

Determinação espectrofotométrica de vitamina C por redução de íons cúpricos

Este método é aplicável para a quantificação de ácido ascórbico (vitamina C), em baixas concentrações em alimentos pigmentados, naturais e industrializados.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS com cubetas de 1 cm de espessura, liqüidificador, agitador mecânico, balança analítica, béqueres de 50 e 100 mL, pipetas graduadas de 1, 2, 5 e 10 mL, pipetas volumétricas de 1, 2, 5 e 10 mL, provetas de 50 e 100 mL, balões volumétricos de 50 e 100 mL, funil de vidro, provetas de 25 e 50 mL com tampa, frasco Erlenmeyer de 250 mL com tampa e frasco Erlenmeyer de 25 mL.

Reagentes

Acetato de sódio

2,2'-Biquinoleína (cuproína)

Tolueno

Álcool isoamílico

Ácido sulfúrico

Ácido ascórbico padrão

Uréia

Clorofórmio

Álcool

Acetato de cobre (II) mono-hidratado

Solução de ácido metafosfórico a 5% m/v

Solução A (Branco) - Pipete 2 mL da solução de ácido metafosfórico a 5%, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água.

Solução-tampão de acetato de sódio e ácido acético 1 M, pH = 4,6 com 1,5% de uréia - Pese 13,6 g de acetato de sódio (no caso de se usar o acetato de sódio anidro, pese 8,2 g) e dissolva em 100 mL de água (solução I). Meça 6 mL de ácido acético, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água (solução II). Misture as soluções I e II, adicione 3 g de uréia e meça o pH.

Solução 2,2'-biquinoleína (cuproína) a 0,4% em tolueno m/v.

Solução de acetato de cobre (II) a 0,075% em álcool isoamílico m/v

Reagente de complexação (Solução C) - Transfira 95 mL da solução de acetato de cobre II 0,075% em álcool isoamílico para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com 5 mL de solução de cuproína 0,4% em tolueno. Esta solução deverá ser recém-preparada.

Solução de ácido sulfúrico 0,05 M.

Solução-padrão I de ácido ascórbico a 1 mg/mL - Pese 0,1 g de ácido ascórbico padrão e dissolva em um balão de 100 mL com água.

Solução-padrão II a 20 µg/mL - Transfira 2 mL da solução de ácido ascórbico de concentração de 1 mg/mL (Padrão I) para um balão volumétrico de 100 mL e adicione 2 mL da solução de ácido metafosfórico a 5% e complete o volume com água.

Nota: proteja as soluções de ácido ascórbico da luz.

Procedimentos

Amostras líquidas - Pese 50 g da amostra, transfira para um liqüidificador e adicione 100 mL da solução de ácido metafosfórico a 5%. Agite, na velocidade máxima durante 1 a 3 minutos. Dependendo da concentração de vitamina C na amostra, transfira 5 a 20 g do extrato para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. Agite e retire uma alíquota de 30 mL da solução e descarte. Adicione ao balão 5 mL de clorofórmio e agite durante 1 minuto. Deixe em repouso para que as camadas se separem.

Amostras sólidas - Pese de uma a quatro gramas da amostra e transfira para um frasco Erlenmeyer juntamente com 10 mL da solução de ácido metafosfórico a 5% e 10 mL de ácido sulfúrico 0,05 M. Agite, em agitador mecânico, por 30 minutos. Transfira 10 g do homogeneizado para um balão volumétrico de 50 mL e complete o volume com água. Agite e retire 10 mL da solução e descarte. Adicione 5 mL de clorofórmio ao balão e agite durante 1 minuto. Deixe em repouso para que as camadas se separem. Pipete 5 mL da camada aquosa límpida para os tubos de reação (provetas de 25 mL com tampa). Adicione 1 mL da solução-tampão e 5 mL da solução complexante. Agite fortemente durante 90 segundos e deixe as camadas se separarem. Retire 3 mL da parte superior (álcool isoamílico) e transfira para um frasco Erlenmeyer de 25 mL. Adicione 0,5 mL de álcool e agite levemente. Prepare um branco, pipetando 5 mL da solução A diretamente no tubo de reação e prossiga como o tratamento da amostra. Leia as absorvâncias das amostras a 545 nm, usando o branco como referência.

Nota: todos os solventes utilizados na preparação das soluções devem ser de alto grau de pureza, pois os contaminantes de caráter redutor interferem na reação.

Curva-padrão - Pipete, diretamente, nos tubos de reação (ou provetas de 25 mL com tampa), alíquotas de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mL da solução-padrão II correspondente, respectivamente, a 10, 20, 30, 40 e 50 µg de ácido ascórbico e complete até 5 mL com a solução A. Adicione 1 mL da solução-tampão e 5 mL da solução complexante. Agite fortemente durante 90 segundos. Deixe as camadas se separarem. Retire 3 mL da parte superior (álcool isoamílico) e transfira para um frasco Erlenmeyer de 25 mL. Adicione 0,5 mL de álcool. Agite suavemente. Repita o mesmo procedimento com o branco constituído de 5 mL da solução A e sem a adição dos padrões. Faça a leitura das absorvâncias a 545 nm, usando o branco como referência. Construa a curva-padrão.

Cálculo

$$\frac{A \times 100}{B} = \text{ácido ascórbico, em } \mu\text{g}/100 \text{ g}$$

A = µg de vitamina C determinada na curva-padrão

B = gramas de amostra contida nos 5 mL do tubo de reação

Referências bibliográficas

BADOLATO, M.I.C.B.; SABINO, M; LAMARDO, L.C.A.; ANTUNES, J.L.F. Estudo comparativo de métodos analíticos para determinação de ácido ascórbico em sucos de frutas naturais e industrializados. Ciênc.Tecnol. Aliment., Campinas, v. 16, n. 3, p. 206-210, 1996. CONTRERAS-GUZMÁN, E.; STRONG III, F.C.; GUERNELLI, O. Determinação de ácido ascórbico (vitamina C), por redução de ions cúpricos. Química Nova, v. 7, n. 2, p. 60-64, 1984.