

Descripción de experiencias innovadoras para el trabajo experimental.

Determinación de vitamina E en aceites: una experiencia didáctica en Química Analítica Instrumental

Armando Carrasquero-Durán,¹ Elizabeth Regalado,¹ Migdalia Guzmán¹ y Petra Beatriz Navas²

Abstract

The analysis of vitamin E in edible vegetable oils has been proposed as a didactic experience for analytical chemistry laboratory. The Emmeric-Engel method which is based in the reduction of ferric ions by tocopherols, followed by complexing with *o*-Phenantroline to produce a red solution was employed. The didactic experience has been divided into three steps: Revision of aspects related with spectrophotometric analysis, calculation and chemical behavior of vitamin E. The next step is the laboratory activity which involves the construction of a calibration curve, oil sample treatment and vitamin quantification. In the last step results are calculated including an evaluation of errors and analytical quality of results. This experience was carried out in the course of Projects in Applied Chemistry showing its effectiveness.

Resumen

Se propone el análisis de la vitamina E presente en aceites vegetales comestibles como una experiencia didáctica para el laboratorio de química analítica. Se empleó el método de Emmeric-Engel, que se basa en la reducción Fe^{3+} - Fe^{2+} por acción de los tocoferoles presentes en la muestra y la formación de un complejo rojo Fe^{2+} -*o*-Fenantrolina. La experiencia didáctica fue dividida en tres etapas: una revisión teórica inicial sobre los principios del análisis, presentación de resultados e información general sobre la vitamina E. Posteriormente se realiza la actividad de laboratorio que involucra la construcción de la recta de calibración, tratamiento de la muestra de aceite y la cuantificación. En la última etapa se realizan los cálculos para la presentación de resulta-

dos finales y se discute la calidad analítica de los mismos. Esta experiencia fue aplicada en el curso de Proyecto en Química Aplicada, demostrándose su efectividad.

Introducción

Los principios y técnicas del análisis espectrofotométrico en la región visible del espectro electromagnético constituyen contenidos importantes en la mayoría de los cursos de química analítica a nivel universitario. En ese sentido, las clases teóricas en las que se describen las transiciones electrónicas responsables de la absorción de radiación, deben complementarse con actividades de laboratorio en las cuales el alumno además de aplicar dichos conocimientos, adquiera destrezas en el manejo de equipos y ejecute los cálculos matemáticos y estadísticos para la presentación de los resultados.

Las disoluciones acuosas de iones complejos coloridos como dicromatos, cromatos, iones cúpricos, etcétera, son usualmente empleadas para la construcción de espectros y rectas de calibración; sin embargo, también es necesario incorporar trabajos de laboratorio en los que se realicen análisis de muestras verdaderas a fin de evidenciar la utilidad práctica del conocimiento que se busca que adquieran los alumnos. Por ejemplo, en este trabajo se propone el análisis de la vitamina E presente en aceites vegetales como una actividad novedosa que puede ser atractiva al alumno, debido al elevado interés que se tiene en la actualidad con respecto al uso de antioxidantes naturales para desactivar los radicales libres que deterioran los alimentos y que, al ser consumidos, favorecen la degeneración de células acelerando el envejecimiento.

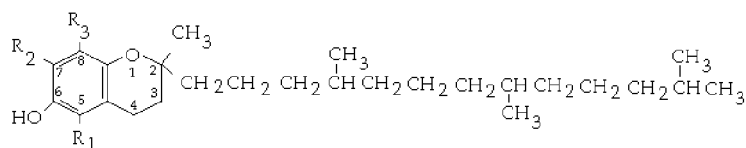
Las actividades de laboratorio deben ser integradoras, al complementar el aprendizaje de los principios específicos de la técnica analítica con información adicional que permita al alumno construir un cuerpo completo de conocimientos. Por esta razón, la experiencia didáctica se ha diseñado en varias etapas, que cubren desde la adquisición de conocimientos iniciales, hasta la presentación final de los resultados. Por lo tanto, el propósito de este trabajo

¹ Universidad Pedagógica Experimental Libertador. Departamento de Química. Apartado 1017-Las Acacias. Maracay. Venezuela.

Correo electrónico: acarrasquero@latinmail.com

² Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. Departamento de Química. Maracay, Venezuela.

Recibido: 20 de octubre de 2003; aceptado: 24 de enero de 2004.



	R ₁	R ₂	R ₃
a	CH ₃	CH ₃	CH ₃
b	CH ₃	H	CH ₃
g	H	CH ₃	CH ₃
d	H	H	CH ₃

Figura 1. Tocoferoles (Fruton y Simmons, 1961).

es describir esta propuesta por medio de un ejemplo real desarrollado en el Laboratorio de Química Aplicada de la Universidad Pedagógica Experimental Libertador.

Descripción de la experiencia didáctica

A diferencia de las prácticas de laboratorio tradicionales, en las cuales el alumno se limita a comprobar el cumplimiento de un principio o ley, aquí se busca un aprendizaje integral, que abarque distintos aspectos de la química que le permitan integrar armónicamente toda la información. Por esta razón, la actividad de laboratorio se ha diseñado como una experiencia didáctica de tres etapas:

Etapas I: Obtención del conocimiento básico sobre la sustancia a analizar, técnicas analíticas espectrofotométricas y principio químico del análisis

La vitamina E

Es una vitamina liposoluble cuya fórmula molecular

es C₂₉H₅₀O₂ (PM = 430.69 g·mol⁻¹) y está constituida por ocho compuestos diferentes, cuatro de ellos conocidos como tocoferoles α, β, γ y δ (figura 1). Una de las principales funciones de esta vitamina se asocia a su poder antioxidante, que protege a los tejidos de los efectos nocivos de las toxinas ambientales y previene el envejecimiento celular. Igualmente, protege a las membranas biológicas, a los nervios, músculos y sistema cardiovascular, y ayuda al organismo a alcanzar un uso óptimo de la vitamina A (Fruton y Simmons, 1961).

Las propiedades antioxidantes de esta molécula se relacionan con la presencia del grupo hidroxilo enlazado al carbono C-6 del anillo aromático (Carrasquero y col., 1998), en el cual la unión hidrógeno-oxígeno puede sufrir una fractura homolítica, con la producción de un radical sobre el anillo bencénico, que se estabiliza por medio de la resonancia del electrón no compartido y de esta forma reduce la velocidad de iniciación o propagación de la reacción en cadena (Cortez, 1998).

Los aceites provenientes del germen de maíz o trigo y de las semillas de girasol constituyen fuentes naturales de vitamina E; no obstante, los procesos de extracción y refinación pueden destruir esta vitamina lo que hace a los aceites refinados más susceptibles al deterioro por rancidez. Por esta razón se incorporan antioxidantes sintéticos, con el consecuente riesgo para la salud de quienes consuman estos productos. Por ello, es importante para la industria aceitera poder cuantificar con precisión y exactitud convenientes los niveles de tocoferoles presentes en los aceites refinados.

Cuantificación de la Vitamina por el Método Colorimétrico de Emmeric-Engel (Tsen, 1961).

Este método se emplea para la determinación de tocoferoles totales y se basa en la capacidad reductora de estos compuestos orgánicos. Los tocoferoles presentes en una muestra de aceite son extraídos y

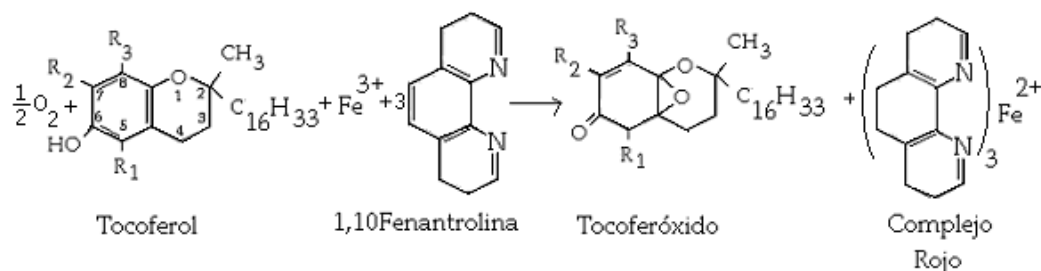


Figura 2. Reacción redox para la determinación de vitamina E

purificados de otros compuestos reductores y luego tratados con una solución estándar de iones férricos que contiene además un exceso de 1,10-Fenantrolina (figura 2). Los iones ferrosos producidos por la reducción del Fe³⁺ se complejan con la fenantrolina para producir un ión complejo soluble de color rojo, cuya concentración es directamente proporcional al contenido inicial de tocoferoles totales en el aceite analizado. De allí que éste sea un método indirecto para la cuantificación de la vitamina E (Quaife y Harris, 1948).

Aun cuando es un método analítico desarrollado hace muchos años, que en la actualidad ha sido sustituido por métodos cromatográficos más avanzados, desde un punto de vista didáctico es muy adecuado para que el alumno adquiera conocimientos sobre los procesos redox presentes en la naturaleza y su utilidad en la cuantificación de sustancias de interés. Asimismo, los reactivos y equipos requeridos son poco sofisticados, de relativo bajo costo y de amplio uso en los laboratorios de química analítica de muchas universidades.

La presencia de otras sustancias reductoras en el aceite, tales como carotenoides, colorantes sintéticos, etcétera, pueden afectar el resultado de la determinación, por lo que deben ser eliminadas; para esto existen distintos métodos como la destilación, hidrogenación, cromatografía preparativa y lavado con ácidos. Estos métodos deben ser discutidos por los alumnos a fin de establecer las ventajas y desventajas de cada uno en cuanto a eficiencia, costo y posibilidad de realización en función a las condiciones de cada laboratorio. Desde un punto de vista didáctico, esta etapa de purificación ofrece al alumno la oportunidad de adquirir conocimientos en cuanto al efecto de las interferencias en una determinación analítica y de los métodos químicos y físicos disponibles para reducir el efecto negativo de estas sustancias.

Un componente importante de la experiencia didáctica se relaciona con los cálculos que se realizan para presentar los resultados. Es necesario que el alumno reconozca que toda medición lleva asociado un error (Spiridonov y Lopatkin, 1973) que se cuantifica a través de procedimientos matemáticos y estadísticos.

En ese sentido, se hace uso de una recta de calibración y partir de su ecuación de regresión se determina el contenido total de vitamina en una muestra de aceite, de acuerdo con los siguientes procedimientos: La pendiente (b) y ordenada en el

origen (a) de la ecuación de regresión se obtienen de las siguientes ecuaciones (Miller y Miller, 1993):

$$b = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (1)$$

Para establecer el error de los valores de b y a, se en primer lugar el estadístico S_{x/y} aplicando la ecuación (3):

$$S_{x/y} = \left[\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right] \quad (3)$$

El numerador representa la sumatoria del cuadrado de los residuales de y_i, es decir, la diferencia entre el valor medido (y_i) y el que se obtiene de aplicar la ecuación de la recta (\hat{y}_i). El número de patrones empleados para la recta de calibración está representado por n. Los errores de la pendiente y el intercepto, Sb y Sa, se obtienen por las siguientes ecuaciones:

$$Sb = \frac{S_{x/y}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (4) \quad Sa = S_{x/y} \sqrt{\frac{\sum_i (x_i)^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (5)$$

La ecuación de regresión toma la siguiente forma:

$$\text{Absorbancia} = (b \pm t_{\alpha} Sb) \frac{\text{mg Vit.E}}{14\text{g aceite}} + (a \pm t_{\alpha} Sa) \quad (6)$$

A partir de estos cálculos, el alumno debe determinar la concentración de vitamina E. El error asociado a dicha concentración (S_x) se calcula con la ecuación (7).

$$S_x = \frac{S_{x/y}}{b} \left[\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (7)$$

El valor de m corresponde al número de repeticiones realizadas; x e y representan la concentración de vitamina E en el aceite y la absorbancia. Cuando el alumno ejecute todos los cálculos, debe representar el resultado tomando en cuenta el intervalo de confianza, el cual se determina de la manera usual, por medio del estadístico “t de student” para n-2 grados de libertad y una probabilidad α.

CÓMO SE EXPERIMENTA

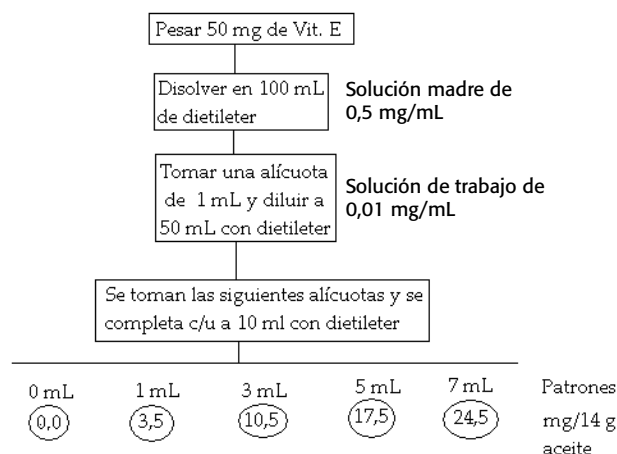


Figura 3. Pasos para la preparación de los patrones de la recta de calibración.

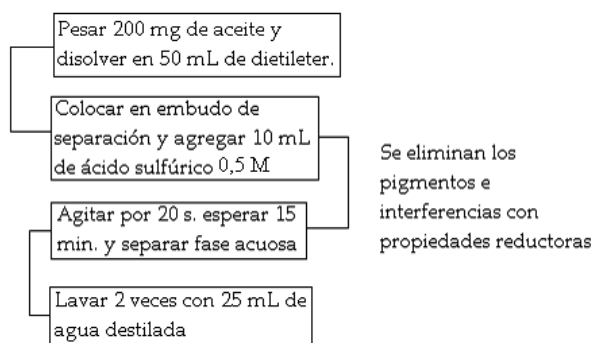


Figura 4. Preparación y purificación de la muestra.

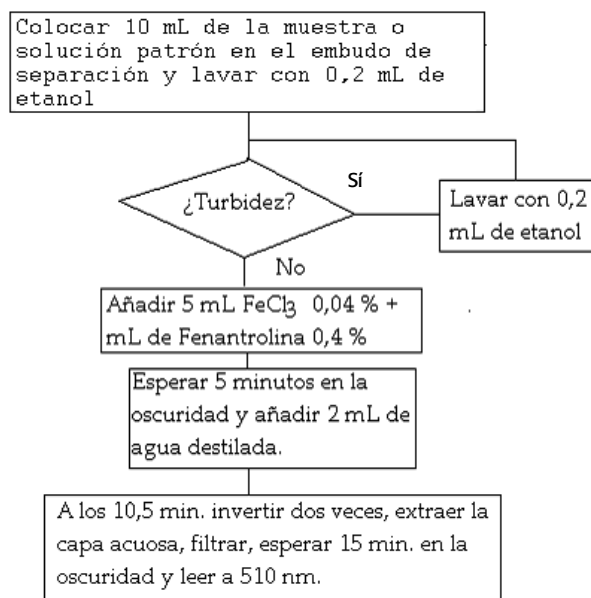


Figura 5. Desarrollo del color y cuantificación.

Etapa II: Ejecución del análisis de vitamina E en una muestra de aceite vegetal comercial

Es recomendable que la muestra que analicen los alumnos sea un aceite comercial que usen en sus casas y que señale en su composición el contenido de vitamina E. Para la recta de calibración se puede emplear una mezcla de tocoferoles grado analítico comercial pero debido a su elevado costo, puede sustituirse por una cápsula de vitamina E que se expende en las farmacias locales. Estas cápsulas con un contenido de vitamina E de 400 mg fueron empleadas para este trabajo.

El procedimiento se divide en tres partes. En la primera (figura 3) se preparan los patrones para la curva de calibración. Posteriormente (figura 4) la muestra de aceite es disuelta en éter y tratada con ácido sulfúrico para extraer los pigmentos hidrosolubles y otras sustancias interferentes. En la última etapa (figura 5), tanto los patrones como la muestra tratada se hacen reaccionar con la mezcla de cloruro férrico y 1,10-Fenantrolina para producir el complejo rojo, cuya absorbancia se mide a $\lambda = 510$ nm en un espectrofotómetro Spectronic 20 u otro adecuado. Es necesario señalar que el 100% de transmitancia debe ajustarse con la solución que no contiene vitamina E, ya que es posible que el ión Fe^{3+} se reduzca fotoquímicamente a ión Fe^{2+} ; por esta razón, el desarrollo del color debe realizarse en la oscuridad y se puede emplear ácido fosfórico a fin de complejar al F^{3+} .

Etapa III: Presentación de resultados

Una vez que los alumnos han ejecutado las determinaciones, se procede a la presentación de resultados, para lo cual se deben realizar los cálculos señalados en la primera etapa de esta experiencia didáctica.

Ejecución de la experiencia didáctica

A fin de ejemplificar la aplicación de esta experiencia didáctica, se presentan los resultados del análisis de vitamina E realizados por un equipo de dos estudiantes del curso Proyecto en Química Aplicada. El análisis se realizó sobre una muestra de aceite comestible de girasol con un contenido indicado de vitamina E de 12 mg/14 g de aceite.

Recta de calibración

La recta de calibración presenta un coeficiente de correlación significativo ($\alpha = 0.05$) con una ordenada en el origen igual a cero, por lo que se puede afirmar que se cumple con la Ley de Beer-Lambert en el intervalo de concentraciones evaluado. Para calcular

la pendiente (*b*) y la ordenada en el origen (*a*) se utilizaron los datos del cuadro 1, y se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 6.

Al aplicar las ecuaciones (1) y (2) se obtienen los siguientes valores $b = 0,026$ y $a = 0,005$. Para determinar los errores asociados se hace uso de los datos mostrados en el cuadro 2. La columna identificada como, corresponde a los valores de absorbancia que se obtienen sustituyendo las concentraciones de vitamina E en la ecuación $\hat{y}_i = 0,026 [\text{Vit. E}] + 0,005$.

Al calcular el estadístico $S_{x/y}$ se tiene:

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{8,4 \cdot 10^{-4}}{(5-2)}} = 0,017,$$

con este resultado se pueden calcular los errores de *a* (*S_a*) y *b* (*S_b*) de la siguiente forma:

$$S_b = \frac{0,017}{\sqrt{401,8}} = 8 \times 10^{-4} \quad S_a = 0,017 \sqrt{\frac{1029}{5(401,8)}} = 0,012$$

Por lo tanto, la ecuación de la recta de calibración es:

$$\text{Absorbancia} = (0,026 \pm 0,003) \frac{\text{mg Vit. E}}{14 \text{ g aceite}} + (0,005 \pm 0,038)$$

Los límites de confianza fueron calculados utilizando un valor de $t = 3,18$ para tres grados de libertad ($\alpha = 0,05$).

Cálculo de la concentración de vitamina E en la muestra de aceite

Los resultados del análisis de vitamina E se presentan en el cuadro 3; los valores de transmitancia son convertidos en absorbancias utilizando la ecuación: $A = -\text{Log}(I)$

Primer caso: Una sola determinación. Aquí se considera que se ha realizado una sola medición, por lo que $m = 1$. La absorbancia obtenida fue de 0.357. Se obtiene un contenido de vitamina E igual a $\frac{\text{mg Vit E}}{14 \text{ g aceite}} = \frac{0,354}{0,026} = 13,6$

El error asociado a esta concentración se obtiene por medio de la ecuación (7):

$$S_x = \frac{0,017}{0,026} \sqrt{\left[\frac{1}{1} + \frac{1}{5} + \frac{(0,357)^2}{(0,0026)^2(401,8)} \right]} = 0,8$$

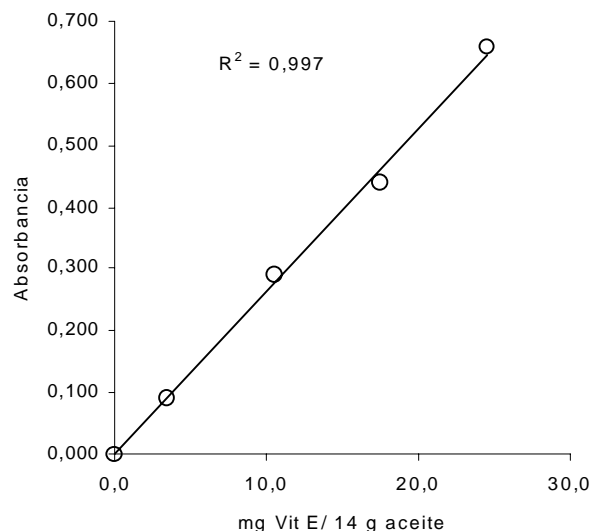


Figura 6. Recta de calibración para la determinación colorimétrica de vitamina E.

Cuadro 1. Datos para el cálculo de *a* y *b*.

mg Vit. E / 14 g aceite	Absorbancia	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]$	$(x_i - \bar{x})^2$
0.0	0.000	-11.2	-0.296	3.315	125.44
3.5	0.090	- 7.7	-0.206	1.586	59.29
10.5	0.290	- 0.7	-0.006	0.004	0.49
17.5	0.440	6.3	0.144	0.907	39.69
24.5	0.658	13.3	0.362	4.815	176.89
			Σ	10.627	401.80

Cuadro 2. Datos para el cálculo de los errores asociados a *b* y *a*.

mg Vit. E / 14 g aceite	\hat{y}_i	$y_i = \text{Absorbancia}$	$y_i - \hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
0.0	0.000	0.000	0.000	0,000
3.5	0.096	0.090	0.006	$3,6 \cdot 10^{-5}$
10.5	0.278	0.290	0.012	$1,4 \cdot 10^{-4}$
17.5	0.460	0.440	0.020	$4,0 \cdot 10^{-4}$
24.5	0.642	0.658	0.016	$2,6 \cdot 10^{-4}$
		Σ	0.054	$8,4 \cdot 10^{-4}$

Cuadro 3. Resultados experimentales.

Muestra	Transmitancia	Absorbancia
1	0.44	0.357
2	0.46	0.337
3	0.43	0.367
	Media	0.354

Finalmente, la concentración de vitamina E en el aceite es: 13.7 ± 0.8 mg/14 g aceite.

Segundo caso: Múltiples determinaciones. El análisis se realizó por triplicado y se obtuvo una absorbancia promedio de 0,354. Se deduce que el contenido de la vitamina es:

$$\frac{\text{mg Vit. E}}{14\text{g aceite}} = \frac{0.354}{0.0026} = 13.6.$$

Para el cálculo el error (S_x) se debe tener en cuenta que $m = 3$. Por lo tanto:

$$S_x = \frac{0,017}{0,026} \sqrt{\left[\frac{1}{3} + \frac{1}{5} + \frac{(0,354)^2}{(0,026)^2 (401,8)} \right]} = 0,7$$

En este caso se debe informar un contenido de vitamina E igual a 13.6 ± 0.7 mg/14 g de aceite. Si se comparan ambos resultados, el alumno puede observar que al hacer múltiples repeticiones de la determinación, se obtiene un error menor que en el caso de hacer una única determinación. Esto se refleja en el coeficiente de variación ($CV = \frac{S_x}{\bar{X}} * 100$), que en el primer caso es del 5.8%, mientras que en el análisis múltiple disminuye hasta 5.1%, con lo que se logra una mayor precisión.

En ambos casos se obtienen valores muy cercanos al señalado por el fabricante (12 ± 1 mg/14 g). Todo esto permite iniciar en el aula una discusión sobre los conceptos de precisión, exactitud y el efecto que sobre ellas tiene la ejecución correcta o incorrecta de la técnica. Es decir, los estudiantes deben hacer una lista de las posibles fuentes de errores determinados e indeterminados en este tipo de análisis.

La práctica de laboratorio debe concluirse con un informe donde los estudiantes expongan sus resultados y analicen de manera crítica las cualidades y defectos del método analítico y propongan otros que pudieran emplearse para el mismo propósito. En nuestro caso, los alumnos presentaron, ante el resto de sus compañeros, un seminario donde expusieron su trabajo y respondieron las preguntas formuladas por el docente y los alumnos. Esta última

fase es muy importante para lograr la integración del grupo ya que permite que todos reciban la información de los trabajos realizados por distintos grupos.

Conclusiones

Con la realización de esta experiencia didáctica, los alumnos adquieren un conocimiento más profundo sobre las propiedades antioxidantes de la vitamina E, los principios y técnicas del análisis espectrofotométrico, así como las operaciones básicas del laboratorio de química analítica. Además, el uso de procedimientos matemáticos para la presentación de resultados contribuye a promover la necesidad de indicar en cada resultado la magnitud del error cometido y el efecto de este error en la calidad del resultado.

Asimismo se busca ofrecer a los estudiantes y profesores de química analítica básica e instrumental una actividad de laboratorio que consume poco tiempo y recursos, pero que da la oportunidad de enfrentarse al análisis de una muestra real en la que es necesario ejecutar tratamientos previos de purificación y aislamiento de la sustancia de interés. ■

Referencias bibliográficas

- Carrasquero, A. M. Salazar y P.B. Navas, Antioxidant properties of a grape fruit seed extract on vegetable oils, *J. Sci. Food. Agric.*, **77**, 463-467, 1998.
- Cortez, L. (1998). *Bioquímica fundamental*. FPUVA-UCV, Caracas, 1998, 851 p.
- Fruton, J.S. y S. Simmonds. *General Biochemistry*. John Wiley and Sons, London, 1961, 1077 p.
- Miller, J.C. y J.N. Miller, *Estadística para química analítica*. Addison Wesley Iberoamericana. 2da. edición. México, 1993, 211 p.
- Quaife, M. y P. Harris, Chemical assay of foods for vitamin E content, *Analytical Chemistry*, **20**(12) 1221-1224, 1948.
- Spiridonov, V.P. y A.A. Lopatkin, *Tratamiento matemático de datos físico-químicos*. Editorial Mir, Moscú, 1973, 207 p.
- Tsen, H., An improved spectrophotometric method for the determination of tocopherols using 4,7-diphenyl-1,10-Phenanthroline, *Analytical Chemistry*, **33**(7) 849-852, 1961.