

Departamento de Química Orgânica e Biológica  
Diretor: Prof. Dr. Fonseca Ribeiro

**SOBRE O TEMPO DE AÇÃO DO SH<sub>2</sub> NO DOSEAMENTO  
DO ÁCIDO ASCÓRBICO  
CONTEUDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO NO PIMENTÃO  
(Capsicum annuum L.)**

POR

**Renato F. Ribeiro — Virgilio Bonoldi — O. F. Ribeiro**

Dentre os processos de doseamento do ácido ascórbico, em quaisquer substratos, o da titulação pelo 2,6-diclorofenolindofenol (reativo de TILLMANS) é ainda o mais correntemente empregado; para o uso de tal reativo várias técnicas foram propostas e, no momento atual, já é possível um doseamento químico específico do ácido ascórbico por intermédio daquele corante. A recente modificação de LESER (1), do método de TAUBER e KLEINER (2), permite um julgamento preciso da valoração do ácido ascórbico + dehidroascórbico em material de qualquer origem, eliminadas todas as substâncias interferentes, como seriam as substâncias Tillmans - redutoras.

O método, conquanto preciso, tem como inconveniente o fato de ser relativamente moroso pois a conversão, necessária, do ácido dehidroascórbico em sua forma reduzida, à custa do SH<sub>2</sub>, se faz num espaço de tempo de várias horas, via de regra mais de 12. Por outro lado, como mostrou PIMENTA (3), quando a espera se prolonga por maior espaço de tempo, o que muitas vezes é inevitável, originam-se, do simples contacto do SH<sub>2</sub> com o substrato, substâncias Tillmans - redutoras, provavelmente sulfuradas, que embora não falseiem os resultados finais têm pelo menos o inconveniente de dificultar a leitura do ponto de viragem.

O método de TAUBER e KLEINER modificado por LESER, em resumo é:

- a) — Extração dos ácidos ascórbico e dehidroascórbico por uma solução de ácido metafosfórico.
- b) — Conversão de todo ácido dehidroascórbico em ascórbico por intermédio de SH<sub>2</sub> que permanece em contacto com o substrato por cerca de 12 horas, à temperatura ambiente e na obscuridade.
- c) — Doseamento de todas as substâncias Tillmans - redutoras.

- d) — Destruição do ácido ascórbico por intermédio de um fermento específico, a ascorbinase.
- e) — Doseamento das substâncias Tillmans - redutoras não ácido ascórbico.

Pareceu-nos de importância e interesse prático tentar reduzir a um mínimo o prazo necessário à ação do  $\text{SH}_2$ , para tanto valendos da ação do calor.

#### PARTE EXPERIMENTAL

Utilizamos duas soluções de ácido ascórbico + dehidroascórbico de títulos bem diferentes afim de comprovar se em concentrações diversas os fenômenos ocorriam em condições semelhantes. Para cada uma das duas concentrações fizemos a mesma série de provas variando o tempo de contacto com o  $\text{SH}_2$  e bem assim a temperatura. Quanto a esta, depois de provas preliminares, observamos que não conviria ultrapassar a temperatura de  $50^\circ\text{C}$  porque a evaporação mais facil das soluções acarretava sempre erros para mais. No quadro

#### INFLUENCIA DO TEMPO E DA TEMPERATURA NA REDUÇÃO DO ACIDO DEHIDROASCÓRBICO PELO $\text{SH}_2$

SOLUÇÃO A			SOLUÇÃO B					
Ácido ascórbico . . .	= 32,5 mg %		Ácido ascórbico . . . = 195,0 mg %					
Ácido dehidroascórbico =	39,0 mg %		Ácido dehidroascórbico = 44,5 mg %					
(24 horas de $\text{SH}_2$ ) . .	= 71,5 mg %		(24 horas de $\text{SH}_2$ ) . . = 239,5 mg %					
TEMPOS em min.	40° C	50° C	TEMPERATURA AMBIENTE (14,5° C)			50° C	40° C	TEMPOS em min.
			Solução A	Tempos em min.	Solução B			
5	43,0	56,0	43,5	10	208,5	215,0	208,5	5
10	45,0	72,0	49,5	20	214,0	229,0	230,0	10
15	60,0	71,5	55,0	30	218,5	234,0	235,0	15
20	66,0	70,5	58,5	40	224,0	239,5	238,5	20
25	69,9	71,5	59,5	50	226,0	240,0	239,0	25
30	71,5	71,0	63,5	60	230,5	240,0	240,0	30
35	70,5	70,5	66,0	80	233,0	239,0	239,0	35
40	71,5	71,0	68,0	100	235,5	240,0	239,5	40
			68,5	120	237,0			
			68,0	150	237,5			
			69,0	180	240,0			
			70,0	240	239,0			
			69,5	300	239,5			
			70,0	360	239,5			
			71,5	24 hs.	239,5			

precedente condensamos todos os resultados mostrando os valores do doseamento em 40 e 50°C com intervalos de 5 minutos, e os de temperatura ambiente, com intervalos de 10 minutos na primeira hora, 20 minutos na segunda, trinta minutos na terceira e, daí por diante, com intervalos constantes de 60 minutos. Como comprovante final, apresentamos ainda o resultado do doseamento, nas mesmas soluções de partida, com 24 horas de permanência com o gás sulfídrico.

A evidência dos resultados contidos no quadro acima dispensa comentários: quatro horas de contacto com  $\text{SH}_2$  à temperatura ambiente (nas condições da presente experiência) foram necessárias e suficientes para conseguir toda a conversão do ácido dehidroascórbico em ascórbico, também alcançada com 30 minutos a 40°C e 10 minutos a 50°C. Com os dados obtidos traçamos as curvas 1 e 2.

Fica assim demonstrado que o tempo de contacto do  $\text{SH}_2$  na transformação do ácido dehidroascórbico para sua forma reduzida, quando do doseamento de vitamina C pelo processo de TAUBER, KLEINER e LESER, pode ser encurtado para 10 minutos apenas (com margem de segurança 15 minutos) desde que se utilize a temperatura de 50°C, ou para 30 minutos, a 40°C. Consegue-se com isso enorme economia de tempo, pois análises que requeriam de 10 a 12 horas passam a ser realizadas dentro do prazo máximo de duas horas.

Com tal modificação o método de doseamento para vitamina C seria, em detalhes, o seguinte:

#### REATIVOS NECESSÁRIOS

- 1 — Solução de ácido metafosfórico a 3%.
- 2 — Solução de  $\text{KIO}_3$  0,01N; esta solução sendo guardada em lugar fresco não se altera.
- 3 — Solução de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  1/4.
- 4 — Solução de amido a 1%.
- 5 — Solução de ácido ascórbico para titulação do reativo de Tillmans e ascorbinase.

A solução de ácido ascórbico para titulação do reativo de Tillmans deve ser preparada no momento de uso, não sendo aconselhado o emprego de conservadores que podem interferir na titulação pelo iodato ou pelo Tillmans; aconselha-se uma solução de cerca de 50 mgr. % de ácido ascórbico em água destilada, cujo conteúdo exato é determinado pela solução de  $\text{KIO}_3$  0,01N segundo a técnica de PIMENTA (4). Para proceder-se à titulação colocam-se 50  $\text{cm}^3$  de água destilada em um Erlenmeyer de 100  $\text{cm}^3$  de capacidade, junta-se 0,5 gr. de IK isento de iodato; adiciona-se 1  $\text{cm}^3$  da solução de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  1/4 e

com rigor 1 cm<sup>3</sup> da solução de KIO<sub>3</sub> 0,01N; de uma microbureta verte-se cuidadosamente a solução de ácido ascórbico até a coloração amarela de iodo tornar-se quase imperceptível; junta-se então 1 cm<sup>3</sup> da solução de amido e continua-se a titulação vertendo-se a solução de ácido ascórbico gota a gota, tendo-se a precaução de agitar muito bem entre uma gota e outra; o desaparecimento da coloração azul dada pela solução de amido, marcará o final da reação. A quantidade de ácido ascórbico por cm<sup>3</sup> da solução será igual ao quociente da divisão de 0,880 pelo n.º de cm<sup>3</sup> gastos da solução de ácido ascórbico na titulação.

#### 6 — Reativo de Tillmans.

Pesam-se 200 mgr. de 2-6 diclorofenolindofenol em pó, e juntam-se, em um "beacker", aproximadamente 500 cm<sup>3</sup> de água destilada a cerca de 70°C; agita-se muito bem e filtra-se em papel, lavando-se o filtro, com água destilada à mesma temperatura, até cerca de um litro; deixa-se esfriar e eleva-se o volume a 1000 cm<sup>3</sup>; adiciona-se pequena quantidade de NaHCO<sub>3</sub> (cerca de 0,5 gr.) que age como conservador, preservando o título do reativo, sendo mínimas as alterações pelo espaço de 15 a 20 dias, quando se tem o cuidado de guardá-lo em vidro escuro e em geladeira. E' conveniente a retitulação depois de 15 dias e se desaconselha o uso do reativo de Tillmans que tenha mais de 30 dias, pois que o ponto de viragem torna-se muito mais difícil de verificação, podendo ser causa de erros sensíveis. A titulação se faz contra uma solução de ácido ascórbico, previamente titulada pelo iodato: em um Erlenmeyer de 50 cm<sup>3</sup> colocam-se 1 cm<sup>3</sup> da solução de ácido ascórbico e 2 cm<sup>3</sup> da solução de ácido metafosfórico. O reativo de Tillmans é colocado em uma microbureta e daí adicionado, gota a gota, à mistura ácido ascórbico e metafosfórico, até aparecimento de uma nítida cor rósea que deverá persistir no mínimo pelo espaço de 5 minutos. O título do reativo é obtido pelo emprego da fórmula:

$$T = \frac{A}{n - 0,07}, \text{ em que:}$$

T = título do reativo, ou seja o n.º de mgr. de ácido ascórbico oxidável por 1 cm<sup>3</sup> do reativo;

A = mgr. de ácido ascórbico presentes em 1 cm<sup>3</sup> da solução;

n = n.º de cm<sup>3</sup> de reativo de Tillmans gastos na titulação;

0,07 = é a quantidade de reativo de Tillmans necessária para a obtenção da viragem nítida em uma prova em branco.

7 — Solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  N/2.

8 — Gás sulfídrico, produzido por um aparelho de Kipp.

9 — Gás carbônico, acondicionado em cilindros de alta pressão.

10 — Solução tampão aceto-acética 0,2 M, de pH 6.

Em um balão volumétrico de 1 litro, colocam-se 51  $\text{cm}^3$  de uma solução 0,2 M de ácido acético, completando o volume de 1 litro com uma solução 0,2 M de acetato de sódio.

11 — Solução de ascorbinase.

Em um ralo comum, ralam-se 6 pepinos verdes e com uma flanela de algodão espreme-se até extrair todo o caldo. Este é medido em um cálice graduado e, para cada 1000  $\text{cm}^3$  de caldo, juntam-se 40  $\text{cm}^3$  de uma solução de  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ba}$  M; agita-se muito bem, deixa-se decantar, retira-se o líquido desprezando-se o precipitado; juntam-se então, para cada 1000  $\text{cm}^3$  do líquido restante, 100  $\text{cm}^3$  de uma solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturada, com o que se precipita o excesso de bário sob forma de sulfato, separando-o da solução por decantação; o líquido resultante satura-se com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , com o que a ascorbinase é precipitada. Centrifuga-se para separar o precipitado que é em seguida lavado com uma solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; com este faz-se uma suspensão em 10  $\text{cm}^3$  de água e finalmente dialisa-se em saco de celofane, em água corrente, durante 24 horas, adicionando-se previamente 1 gota de toluol. O conteúdo do saco é então filtrado e conservado em geladeira.

Determina-se a atividade da solução de ascorbinase fazendo-se agir quantidades variáveis desta sobre uma quantidade fixa de ácido ascórbico, em solução de pH 6 a 38°C, durante 15 minutos. Um tubo testemunho, apenas com o tampão de pH 6 e a solução de ácido ascórbico, permite calcular a oxidação espontânea. Deduzindo-se do total a quantidade de ácido ascórbico transformado por oxidação espontânea, teremos a quantidade de ácido ascórbico oxidado pela ascorbinase em cada um dos tubos, mediante titulação da quantidade do ácido restante após inibição da ascorbinase (findo o prazo de 15 minutos), pela adição de 2  $\text{cm}^3$  de ácido metafosfórico. Assim por exemplo, se 0,50 mgr. de ácido ascórbico se reduzem pela oxidação espontânea a 0,35 mgr. e a 0,00 mgr. pela ação de 1  $\text{cm}^3$  da solução de ascorbinase, sabemos que para cada 0,1 mgr. de ácido precisamos cerca de 0,3  $\text{cm}^3$  da solução de ascorbinase.

Recomendamos entretanto, para doseamento de substratos vegetais, o uso de quantidade tripla da calculada de fermento e 30 minutos em banho-maria a 38°C afim de assegurar a completa oxidação de todo ácido ascórbico presente; assim também o controle de eficiência

do fermento com um tubo testemunho com uma solução de ácido ascórbico cristalizado. A solução de ascorbinase assim obtida e conservada em geladeira, preserva-se com apreciável atividade pelo espaço de 15 a 30 dias.

#### TÉCNICA DE DOSEAMENTO

5 cm<sup>3</sup> ou 5 gr. do substrato, obtido pela expressão ou trituração do vegetal, são tratados com 10 cm<sup>3</sup> da solução de ácido metafosfórico a 3% e filtrados em papel-xarope; a mistura apresenta um pH próximo de 1. Transferem-se 10 cm<sup>3</sup> para um tubo de ensaio comum e adiciona-se uma solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> N/2 até a obtenção de um pH 6, o que geralmente exige 0,5 cm<sup>3</sup> do carbonato. Depois de forte agitação para desprendimento do CO<sub>2</sub> produzido, procede-se à passagem do SH<sub>2</sub> pelo espaço de 5 minutos; por meio de um dedo de borracha ajustado à boca do tubo veda-se o escape deste gás. O tubo é então colocado em banho-maria a 40°C pelo espaço de 30 minutos; elimina-se depois o SH<sub>2</sub> por uma corrente de CO<sub>2</sub> (até reação negativa de sulfureto com o papel de (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> Pb.). A 2 cm<sup>3</sup> do substrato assim tratado, em um Erlenmeyer de 50 cm<sup>3</sup>, adicionam-se 2 cm<sup>3</sup> da solução de ácido metafosfórico e titula-se pelo reativo de Tillmans.

Em um tubo de ensaio, a outros 2 cm<sup>3</sup> do mesmo substrato junta-se 1 cm<sup>3</sup> da solução tampão aceto-acética 0,2 M de pH 6 e quantidade de ascorbinase suficiente para oxidar todo ácido ascórbico revelado pela titulação anterior. Agita-se bem e leva-se ao banho-maria a 38°C pelo espaço de 30 minutos, ao fim dos quais interrompe-se a ação do fermento com 2 cm<sup>3</sup> da solução de ácido metafosfórico, procedendo-se no próprio tubo, a uma nova titulação pelo reativo de Tillmans. A diferença entre a primeira titulação e esta segunda nos dá a quantidade real de ácido ascórbico contido no substrato dosado, correspondente a uma alíquota do vegetal pesquisado.

#### MANEIRA DE CALCULAR

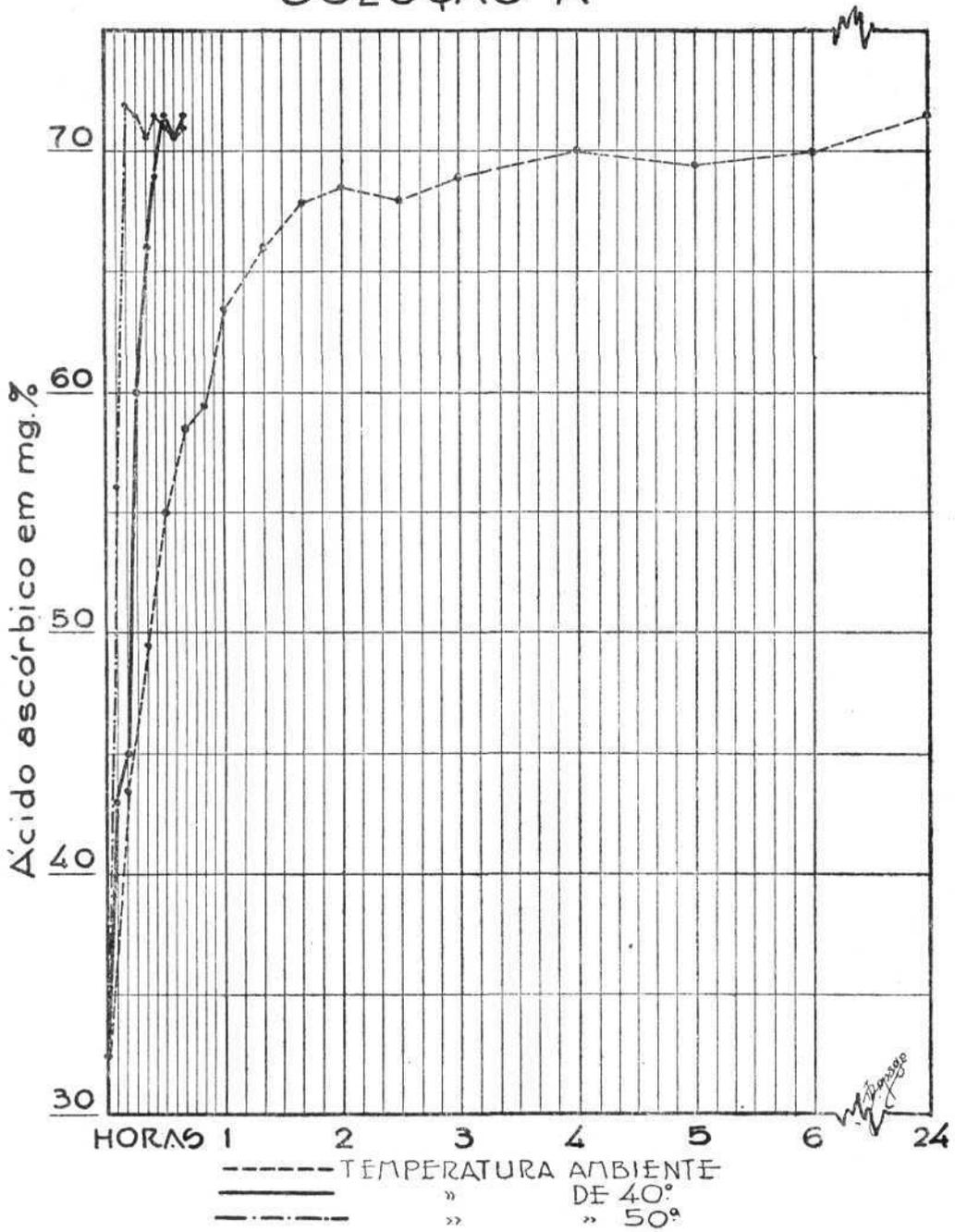
Para dosar um substrato vegetal qualquer, sempre que usarmos quantidades iguais ou equivalentes às do método acima proposto, podemos nos valer da fórmula seguinte, (1)

$$X = \frac{(N - 0,07) T \left( \frac{30 + 3C}{10} \right)}{2} = \text{mgr. por cm}^3 \text{ do substrato.}$$

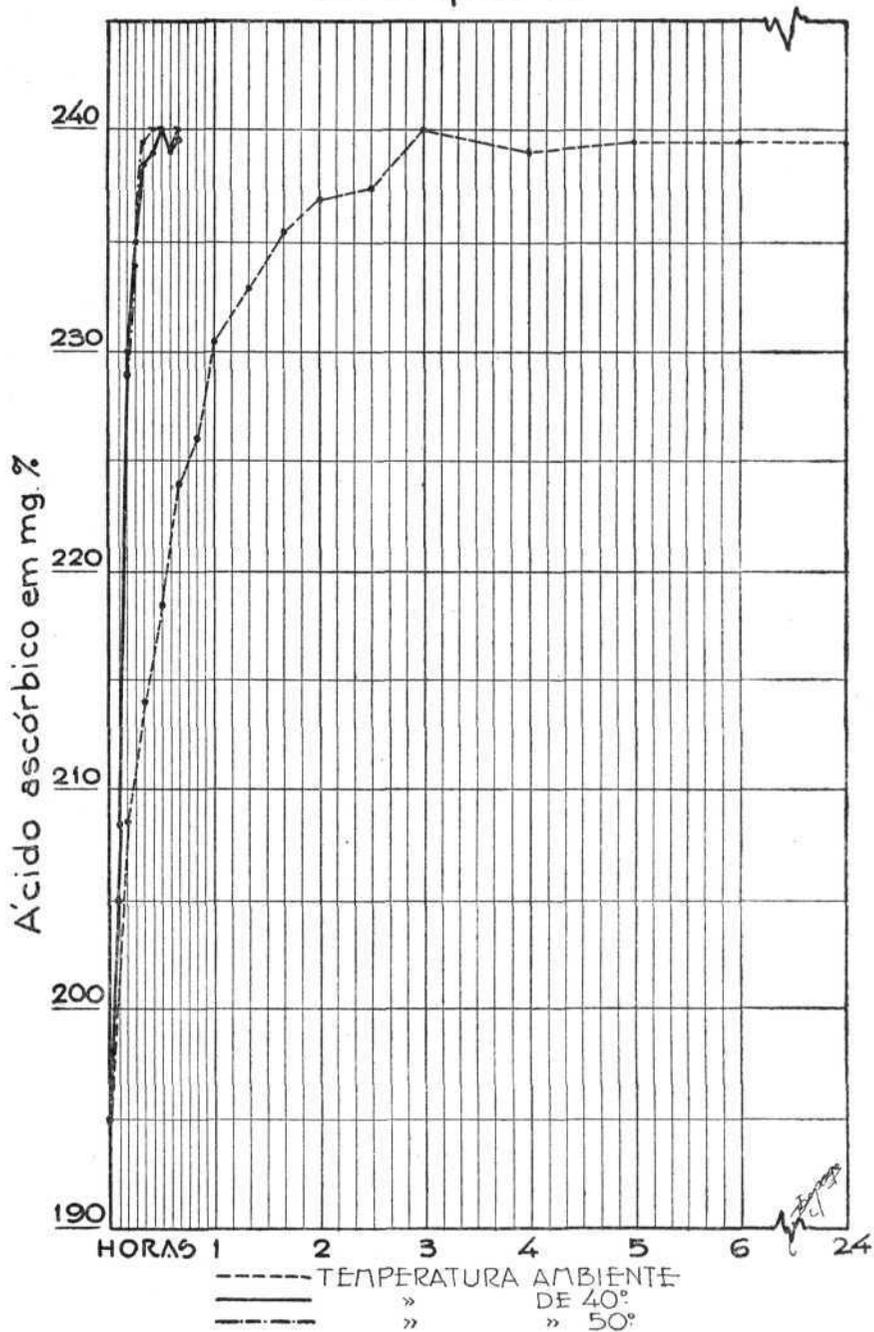
onde: N = n.º de cm<sup>3</sup> do reativo Tillmans gasto na titulação;

T = título do reativo de Tillmans, ou seja, quantidade em mgr. de ácido ascórbico oxidável por 1 cm<sup>3</sup> do reativo;

# SOLUÇÃO A



## SOLUÇÃO B



$C = n.^{\circ}$  de  $\text{cm}^3$  da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  N/2 para a obtenção do pH 6 em  $10 \text{ cm}^3$  do substrato.

Assim, como foi dito acima, obtem-se a quantidade de ácido ascórbico real de um substrato vegetal, calculando-se, por intermédio da fórmula proposta, o  $n.^{\circ}$  de mgr. existentes em  $1 \text{ cm}^3$  do substrato depois da redução pelo  $\text{SH}_2$  e subtraindo-se dêste valor o  $n.^{\circ}$  de mgr. encontrado após a ação da ascorbinase, também calculada por meio da mesma fórmula.

Valendo-nos do método acima proposto realizamos uma série de análises em amostras de pimentão verde; tal escolha tem como justificativa o fato de ser já conhecida (5) neste vegetal, a existência de regular quantidade de ácido dehidroascórbico que exige para sua valoração a redução prévia pelo  $\text{SH}_2$ .

Tais foram os resultados obtidos:

TABELA (\*)

Amostra:	A. A. inicial Mg. %	A. A. Total Mg. %		
		30 minutos a $40^{\circ}\text{C}$	3 horas à temperatura ambiente na obscuridade	24 horas à temperatura ambiente na obscuridade
1	90,3	112,9	111,7	111,7
2	79,2	94,6	93,8	93,5
3	87,9	93,5	93,5	92,7
4	59,8	80,8	81,2	81,2
5	99,8	105,0	104,5	104,5
6	53,1	68,1	66,9	67,0
7	21,4	82,4	85,9	84,3
8	36,4	60,1	57,8	59,8
9	26,5	60,0	58,2	61,4
10	48,7	78,0	75,2	78,0
11	61,4	73,7	72,9	73,3
12	61,1	72,1	74,4	74,4
13	36,4	61,4	60,6	61,0
14	5,3	54,2	54,2	54,2
15	63,0	80,8	80,4	81,2
16	5,5	73,3	72,5	72,9
17	65,0	78,8	78,8	78,8
18	70,1	118,0	118,8	116,4
19	127,5	143,7	144,5	141,0
20	149,7	156,8	156,8	156,8
	M= 62,4	M= 87,4 $\sigma = 27,179$ $\sqrt{V} = 31,12 \%$	M= 87,1	M= 87,2

(\*) A. A. inicial, antes da redução pelo  $\text{SH}_2$ .

A. A. total, compreendendo o A. A. inicial, antes da redução pelo  $\text{SH}_2$  e aquele resultante da transformação, pelo  $\text{SH}_2$ , do ácido dehidroascórbico; não incluindo, é claro, as demais substâncias Tillmans redutoras, controladas pela ascorbinase.

As médias que encontramos para os doseamentos do ácido ascórbico no pimentão, agindo com 30 minutos de temperatura a 40°C, 3 e 24 horas à temperatura ambiente, são de tal forma concordantes que dispensam uma análise estatística mais acurada. Importa referir que tais médias não pretendem indicar um valor significativo para o teor em ácido ascórbico do pimentão pois que provavelmente grandes diferenças estarão na dependência da época do ano em que as análises sejam feitas, do grau de maturação do fruto, do intervalo que medeia entre a colheita e o exame, etc. Estas considerações justificam a diversidade, no teor médio do ácido ascórbico do pimentão, nas análises por nós feitas e nas que constam dos trabalhos de outros autores (1 e 5).

#### RESUMO

Estudando o método do doseamento do ácido ascórbico proposto por TAUBER e KLEINER e modificado por LESER os A. A. esclarecem que o tempo necessário para a total conversão do ácido dehidroascórbico em ascórbico pelo  $\text{SH}_2$  pode ser grandemente abreviado pela ação do calor: em temperatura de 40°C são suficientes apenas 30 minutos e a 50°C somente 15 minutos, para que a reação se complete. Descrevem o método em detalhes e mostram o resultado de 20 amostras de pimentão (*Capsicum amnuun* L.) cujas análises foram feitas sempre em triplicata: com 30 minutos de contacto com  $\text{SH}_2$  a 40°C, 3 e 24 horas de contacto a temperatura ambiente; nas três séries os resultados foram praticamente os mesmos. A média de ácido ascórbico encontrada para o pimentão verde foi de 87,4 mgr. para 100 gr. de caldo; êste entretanto não deve ser um resultado definitivo, pois que provavelmente condições várias como época do ano, estado de maturação do vegetal, etc., poderão determinar, em outras amostras, resultados diferentes.

#### Abstract

*The authors verified, during a study of the method of dosage of ascorbic acid, as proposed by TAUBER and KLEINER, and modified by LESER, that the time required to a total conversion of the dihydroascorbic acid by the  $\text{SH}_2$ , may be greatly shortened by the action of heat: under a temperature of 40° C, 30 minutes are sufficient and under 50° C only 15 minutes are enough to perform the reaction.*

*A detailed description of the method is given and the results are given of trifold analysis of 20 samples of Chilli (*Capsicum amnuun* L.): 30 minutes in contact with  $\text{SH}_2$  at 40° C, and 3 and 24 hours in contact at room temperature; in the three series the results were practically the same.*

*The average ascorbic acid found in the case of green Chilli, was 87,4 mgr. in each 100 gr. of juice; this is not, however, a definite result, as several conditions, such as the season, the degree of maturation of the vegetal, etc., may bring other samples to different results.*

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) LESER, W. P. — 1941 — Tese para catedrático à *Escola Paulista de Medicina*.
- (2) TAUBER, H., KLEINER, I. — 1935 — *Jour. Biol. Chem.*, **110**: 559.
- (3) PIMENTA, N. — 1941 — Tese para catedrático à *Faculdade de Farmácia e Odontologia de São Paulo*.
- (4) PIMENTA, N. — 1939 — *O Hospital*, vol. XVI, (3) 440-443.
- (5) PAULA SOUZA e colaboradores — 1936 — *Rev. Brasileira de Química*, São Paulo, 193-201.

