

## NOVA TÉCNICA PARA A DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE $\alpha$ -TOCOFEROL (a)

### A NEW TECHNIQUE FOR THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF $\alpha$ -TOCOPHEROL

WALDOMIRO PREGNOLATTO (b)  
IONE I. GOMES (b)

#### SUMMARY

The authors describe a new technique for the stabilization of the color of the complex  $\alpha$ - $\alpha'$ -dipyridil-Fe II in the determination of  $\alpha$ -tocopherol.

EDTA is used for complexing the excess of the ions Fe III used in the reaction.

The data are reproducible and the color is steady, which makes the process very sensible.

#### INTRODUÇÃO

A principal dificuldade na reação de EMMERIE & ENGEL<sup>1</sup>, que é a instabilidade da cor produzida, foi eliminada com o uso do EDTA para complexar o excesso de ions de Fe III, presentes na reação.

A reação de Emmerie-Engel consiste essencialmente na dosagem dos ions de Fe II, que se formam na redução de Fe III pela vitamina E.

Existem inúmeras técnicas para a dosagem de vitamina E, segundo esta reação, mas nenhuma delas consegue estabilizar quantitativamente o complexo formado, devido principalmente ao excesso de ions de Fe III que continuam em solução. Estes, além de serem rapidamente reduzidos fotoquimicamente, o que requer cuidados especiais, a fim de se excluir qualquer interferência da luz, ainda impedem acertar-se o 100% de transmitância do aparelho com o branco, devendo este acerto ser feito com etanol.

TSEN<sup>2</sup>, mais recentemente, recomenda complexar-se o excesso de Fe III com ácido fosfórico, o que, todavia, não estabiliza a cor do complexo, não oferecendo, portanto, qualquer vantagem.

A técnica aqui descrita utiliza o EDTA (sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético) para complexar o excesso de ions de Fe III. Nas condições por nós recomendadas, obtêm-se estabilidade da cor, resultados reproduzíveis e, o que é mais importante, pode-se usar, como branco, a mistura dos reagentes, tornando o método sobremodo sensível.

Conhece-se hoje uma série enorme de substâncias orgânicas capazes de formar complexos coloridos com ions de Fe II, como por exemplo a 2,4,6-tripiridil-s-tiazina<sup>3</sup>, 4,7-difenil-1,10-fenantrolina<sup>1</sup>, 1,10-fenantrolina<sup>4</sup>, 2,2',2''-terpiridina<sup>4</sup>, éter monometílico do o-nitrosoresorcinol<sup>5</sup>, tôdas elas tão ou mais sensíveis e espe-

(a) Trabalho realizado na Secção de Química Biológica e Espectrografia do Instituto Adolfo Lutz. Apresentado na 15.<sup>a</sup> Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência.

(b) Do Instituto Adolfo Lutz.

cificas que a  $\alpha$ - $\alpha'$ -dipiridila. Empregamos, todavia, esta última, por ser mais fácil sua obtenção entre nós, como também por seus resultados satisfatórios.

#### MATERIAL E MÉTODOS

A determinação colorimétrica do tocoferol requer sua extração prévia dos materiais gordurosos ou dos medicamentos que os contêm, para eliminação de substâncias interferentes. Descrevemos, inicialmente, os métodos para essa extração e, em seguida, a técnica da reação.

##### a) Extração de vitamina E em altas concentrações

###### *Reagentes:*

- Hidróxido de potássio (em pastilhas)
- Ácido clorídrico concentrado
- Pirogalol
- Éter etílico (isento de peróxidos)
- Sulfato de sódio anidro
- Álcool etílico

*Procedimento* — Adicionar à mistura, contendo aproximadamente 200 mg de acetato de tocoferol, num frasco de fundo redondo, esmerilhado, 50 cm<sup>3</sup> de etanol. Deixar refluxar pelo menos por um minuto. Enquanto a solução está fervendo, juntar, através do condensador, 1 g de KOH em pastilhas (1 pastilha de cada vez, com cuidado para não haver superaquecimento). Deixar refluxar por 20 minutos. Ainda quente, juntar 2 cm<sup>3</sup> de HCl concentrado, gôta a gôta (ou fazer a saponificação em presença de 100 mg de pirogalol, sem o emprêgo de HCl, depois). Deixar esfriar, transferir a solução para um funil de separação de 500 cm<sup>3</sup>, lavando o frasco em 100 cm<sup>3</sup> de éter de petróleo e 100 cm<sup>3</sup> de água. Agitar bem e deixar em repouso até que as camadas se separem. Recolher a camada etérica e lavar a camada aquosa com mais de 2 porções de 50 cm<sup>3</sup> de éter. Reunir os extratos etéricos. Lavar a solução etérica com 4 porções de 100 cm<sup>3</sup>

de água. Adicionar à solução Na<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> anidro para eliminar alguma água restante. Evaporar o éter de petróleo em banho-maria, sob fluxo de nitrogênio, até aproximadamente 8 cm<sup>3</sup>. Depois, evaporar o restante do éter de petróleo sem aquecimento, sob fluxo de nitrogênio. Dissolver o resíduo em álcool e transferir a solução alcoólica para um balão volumétrico, de modo a ter uma solução de aproximadamente 30 µg/cm<sup>3</sup> de vitamina E. Determinar, espectrofotometricamente, a concentração da vitamina E, nesta solução, segundo a técnica descrita.

##### b) Extração de vitamina E em pequenas concentrações

###### *Reagentes:*

- Solução de KOH (dissolver 5 g de KOH em 5 cm<sup>3</sup> de água destilada)
- Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Dissolver 5 g de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado em 15 cm<sup>3</sup> de água destilada)
- Éter de petróleo (isento de peróxidos)

*Procedimento* — Transferir para um tubo de saponificação 10 cm<sup>3</sup> de uma solução etanólica da amostra a analisar. Esta solução deve conter pelo menos 60 µg de  $\alpha$ -tocoferol ou de seu éster, e não mais que 60 mg de gordura. Adicionar uma pérola de vidro e imergir o fundo do tubo num banho de água quente. Dirigir uma corrente de ar para a parte superior externa do tubo, que funcionará como condensador. Ferver pelo menos por um minuto e, então, ainda fervendo, adicionar 0,1 cm<sup>3</sup> da solução de KOH. Colocar um tampão de algodão no tubo e continuar refluxando por 30 minutos. Enquanto a solução ainda está fervendo, remover o tampão de algodão e adicionar 0,2 cm<sup>3</sup> da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Deixar esfriar à temperatura ambiente, adicionar exatamente 12 cm<sup>3</sup> de éter de petróleo e 10 cm<sup>3</sup> de água destilada. Tampar e agitar vigorosamente. Retirar uma alíquota rigorosamente medida da camada de éter de petróleo para um tubo de espectrofotômetro. Evaporar à secura, em corrente de nitrogênio.

c) Reação colorimétrica

*Reagentes:*

Etanol absoluto purificado (O produto comercial é destilado sobre  $MnO_2$  e  $NaOH$ )

Solução de clorêto de Fe III a 0,25% em etanol, recentemente preparada

Solução de  $\alpha$ - $\alpha'$ -dipiridila a 0,6% em etanol

Solução aquosa de EDTA (3,5 mg/cm<sup>3</sup>)

Solução-padrão de  $\alpha$ -tocoferol — Dissolver aproximadamente 50 mg de  $\alpha$ -tocoferol em 50 cm<sup>3</sup> de etanol absoluto. Transferir 1 cm<sup>3</sup> desta solução para um balão volumétrico de 50 cm<sup>3</sup> de capacidade e completar o volume com etanol. Esta solução final contém ao redor de 20  $\mu$ g de  $\alpha$ -tocoferol por cm<sup>3</sup>.

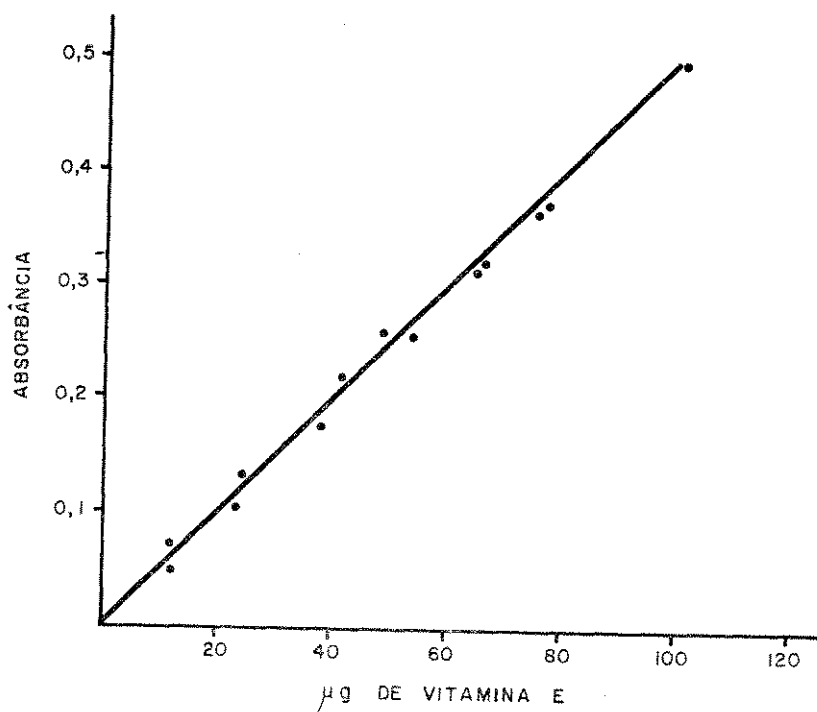
lumes tais da solução de  $\alpha$ -tocoferol de forma a ter, em cada tubo, aproximadamente de 20 a 120  $\mu$ g de  $\alpha$ -tocoferol, em incrementos crescentes de 20  $\mu$ g. 2) Adicionar a cada tubo 1 cm<sup>3</sup> da solução de  $\alpha$ - $\alpha'$ -dipiridila e um volume tal de etanol que some 7 ml com o volume da solução padrão de  $\alpha$ -tocoferol. Proteger os tubos da luz e adicionar a cada um 1 cm<sup>3</sup> da solução de clorêto de Fe III. 3) Esperar 2m e 30s e lêr no espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 520 m $\mu$ . Acertar o 100% de transmitância do aparelho com o "branco" (mistura dos reagentes, menos a vitamina E).

*Nota:* É importante que os reagentes sejam rigorosamente adicionados na ordem indicada; os tempos recomendados devem ser obedecidos e a solução de clorêto de Fe III deve ser preparada no momento do uso, sendo desprezada a seguir.

*Construção da curva padrão —*

1) Pipetar para tubos do colorímetro vo-

A figura representa o gráfico de absorção por nós obtido.



Curva padrão para determinação colorimétrica do  $\alpha$ -tocoferol. Espectrofotômetro Colleman Jr., 520 m $\mu$ , cuba de 19 mm (14-302 B)

### *Técnica*

Dissolver o resíduo em 2 cm<sup>3</sup> de etanol e proceder como na construção da curva padrão, a partir do item 2.

### CONCLUSÕES

Usando a técnica acima proposta, conseguimos resultados reproduzíveis.

É evitada a conversão fotoquímica dos ions de Fe III a Fe metálico (o maior inconveniente do uso da  $\alpha$ - $\alpha'$ -dipiridila).

Com esta técnica, temos determinado o teor de vitamina E existente em medicamentos, alimentos vegetais e rações para animais.

Em provas de recuperação por nós feitas, sempre encontramos o teor de vitamina E adicionado.

### RESUMO

É descrita uma nova técnica para estabilizar a cor produzida por  $\alpha$ - $\alpha'$ -dipiridila e ion de Fe II, na determinação de  $\alpha$ -tocoferol, usando para isto o EDTA

como complexante do excesso de ions de Fe III usados na reação. Os resultados são reproduzíveis e a cor é estável, tornando a reação mais sensível.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. EMMERIE, A. & ENGEL, C. — Colorimetric determination of tocopherol (vitamin E). II. Adsorption experiments. Rec. Trav. Chim. 58:283-289, 1939.
2. TSEN, C. C. — An improved spectrophotometric method for the determination of tocopherols using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. Anal. Chem. 33(7): 849-851, 1961.
3. COLLINS, P. F., DIEHL, H. & SMITH, G. F. — 2,4,6-tripyridyl-s-triazine as a reagent for iron. Determination of iron in limestone, silicates and refractories. Anal. Chem. 31(11):1862-867, 1959.
4. SNELL, F. D. & SNELL, C. T. — Colorimetric methods of analysis. 3. ed. New York, Van Nostrand, 1949. v.2:316.
5. TETSUYA, T. — J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect. 76:336, 1955. (Apud TSEN, C. C. 2).
6. GLICK, D. ed. — Methods of biochemical analysis. New York, Interscience, 1955. v.2.

Recebido para publicação em 13 de agosto de 1963.