

Determinação fotométrica do ácido ascórbico

JORGE LEME JUNIOR e E. MALAVOLTA (*)
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------|-----|
| 1 — Introdução | 116 |
| 2 — Material e métodos | 116 |
| 3 — Resultados | 118 |
| 4 — Discussão | 123 |
| 5 — Resumo e Conclusões | 124 |
| 6 — Summary | 124 |
| 7 — Literatura citada | 125 |

(*) Respectivamente : Docente Livre e Assistente de Tecnologia Agrícola e Assistente de Química Agrícola.

1 — INTRODUÇÃO

O presente trabalho foi feito com a finalidade de adaptar o método fotocolorimétrico de BESSEY para a dosagem do ácido ascórbico ao "E. E. L. portable colorimeter", seguindo, com ligeiras modificações, a técnica descrita por ORSINI e PAULA SANTOS (1943). Fizemos a adaptação para esse tipo de colorímetro por se tratar dum aparelho simples, barato e já bastante distribuído em laboratórios do país.

Como o ácido metafosfórico a 3%, protetor comumente usado nas determinações, é caro, difícil de ser encontrado no comércio e não muito estável tratamos da sua substituição pelo ácido oxálico a quatro por mil preconizado por PONTING (1943), o qual não possui aqueles inconvenientes e dá os mesmos resultados.

2 — MATERIAL E MÉTODOS

2. 1. O aparelho usado foi um "E. E. L. portable colorimeter", Patent n. 594497 fabricado pela Evans Electro Selenium Ltd. de Harlow, Essex, England. Possui uma única célula fotoelétrica podendo trabalhar com corrente alternada ou com pilha. Preferimos sempre o segundo meio.

2. 2. Para a preparação da solução de ácido metafosfórico a 3% dissolvemos com água, para 1 litro, 30 gramas da droga em lentilhas ("pellets"), fabricada por J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, New Jersey, U. S. A. O ácido oxálico a quatro por mil foi preparado dissolvendo, com água, para 1 litro, 4 gramas da droga da mesma procedência. Conserva-se por 15 dias a 5°C.

A seguir, fizemos soluções de ácido ascórbico puro em ácido metafosfórico a 3% e em ácido oxálico a 4 por mil contendo 20 miligramas de vitamina C em 1 litro.

O buffer de citrato de sódio foi preparado dissolvendo-se 78,4 gramas de ácido cítrico em 746,7 cc de NaOH normal isenta de carbonato e completando ao volume de 1 litro.

A solução do reativo para a vitamina C foi feita por dissolução a quente de 80 miligramas do "sodium-2,6 Di chloro benzenoneindophenol" de Paragon Laboratories (Orange, N. Y. U. S. A.) para 1 litro com água destilada. Juntamos previamente um pouco de bicarbonato de sódio p.p.a.; filtramos depois de feito o volume. A concentração usada, em ensaios preliminares, mostrou-se a mais adequada para o nosso aparelho. Em geladeira, conserva-se por dez dias.

2. 3. Cada cc das soluções stock possui 20 γ de vitamina C. Então, pipetando para duas séries de 10 balões calibrados de 100 cc, porções de 10, 20, ..., 90 e 100 cc e completando ao volume com HPO_3 a 3% para uma e com $(\text{COOH})_2$ a 4 por mil para outra série, obtêm-se padrões contendo de 2 a 20 gama de ácido ascórbico por cc.

As leituras são feitas da seguinte maneira :

A. Para o ácido metafosfórico : em cada um duma série de beakers de 50 cc são tomados 3 cc do tampão; no primeiro deles se põe 10 cc da solução de HPO_3 a 3% e nos outros, 10 cc das soluções sucessivas dos padrões. Bem misturados, se toma 5 cc do primeiro beaker (tampão e solução de HPO_3) usando pipeta de 5 cc com a ponta cortada e passa-se para um tubo do colorímetro que já deve conter 5 cc da solução de 2,6-diclorof. Antes porém, o aparelho teve a agulha do seu galvanômetro posta no zero da escala usando-se um tubo do colorímetro cheio de água destilada e um filtro verde. Misturamos bem o tampão mais solução de HPO_3 a 3% com o 2,6-diclorof., retiramos o tubo de água destilada, colocamos o outro no aparelho e depois de 15 segundos da mistura inicial é lida a extinção. Esta primeira leitura é o blank. Faz-se o mesmo com o conteúdo dos demais beakers e anota-se as respectivas extinções. Subtraímos estas últimas da extinção do blank.

A adição do buffer tem a finalidade de levar o pH do meio para 3,5 - 3,7, limites mais favoráveis para a leitura.

B. Para o ácido oxálico, em vista de ensaios prévios, verificamos a necessidade de preparar um tampão mais diluído para se obter o mesmo pH de 3,5 a 3,7 o que conseguimos diluindo 465 cc do primeiro buffer para 1 litro com água destilada. Todas as demais operações foram idênticas às já descritas.

2. 4. Para a dosagem da vitamina C em produtos vegetais pesa-se entre 1 e 10 gramas da amostra de acôrdo com a sua riqueza; a amostra deve ser a mais uniforme possível. Fazem-se extrações sucessivas em almofariz de ágata, vidro ou porcelana com ajuda de areia (lavada previamente com HCl e depois com água destilada em abundância até não dar mais reação ácida) com adições das soluções ácidas protetoras passando-se para um funil com papel de filtro sobre balão calibrado de 100 ou 200 cc, até completar o volume. Quando, em vista da pobreza do material, a quantidade tomada é maior que 5 gramas e principalmente se o produto for de difícil manipulação pode ser necessário um balão maior (de 250 ou 500 cc) ou repetir a extração no resíduo.

A leitura é feita assim : pipetam-se 10 cc do extrato para um beaker de 50 cc que já deve conter 3 cc do tampão. Mistura-

se bem, toma-se 5 cc em pipeta de ponta cortada no traço inferior para soltar rapidamente o seu conteúdo num tubo do colorimetro tendo 5 cc da solução do corante. Agita-se bem e coloca-se o tubo no aparelho previamente calibrado da maneira descrita em 2. 3. A. Faz-se uma leitura no fim de 15 segundos (a partir da mistura inicial) e outra decorridos mais 15 segundos. A seguir descora-se completamente o líquido com algumas gotas duma solução concentrada de vitamina C. Uma terceira leitura dá a extinção devida à coloração e turvação naturais do extrato.

Caso a primeira leitura tenha sido nula por completo descoramento, deve-se fazer uma diluição conveniente do extrato com a solução protetora.

O cálculo da concentração da vitamina C é feita da maneira seguinte :

$$1a. \text{ leitura} = L1$$

$$2a. \text{ leitura} = L2$$

$$3a. \text{ leitura} = L3$$

$$\text{leitura do blank} = B;$$

$L1 - L2$ = diminuição da extinção motivada pelas substâncias interferentes em 15 segundos; êste valor deve ser somado a $L1$ pois a primeira leitura foi feita após 15 segundos da mistura do extrato com o reagente; teremos assim uma extinção.

$$L1 + L1 - L2 = 2L1 - L2 ;$$

dêsse valor deve ser subtraída ainda a 3a. leitura que é a extinção ocasionada pelas matérias corantes naturais e substâncias turvadoras; teremos :

$$L = 2L1 - L2 - L3 ;$$

o valor de L subtraído da leitura B do blank dá y que é usado nos cálculos.

3 — RESULTADOS

As concentrações dos padrões e as diferenças entre a extinção do blank e as extinções correspondentes aos padrões guardam entre si uma relação linear que pode ser verificada facilmente num gráfico em que se marquem as concentrações no eixo das abcissas e as diferenças citadas no eixo das ordenadas. Em vista disso podemos calcular o coeficiente de correlação r entre as duas variáveis seguindo a marcha dada por GOMES e MALAVOLTA (1949). Chamando x as concentrações dos padrões, y as diferenças extinção do blank-extinções dos padrões, organizámos a tabela seguinte, com os dados referentes ao HPO_3 :

TABELA I

| x | y | x ² | y ² | xy |
|-----|-----|----------------|----------------|------|
| 2 | 4 | 4 | 16 | 8 |
| 4 | 6 | 16 | 36 | 24 |
| 6 | 10 | 36 | 100 | 60 |
| 8 | 13 | 64 | 169 | 104 |
| 10 | 17 | 100 | 289 | 170 |
| 12 | 20 | 144 | 400 | 240 |
| 14 | 24 | 196 | 576 | 336 |
| 16 | 29 | 256 | 841 | 464 |
| 18 | 31 | 324 | 961 | 558 |
| 20 | 37 | 400 | 1369 | 740 |
| 110 | 191 | 1540 | 4757 | 2704 |

O coeficiente de correlação r é dado pela fórmula :

$$r = \frac{S_{xy} - \frac{(S_x)(S_y)}{n}}{\sqrt{S_x^2 - \frac{(S_x)^2}{n}} \sqrt{S_y^2 - \frac{(S_y)^2}{n}}} \quad \text{onde } n \text{ é o}$$

número de pares de variáveis correlacionadas; no caso presente $n = 10$

$$r = \frac{2704 - \frac{110 \times 191}{10}}{\sqrt{1540 - \frac{110^2}{10}}} \frac{603}{\sqrt{4757 - \frac{191^2}{10}}} = \frac{603}{604,64} = 0,997.$$

Para êste valor de r e 9 graus de liberdade ($nf = n - 1$), o limite de probabilidades encontrado em FISHER e YATES, 1943, pág. 42, é menor que 0,001. A correlação é portanto altamente significativa.

Vamos calcular agora o coeficiente de regressão com o qual poderemos obter, pelo método dos quadrados mínimos, a equação da reta que mais bem se adapte aos pontos do gráfico:

$$b = \frac{(Sx)(Sy)}{Sx^2} = \frac{2704 - \frac{110 \times 191}{10}}{1540 - \frac{110^2}{10}} = 1,827.$$

Representando por \bar{x} e \bar{y} as médias de x e y obtemos para equação da reta

$$Y - \bar{y} = b(x - \bar{x}).$$

$$\text{Como } \bar{x} = \frac{110}{10} = 11 \text{ e } \bar{y} = \frac{191}{10} = 19,1 \text{ e } b = 1,827, \text{ vem,}$$

$$Y - 19,1 = 1,827(x - 11)$$

$$Y = 1,827x - 0,997.$$

Da mesma maneira obtemos com os dados do ácido oxálico:

$$r = 0,998 \quad e$$

$$Y = 1,930x - 0,73$$

O quadro seguinte nos dá uma idéia do quanto uma e outra equação de regressão se prestam para a interpolação ou seja, para a determinação da vitamina C. (Figuras 1 e 2).

TABELA II

| Ácido ascórbico γ /cc do padrão x | Extinção do blank — Extinção padrão | | | | | | | | | |
|--|-------------------------------------|-------|----------|------|-------|---------------------|-------|----------|------|-------|
| | HPO ₃ | | | | | (COOH) ₂ | | | | |
| | Obs. | Calc. | Obs.x100 | Obs. | Calc. | Obs. | Calc. | Obs.x100 | Obs. | Calc. |
| | y | Y | Calc. | y | Y | y | Y | Calc. | y | Calc. |
| 2 | 4 | 2,6 | 150,5 | 3 | 3,1 | 96,7 | | | | |
| 4 | 6 | 6,3 | 95,2 | 6 | 6,9 | 86,9 | | | | |
| 6 | 10 | 9,9 | 101,0 | 12 | 10,8 | 111,1 | | | | |
| 8 | 13 | 13,6 | 95,5 | 15 | 14,7 | 102,0 | | | | |
| 10 | 17 | 17,2 | 98,8 | 19 | 18,5 | 102,7 | | | | |
| 12 | 20 | 20,9 | 95,6 | 22 | 22,4 | 98,1 | | | | |
| 14 | 24 | 24,5 | 97,9 | 26 | 26,3 | 98,0 | | | | |
| 16 | 29 | 28,2 | 102,8 | 30 | 30,1 | 99,6 | | | | |
| 18 | 31 | 31,8 | 97,4 | 34 | 34,0 | 100,0 | | | | |
| 20 | 37 | 35,5 | 104,2 | 38 | 37,9 | 100,2 | | | | |

Como se vê, tanto para o caso do HPO₃ como para o (COOH)₂ a concordância entre os valores observados e os esperados é muito boa, exceção feita para as duas concentrações menores de ácido ascórbico, 2 e 4 γ /cc.

Se fizermos x = Extinção do blank — Extinção do padrão e Y = γ de ácido ascórbico/cc, o que é um procedimento mais correto uma vez que as leituras não estão sujeitas a erros ex-

perimentais muito acentuados, chegaremos às seguintes equações de regressão

$$\text{para o HPO}_3, Y = 0,543x + 0,629 \text{ e}$$

$$\text{para o (COOH)}_2, Y = 0,516x + 0,422.$$

Organizamos agora a seguinte tabela :

TABELA III

| Extinção blank — Ext. padrão | Microgramas de ácido ascórbico/cc | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|-------|------|-------|----------|---------------------|-------|------|-------|----------|
| | HPO ₃ | | | | | (COOH) ₂ | | | | |
| | Ext. | Calc. | Esp. | Calc. | Esp.x100 | Ext. | Calc. | Esp. | Calc. | Esp.x100 |
| 4 | 2,8 | 2 | 1,9 | 71,4 | 105,7 | 3 | 2,8 | 2 | 1,9 | 105,7 |
| 6 | 3,9 | 4 | 3,5 | 102,5 | 114,2 | 6 | 3,9 | 4 | 3,5 | 114,2 |
| 10 | 6,0 | 6 | 6,6 | 100,0 | 90,6 | 12 | 6,0 | 6 | 6,6 | 90,6 |
| 13 | 7,7 | 8 | 8,1 | 103,8 | 98,7 | 15 | 7,7 | 8 | 8,1 | 98,7 |
| 17 | 9,8 | 10 | 10,2 | 102,0 | 98,0 | 19 | 9,8 | 10 | 10,2 | 98,0 |
| 20 | 11,5 | 12 | 11,7 | 104,3 | 102,5 | 22 | 11,5 | 12 | 11,7 | 102,5 |
| 24 | 13,6 | 14 | 13,8 | 102,9 | 101,4 | 26 | 13,6 | 14 | 13,8 | 101,4 |
| 29 | 16,4 | 16 | 15,9 | 97,5 | 100,6 | 30 | 16,4 | 16 | 15,9 | 100,6 |
| 31 | 17,4 | 18 | 17,9 | 103,4 | 100,5 | 34 | 17,4 | 18 | 17,9 | 100,5 |
| 37 | 20,7 | 20 | 20,0 | 96,9 | 100,0 | 38 | 20,7 | 20 | 20,0 | 100,0 |

(Figuras 3 e 4)

Comparando a *Tabela I* e a *Tabela II* vemos logo que os dados da última são melhores e que portanto é preferível usar as equações correspondentes.

4 — DISCUSSÃO

A avaliação da concentração de ácido ascórbico quando se faz a sua determinação fotocolorimétrica é comumente baseada na determinação de um chamado "fator de calibração" cujo cálculo é feito assim: conhecida a extinção do blank, as concentrações e extinções respectivas de três padrões, subtraímos estas últimas extinções da do blank. A seguir estabelecemos a relação:

$$D_s \times C_p = D_p \times C_s$$

onde D_s = Extinção do blank — Extinção do padrão

D_p = Extinção do blank — Extinção do problema

C_p = Concentração de ácido ascórbico no problema

C_s = Concentração de ácido ascórbico no padrão.

Faz-se o mesmo para os outros padrões. Somam-se as três igualdades membro a membro e tira-se o valor de C_p que procuramos.

Essa maneira de proceder nos parece, entretanto, precária uma vez que a dosagem baseada apenas em três determinações sujeitas a erros que podem ser mais ou menos graves ficará prejudicada. O uso da equação de regressão calculada com auxílio do método dos quadrados mínimos aplicado a dez pares de dados e não apenas a três oferece vantagens indiscutíveis permitindo obter dados muito mais dignos de confiança.

Embora para o cálculo da equação fôssemos levados naturalmente a chamar de x a concentração de ácido ascórbico e Y a diferença de extinções uma vez que esta é função daquela, em vista dos resultados nas tabelas, verificamos que é preferível fazer o contrário uma vez que a interpolação obtida assim é mais satisfatória.

Para a determinação da vitamina C em produtos vegetais sugerimos que se tome porções que deem uma concentração maior que 4 γ por cc uma vez que para quantidades menores a concordância entre os valores observados e os calculados não é boa.

5 — RESUMO E CONCLUSÕES

A determinação fotocolorimétrica da vitamina C no "E. E. L. portable colorimeter" pode ser feita rápida e convenientemente quer se use o HPO_3 a 3% ou o $(\text{COOH})_2$ a quatro por mil como protetor. Em qualquer dos casos preparam-se padrões que contenham de 2 a 20 γ de ácido ascórbico por cc de solução de ácido metafosforico ou de ácido oxálico. Misturam-se 10 cc dessas soluções com 3 cc dos tampões adequados, pipetam-se 5 cc para um tubo colorimétrico contendo 5 cc da solução de 2,6 diclorofenolindofenol (80 miligramas/litro), agita-se e depois de 15 segundos lê-se a extinção usando filtro verde. Subtraem-se essas leituras da do blank (10 cc de ácido protetor mais 3 cc do tampão respectivo contra 5 cc do corante). Chamando a essa diferença de x e às concentrações de ácido ascórbico/cc de y chega-se, pelo método dos quadrados mínimos às seguintes equações de regressão :

$$\text{para o ácido metafosfórico } Y = 0,543x + 0,629$$

$$\text{para o ácido oxálico } Y = 0,516x + 0,422$$

que permitem, por interpolação, determinar o teor da vitamina C em produtos vegetais.

6 — SUMMARY

The photometric determination of ascorbic acid with the "E. E. L. portable colorimeter" can be carried out rapid and conveniently using either 3% HPO_3 or 0,4% $(\text{COOH})_2$ as protective agent. The standards would contain from 2 to 20 micrograms of ascorbic acid per ml of metaphosphoric or oxalic acid solutions. We mix 10 ml of these solutions with 3 ml of the adequate citrate buffer solutions, and we pipet 5 ml of the resulting mixture to a matched test tube containing 5 ml of so-

dium — 2,6 — dichlorobenzenoneindophenol (80 mg per liter); then we shake well and after 15 seconds the extinction is read using green filter. The readings are subtracted from the blank one. Designating the differences by x and the concentrations of ascorbic acid/ml in the standards by y , we get, with the acid of the method of least squares, the following regression equations :

$$\begin{array}{ll} \text{for the metaphosphoric acid} & Y = 0,543x + 0,629 \\ \text{for the oxalic acid} & Y = 0,516x + 0,422, \end{array}$$

which permit, by interpolating, the determination of the ascorbic acid content in plant materials.

7 — LITERATURA CITADA

- FISHER, RONALD A. and FRANK YATES 1943 Statistical tables for biological, agricultural and medical research, Second Edition, Oliver and Boyd Ltd., London — Edinburgh.
- GOMES FREDERICO PIMENTEL e EURIPEDES MALAVOLTA. 1949 Considerações matemáticas sôbre a lei de Mitscherlich. Boletim n.º 3 da Esc. Sup. Agr. "Luiz de Queiroz", Piracicaba.
- ORSINI, DEMOSTENES e OTÁVIO DE PAULA SANTOS. 1943 Determinação da vitamina C em alguns frutos brasileiros pelo colorímetro fotoelétrico. Separata da Resenha Clínico-Científica, Ano XII — Dezembro de 1943 — N.º 12.
- PONTING, J. D. 1943 Extraction of ascorbic acid from plant materials. Indus. and Engin. Chem., Anal. Edit. 15:381-391.

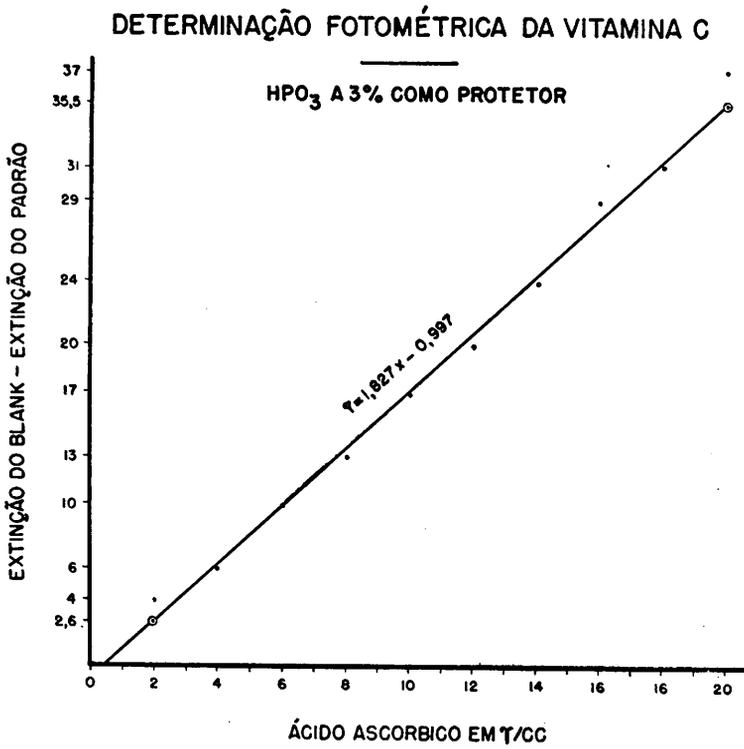


FIG. 1

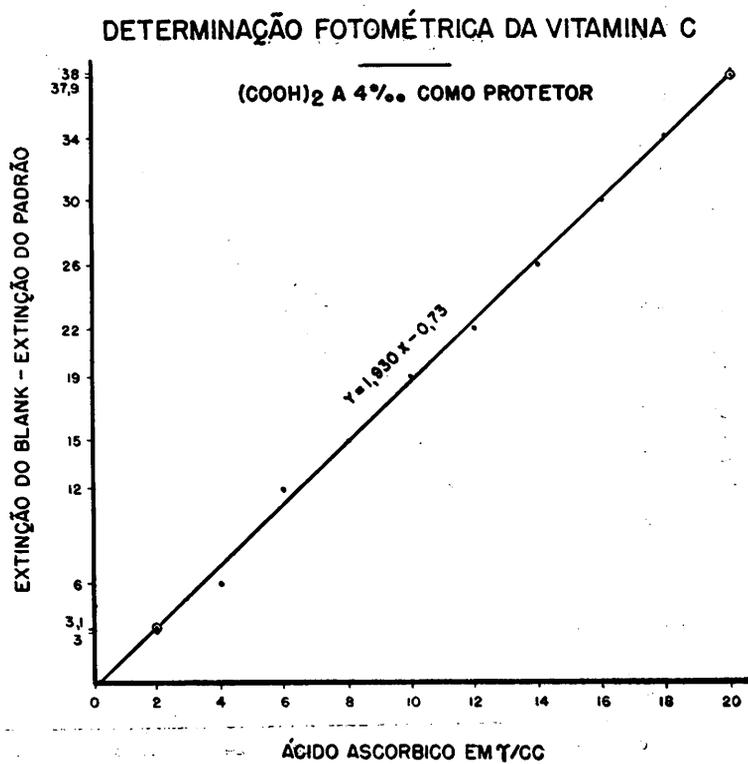


FIG. 2

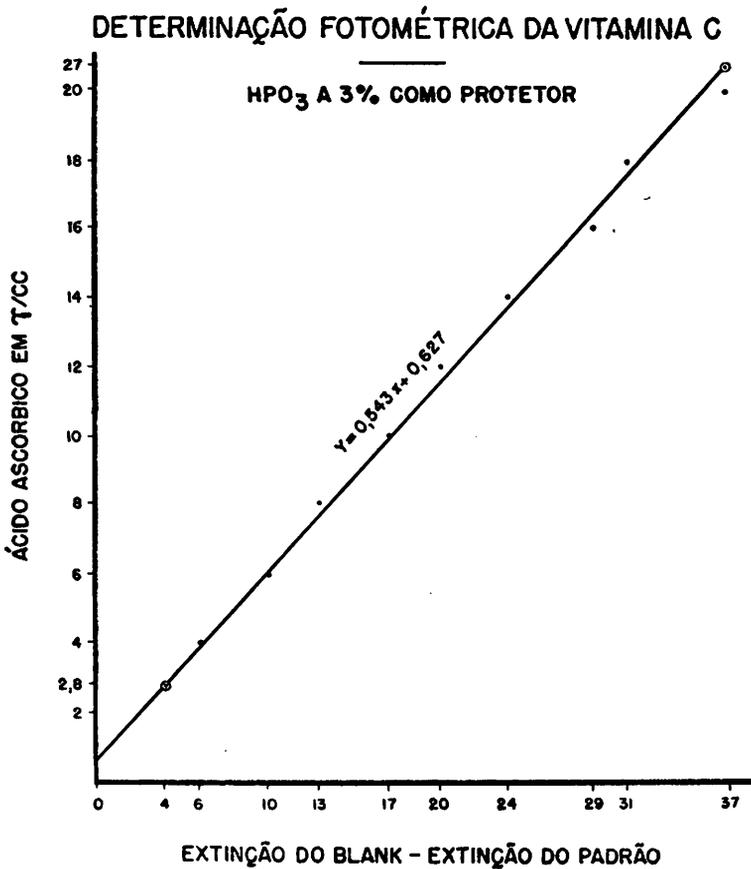


FIG. 3

