de Fitotecnia – CCTA (P-4), Universidade Estadual do Norte Fluminense. Rua Alberto Lamago, 2000, Horto. 28015-620 Campos dos Goytacazes, RJ. E-mail: aroucha@uenf.br

<sup>3</sup> Laboratório de Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual do Norte Fluminense.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF ASCORBIC ACID IN THE COCONUT WATER BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND TITULOMETRY METHOD

The objective of this work was to analyze the content of ascorbic acid by two different methods. The samples used for this study were coconut water from Anão Verde and Anão Vermelho cultivars at the 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> month after pollination. The methods used were the titulometric one, described in AOAC (1), and by HPLC methodology described by Bradbury and Singh (7). The results obtained varied from 0.72 mg AA/100 ml to 2.39 mg by titulometry. The values of ascorbic acid determined by HPLC varied from 0.95 mg AA/100 ml to 3.15 mg, in both varieties. These values confirm that the water coconut is not a good source of ascorbic acid. The values of ascorbic acid determined by HPLC methodology were greater than those obtained with titulometric method, presenting a significant difference between the two methods. The results allowed to conclude that quantifying ascorbic acid by HPLC methodology is more practical, showing a more sensitive detection.

Key words: *Cocos nucifera*, HPLC, maturation, vitamin C.

## INTRODUÇÃO

A água de coco é uma bebida muito apreciada pelos consumidores brasileiros, principalmente os que habitam a região litorânea. Sob o aspecto sensorial, possui sabor suave, levemente adocicado e, quando gelada, proporciona sensação refrescante. Os constituintes nutricionais presentes em quantidades maiores são os açúcares redutores (glicose e frutose), não-redutor (sacarose) e minerais. Em quantidades menores estão as vitaminas hidrossolúveis, como ácido nicotínico, biotina, riboflavina, ácido fólico e ácido ascórbico (AA) ou vitamina C. Comparada a outros frutos, a água de coco não é uma fonte expressiva de vitamina C (11, 12). Segundo Child (8) e Birosel et al. (6), a concentração de ácido ascórbico na água de coco é pequena; em geral, sua concentração oscila entre 0,4 e 3,7 mg/100 mL.

O CTAA/EMBRAPA (11) analisou os teores de vitamina C na água-de-coco de casca amarela, comercializada nas praias do Rio de Janeiro, utilizando o método titulométrico, ao longo do desenvolvimento do fruto, e obteve os seguintes resultados: no 8<sup>o</sup> mês: 1,2 mg/100 g; 9<sup>o</sup> mês: 1,33 mg/100 g; e 10<sup>o</sup> mês: 1,74 mg/100 g. No suco de mamão (*Carica papaya* L. cv. Improved Sunrise Solo Line 72/12), utilizando o mesmo método, em três períodos pós-colheita (3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dias), os teores de ácido ascórbico variaram de 70 a 110 mg/100 mL de suco (18).

Carriedo et al. (9) utilizaram a HPLC (cromatografia líquida de alta precisão) para quantificar ácidos orgânicos e encontraram no mamão

teores de ácido dehidroascórbico e ácido ascórbico de 2,6 e 62,3 mg/100 g, respectivamente. A HPLC é método grandemente utilizado, na determinação de ácido ascórbico em diversos vegetais e sucos de frutas como abacate, laranja, kiwi, manga, lichia, abacaxi e papaya (13, 19, 21, 22).

O ácido ascórbico presente em vários tipos de tecidos de origem vegetal se caracteriza pelo caráter antioxidante e por ser um catalisador de reações bioquímicas que envolvem hidroxilação. Smirnoff (20) demonstrou a rota de formação do ácido ascórbico, a partir da glicose (D-glicose  $\rightarrow$  ác. D-glucorônico  $\xrightarrow{\text{NADPH}}$  ác. gulônico  $\xrightarrow{\text{H}_2\text{O}}$  L-gulanolactona  $\xrightarrow{\text{L-gulano oxidase}}$  2-ceto L-gulanolactona  $\rightarrow$  ácido ascórbico).

A determinação de ácido ascórbico em vegetais é muito importante, pois além de seu papel fundamental na nutrição humana (17), sua degradação pode favorecer o escurecimento não-enzimático (2) e causar sabor estranho (5). Além disso, o ácido ascórbico é um importante indicador, pois sendo a vitamina mais termolábil, sua presença no alimento indica que provavelmente os demais nutrientes também estão sendo preservados (4).

As características físicas como cor, forma e espessura do fruto mudam de acordo com o cultivar. O desenvolvimento do fruto, após a flor ter sido fecundada, tem um período de 11 a 13 meses, quando ele atinge o estágio de completa maturação. Seu desenvolvimento completo depende, fundamentalmente, das condições climáticas (10).

Em aproximadamente sete meses e meio, o endosperma sólido começa a se desenvolver por todo o interior do fruto, tomando-se mais consistente a partir do 10º mês (16).

Segundo Barwick (3), um efeito na variação sobre a quantificação da análise por cromatografia líquida dependerá do método de calibração (pressão, temperatura, comprimento de onda, proporção de solvente e fluxo) e se o efeito é de similar magnitude tanto para a amostra quanto para o padrão.

As determinações de vitamina C por métodos químicos são fundamentadas nos princípios da oxirredução, uma vez que o ácido ascórbico é uma substância que apresenta caráter redutor. Os métodos com base nesse princípio apresentam as vantagens de ser relativamente rápidos, práticos e de baixo custo, porque não exigem reagentes, vidrarias e equipamentos sofisticados. No entanto, apresentam como principal limitação o fato de não serem precisos, devido principalmente à presença, nas amostras, de outras substâncias de caráter redutor que interferem na sua determinação (14).

O objetivo do presente estudo foi analisar o teor de ácido ascórbico na água de coco, pelo método oficial da A.O.A.C (1) e pela cromatografia

líquida, uma vez que esta técnica de determinação vem sendo cada vez mais utilizada na análise quantitativa da vitamina C.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos utilizados neste trabalho foram provenientes de dois cultivares de coqueiro, Anão Verde e Anão Vermelho, com sete anos, pertencentes à coleção do campo experimental da PESAGRO-RJ, no município de Campos dos Goytacazes-RJ.

Os frutos foram colhidos em cinco estádios de maturação, no 4º, 6º, 8º, 10º e 12º mês, em 17 de maio, 1º de junho, 6 de julho, 19 de julho e 12 de agosto de 1999, respectivamente. A identificação de cada estágio de desenvolvimento do fruto para a coleta foi feita baseada na afirmativa de Frémond et al. (15), a qual estabeleceu que o coqueiro produz um cacho por mês. Sendo assim, os frutos foram obtidos após identificação da idade de cada cacho. O estágio 1 consistiu do cacho emitido mais recentemente e, de forma descendente, conferiram-se os demais estádios (mais elevados).

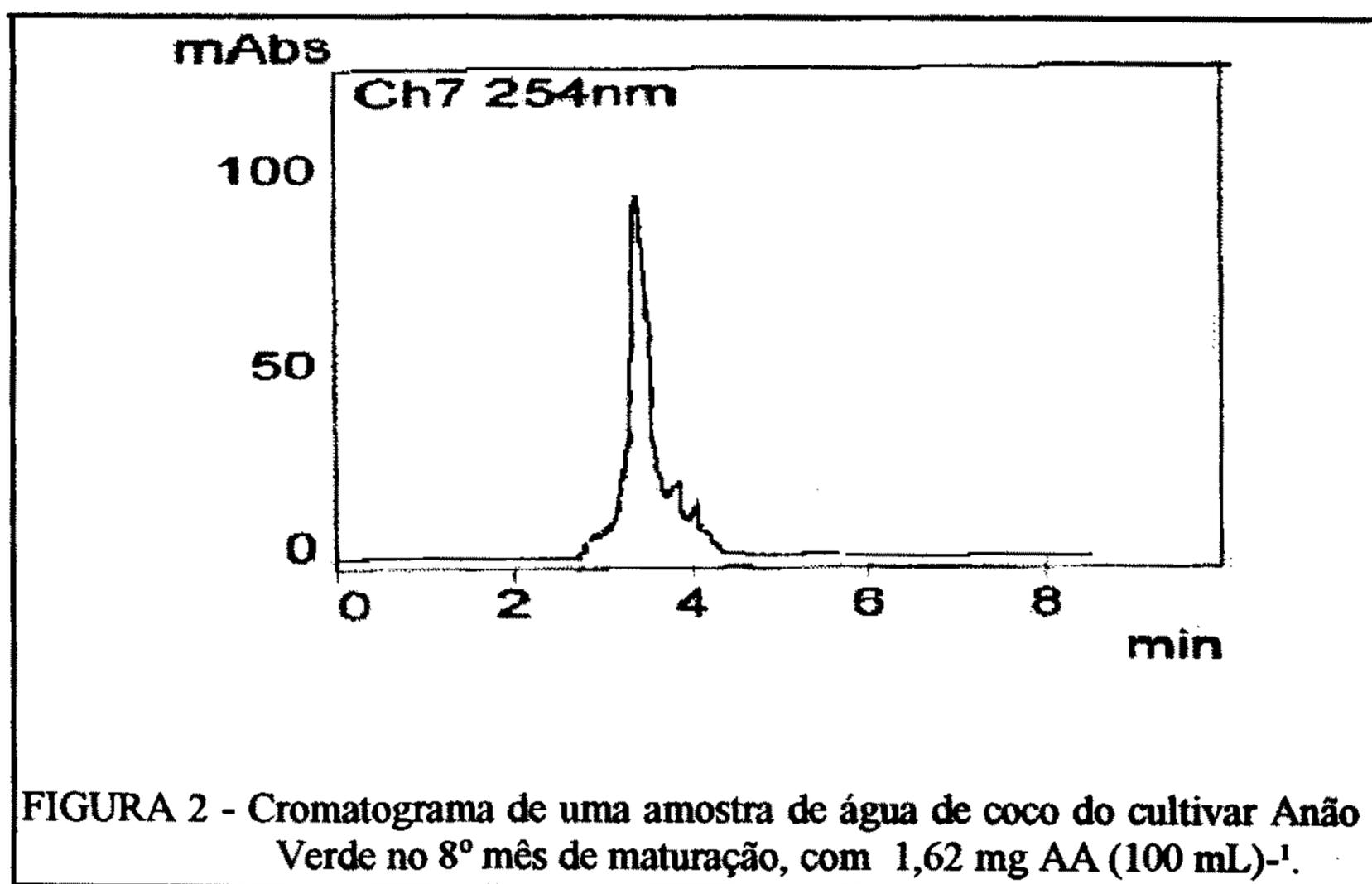
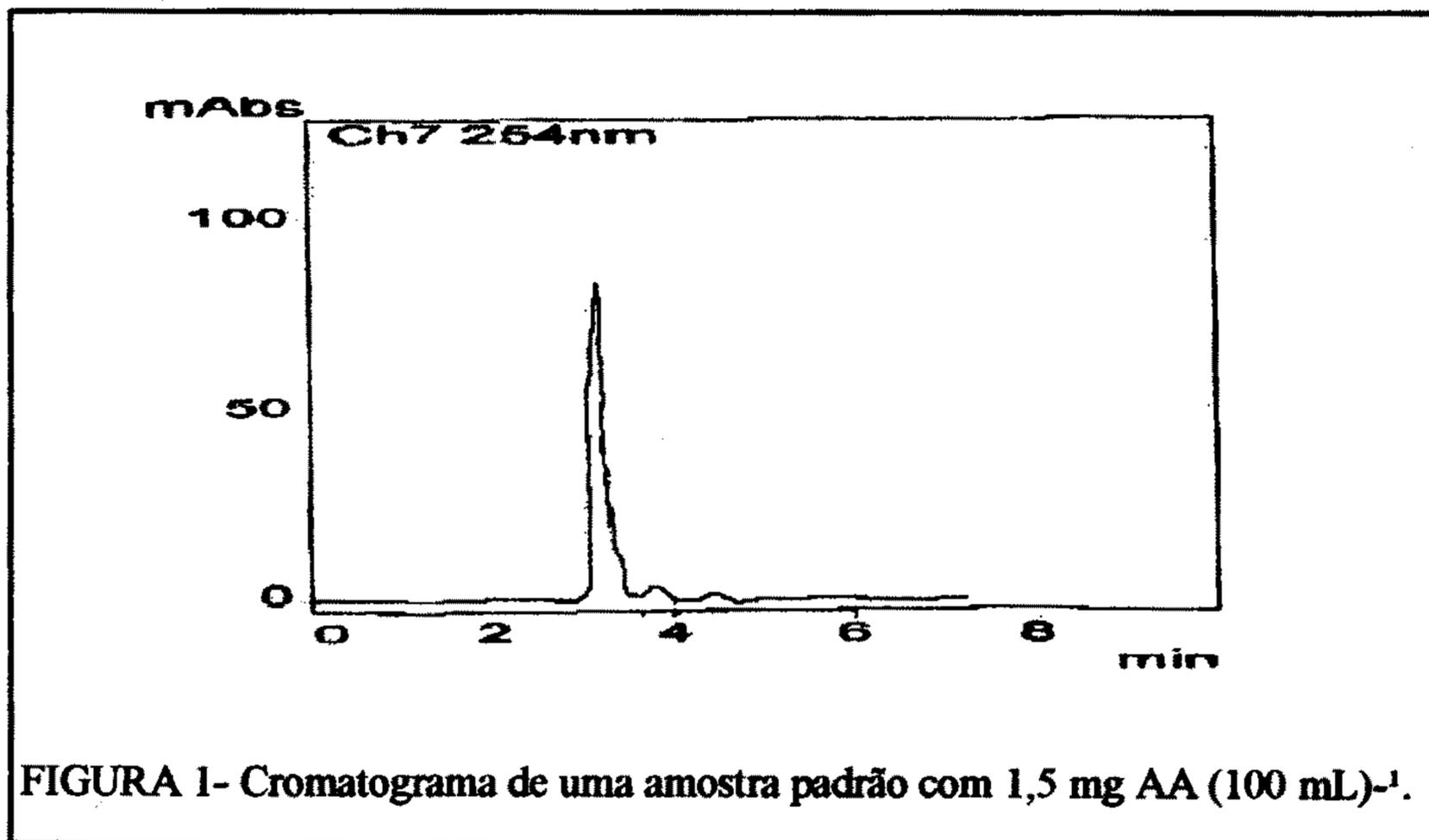
Foram sorteadas cinco plantas em cada cultivar, sendo coletado um fruto por planta, num total de cinco plantas/cultivar/estádio de maturação. Em cada colheita, novas plantas eram sorteadas.

A determinação titulométrica foi realizada de acordo com o método 43.064 descrito pela AOAC (1), cujo princípio é fundamentado em reações de oxirredução, que utiliza o 2,6-diclorofenolindofenol como agente oxidante. O preparo da amostra consistiu na adição de uma solução de ácido oxálico a 2% para atuar como estabilizante do ácido ascórbico.

Na determinação por HPLC utilizou-se o cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo M10A, equipado com detector Diode Array, duas bombas modelo LC-10AD e coluna C18 de partícula 5 µm, com 150 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro, operando com fluxo de 0,8 mL/min, em comprimento de onda de 254 nm. A fase móvel constituiu-se de metanol (grau HPLC) e solução de fosfato diácido de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a 0,005M com pH ajustado para 4,4, na proporção 40:60.

O preparo da amostra consistiu em ajustar o pH para 4,4, com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e filtragem com membrana Minisart. O volume injetado foi de 20 µL. As amostras foram corridas em triplicatas, e a identificação do ácido ascórbico foi feita por comparação com o tempo de retenção do padrão preparado (Figura 1) (utilizaram-se diferentes concentrações de ácido ascórbico: 0,5 mg a 4,0 mg /100 mg de água destilada), submetido às mesmas condições de injeção. Os cálculos foram efetuados por meio de equação ( $y = -27476 + 899733x$ ;  $r^2 = 99,7\%$ ), correlacionando a área do

pico (Figura 2) e a concentração de ácido ascórbico, seguindo a adaptação do método descrito por Bradbury e Singh (7).



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores obtidos, em ambos os métodos, variaram de 0,72 a 3,15 mg de ácido ascórbico/100 ml de água (Quadro 1). Esses valores estão próximos aos obtidos por titulometria, segundo Birosel et al. (6),

confirmando que a água de coco apresenta um valor relativamente baixo de vitamina C, em relação a outras frutas: mamão, manga, abacaxi e laranja (13, 19, 21, 22). Todavia, observou-se que em ambos os métodos houve acréscimo na taxa de vitamina C, com o desenvolvimento do frutos. Porém, os valores de ácido ascórbico determinados pela técnica de HPLC foram superiores aos apresentados pelo método titulométrico, sendo significativa a diferença entre os dois métodos ( $P < 0,05$ ) (Quadro 1 e Figura 2). O método titulométrico alcançou a média de  $1,435 \text{ mg (100 mL)}^{-1}$  e a cromatografia líquida a média de  $1,978 \text{ mg (100 mL)}^{-1}$ . Isso indica que a técnica de cromatografia líquida utilizada nesta determinação é mais sensível do que o método titulométrico em relação à quantificação de vitamina C na água de coco.

**QUADRO 1** - Médias de ácido ascórbico ( $\text{mg. 100 mL}^{-1}$ ) dos frutos dos cultivares Anão Verde e Anão Vermelho, pelo método titulométrico e pela HPLC em função do estágio de maturação (IC,  $\alpha = 0,05$ ;  $n=5$ ).

Estádio de maturação	Anão Verde		Anão Vermelho	
	1	2	1	2
4°	$0,72 \pm 0,17$	$0,95 \pm 0,22$	$0,82 \pm 0,27$	$1,03 \pm 0,26$
6°	$1,48 \pm 0,24$	$1,87 \pm 0,39$	$2,39 \pm 0,67$	$2,00 \pm 0,54$
8°	$1,42 \pm 0,16$	$1,77 \pm 0,12$	$1,61 \pm 0,18$	$1,83 \pm 0,12$
10°	$1,68 \pm 0,35$	$2,39 \pm 0,59$	$1,41 \pm 0,02$	$2,19 \pm 0,17$
12°	$1,74 \pm 0,14$	$2,58 \pm 0,74$	$1,86 \pm 0,14$	$3,15 \pm 0,74$

<sup>1</sup>Ácido ascórbico, determinado por titulometria.  
<sup>2</sup> Ácido ascórbico, determinado por HPLC.

## CONCLUSÕES

1) O teor de vitamina C, na água de coco, aumenta com a maturação do fruto. No entanto, a água de coco não é uma fonte expressiva de vitamina C.

2) Os valores de ácido ascórbico determinados pela técnica que emprega os princípios da cromatografia líquida de alta resolução são significativamente superiores em relação ao método titulométrico, baseado no princípio da oxirredução.

3) A cromatografia líquida é uma alternativa mais favorável para análise de vitamina C, em frutas, do que o método titulométrico da AOAC.

## REFERÊNCIAS

1. A .O .A .C – Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. Washington, 1984. 1015p.

2. ALLAH, A.B.D. & ZAKI, M.S.A. Preservation of mango juice by freezing and canning. *Lie Narung*, 18: 297-316, 1974.
3. BARWICK, V. J. Sources of uncertainty in gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal Food Chromatography*, 849: 13-33, 1999
4. BENDER, A.E. Food processing and nutrition. London, Academic Press, 1978. 243p.
5. BERNHARDT, L.W. Mudanças que ocorrem durante o armazenamento de frutas e hortaliças congeladas. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, 16:9-34, 1979.
6. BIROSEL, D. M.; FERRO, V. O.; HOLCBERG, I. B. & PITELLI, A. C. Isolamento de proteínas em água de coco. *Revista de Farmácia e Bioquímica Universidade de São Paulo*, 14: 35-42, 1976.
7. BRADBURY, J. H. & SINGH, U. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid content of tropical root crops from the South Pacific. *Journal of Food Science*, 51: 975-87, 1986.
8. CHILD, R. Coconuts. 2<sup>nd</sup> ed. London, Longman, 1964. 335p.
9. CARRIEDO, M.O.N.; BUSLIG, B. S. & SHAW, P. E. Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic, and some organic acids in fruits and vegetables by HPLC. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 40: 1127-30, 1992.
10. CASTRO, F. A. & MAIA, G. A. Coco: leite e coco ralado. Governo do Estado do Ceará, Secretaria de Indústria e Comércio, Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial. Fortaleza, 1985. 47p
11. EMBRAPA. Centro de Pesquisa de Tecnologia de Alimentos. Processamento de água de coco verde. Guaratiba, EMBRAPA/CTAA, 1998. 7 p.
12. EMBRAPA. Centro de Pesquisa de Agroindústria Tropical. Processamento e conservação de água de coco verde. Fortaleza, EMBRAPA/CNPAT, 1999. p. 1-8
13. FURUSAWA, N. Rapid high-performance liquid chromatographic identification/quantification of total vitamin C in fruit drink. *Food Control*, 12: 27-9, 2001.
14. FREED, M. Métodos de análise de vitaminas. León, Espanha, Editora Acribia, 1969. 396p
15. FREMOND, Y.; ZILLER, R. & NUCÉ DE LAMOTHE, M. de. Le cocotier. Paris, Maisanneuve & Larose, 1966. 297 p.
16. GRIMWOOD, B. E. Coconut palm products. Their processing in developing countries. Roma, FAO, 1975. 265p.
17. GUTHRIE, H. A. Introductory nutrition. 7. ed. St. Louis, Mosby, 1989. p. 381-94.
18. OLIVEIRA, M.A.B. Variações de algumas características dos frutos do mamoeiro (*Carica papaya*, L.) em função de diferentes épocas de colheita. Campos dos Goytacazes -RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 1999. 69p. (Tese de mestrado).
19. YUAN, J.P. & CHEN, F. Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by HPLC – dual detection. *Food Chemistry*, 64: 423-7, 1999.
20. SMIRNOFF, N. Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Smirnoff, N. (ed.). Environment and plant metabolism flexibility and acclimation. Lancaster, University of Lancaster, Bios Scientific Publishers, 1995. p. 217-43.
21. THOMPSON, C. O. & TRENERRY, V. C. A rapid method for the determination of total ascorbic acid in fruits and vegetables by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chemistry*, 53: 43-50, 1995.
22. VINCI, G.; BOTRÈ, F. & MELE, G. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. *Food Chemistry*, 53: 211-4, 1995.