

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

"ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À REDAÇÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA POR LÚCIA HELENA SERON E APROVADO PELA COMISSÃO
JULGADORA"

Campinas, 09 de Abril de 1991

Contreras

PROF.DR. EMILIO S. CONTRERAS GUZMÁN

DETERMINAÇÃO DE Fe^{2+} E ÁCIDO ASCÓRBICO
E SUAS INTERAÇÕES EM SISTEMAS MODELO E
NATURAL (SUCO DE LARANJA CONCENTRADO)

TESE DE DOUTORADO

LÚCIA HELENA SERON

ORIENTADOR: PROF. DR. EMILIO S. CONTRERAS GUZMÁN (FEA)

CAMPINAS

- 1991 -

8649103778
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Dedico

*ao Gustavo e à Roberta,
meus tesouros muito amados.*

aos meus pais.

ao Júlio.

AGRADECIMENTOS

À UNICAMP por ter me dado essa oportunidade.

Ao Instituto de Química da UNICAMP por ter me aceito como aluna de Mestrado e Doutorado.

À FEA (Faculdade de Engenharia de Alimentos) da UNICAMP por ter me concedido o apoio e material necessários (reagentes, laboratórios e pessoal) para o desenvolvimento dessa Pesquisa.

Ao CNPq e à CAPES pelas bolsas de estudo concedidas.

Ao Prof. Dr. Cesar Ciacco da FEA e à Fundação Atlantic pela Bolsa-prêmio concedida a esse trabalho.

Ao FAP - UNICAMP pela aprovação do Projeto Individual referente ao ensaio biológico.

Ao pessoal da FEA com quem convivi durante esses anos, em especial à Lucilene, Judite, Elizabete, Silney, Lúcia, Cáritas, Aracilda e Margarete.

À Ana Maria, Ana Lourdes e Alice do Laboratório de Tecnologia da FEA por terem me permitido fazer a digestão e a calcinação de amostras.

À Eliete e à Liana, cuja ajuda imprescindível nos possibilitou a realização do ensaio biológico e ao Dr. Sgarbieri pelas sugestões.

À Flávia pela análise estatística.

Ao pessoal do Instituto de Química com quem convivi durante esse período, em especial ao Sebastião, Nívea, Raquel, Sônia, Paulo, Dena, Iraídes, Paulo, Patrício, Lorena, Efraim e Fontana.

Aos meus professores da Química e da FEA, pelo conhecimento transmitido.

À Prof.^a Dr.^a Carol H. Collins pela compreensão e pela ajuda na redação da Tese.

Ao Prof. Dr. Nivaldo Baccan pela leitura de soluções no espectrofotômetro de absorção atômica.

Ao pessoal das Secretarias da Química e da FEA.

Ao pessoal da Biblioteca da FEA e ao pessoal da Biblioteca da Química, em especial ao Toninho.

À Sandra Furtado e à Eliana Badiale pela amizade.

Ao Departamento de Química da UFSCar, São Carlos, pelos afastamentos concedidos para a conclusão desse trabalho.

Aos professores da UFSCar que de alguma forma me ajudaram, em especial à Fátima Manzano pelo apoio e amizade.

À Vânia pela amizade e pelas caronas.

Aos funcionários da UFSCar, em especial às Secretárias, à dona Lindinha e ao Ricardo.

À Sílvia Janzon pela datilografia e pela dedicação.

Ao Everaldo pelos desenhos e pela dedicação.

Ao Laurindo e à Iara pelo xerox e pela amizade.

Ao Júlio pela compreensão e pelo carinho.

Em especial:

Agradeço ao meu Orientador, Prof. Dr. Emilio S. Contreras Guzmán, pela dedicação e pelo espírito de pesquisa que, diante das dificuldades e tristezas não esmoreceu, mas continuou lutando pela vida e pelo trabalho. Agradeço-lhe pela orientação, pela ajuda, pela compreensão e pela amizade.

Agradeço a Deus, acima de tudo, que me deu vida e forças para chegar até aqui; com Ele tudo é possível.

RESUMO

Com o objetivo de conhecer as interações entre ácido ascórbico e Fe^{2+} , a ser adicionado a suco de laranja concentrado, estudou-se a determinação desses compostos em soluções individuais e juntos na mesma solução, variando-se as condições do meio para avaliar suas interferências. As determinações de ácido ascórbico e Fe^{2+} foram feitas pelo método da redução de íons cúpricos com cuproína enquanto somente os íons ferrosos foram determinados usando orto-fenantrolina. O sistema de uma fase nas determinações se mostrou vantajoso em simplicidade, rapidez e sensibilidade.

Os experimentos de adição de sulfato ferroso ao suco de laranja e a estocagem mostraram que a adição não causa alterações indesejáveis no suco, se o mesmo for estocado refrigerado ou congelado. Um ensaio biológico com o suco fortificado mostrou a importância da ingestão simultânea de ácido ascórbico (vitamina C) e ferro, para aumentar a absorção do ferro não-heme.

ABSTRACT

In order to study the interactions between ascorbic acid and Fe^{2+} , that might be added to concentrated orange juice, these compounds were determined separately and together in the same solution, varying the conditions of the medium to evaluate interferences.

The determinations of ferrous ions and ascorbic acid were made using the reduction of cupric ions with cuproine while iron alone was determined using ortho-phenanthroline. The system with only one phase showed improvement in simplicity, rapidity and sensitivity.

The addition of ferrous sulfate to orange juice with subsequent storage showed that the addition did not cause undesirable alterations in the juice if it was stored refrigerated or frozen.

A biological assay with the fortified juice showed the importance of the simultaneous ingestion of ascorbic acid (vitamin C) and iron to improve the absorption of non-heme iron.

NOTAÇÃO E DEFINIÇÃO DE TERMOS

H₂A ácido ascórbico, símbolo utilizado na literatura.

H₂Asc ácido ascórbico, símbolo utilizado em nosso trabalho.

ϵ' coeficiente de absortividade molar condicional, utilizado em nosso trabalho para comparação com o ϵ encontrado na literatura.

Hgb hemoglobina.

depleção período em que se força o abaixamento da taxa de hemoglobina do sangue, por dieta isenta de ferro.

repleção período em que se fornece ferro na dieta para a recuperação da taxa normal de hemoglobina do sangue.

biodisponibilidade quantidade de um nutriente que é digerido, absorvido e metabolizado pelo organismo.

suco liofilizado suco de laranja submetido a um processo de retirada total de água sob vácuo e baixa temperatura.

ÍNDICE

	Página
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	01
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
II.1. Ácido Ascórbico: estrutura e propriedades.....	05
II.1.1. Importância nutricional.....	05
II.1.2. Reações do ácido ascórbico.....	10
II.1.2.1. Reações de redução por ácido ascórbico por transferência de um elétron.....	13
II.1.2.2. Reações de redução por ácido ascórbico por transferência de dois elétrons.....	16
II.1.2.3. Reação de oxidação do ácido ascórbico por íons metálicos: Fe^{3+} e Cu^{2+}	18
II.2. Métodos Analíticos para a Determinação de Ácido Ascórbico.....	20
II.2.1. Métodos que utilizam as propriedades redutoras do ácido ascórbico.....	20
II.2.2. Métodos eletroquímicos.....	23
II.2.3. Métodos cromatográficos.....	24
II.2.3.1. Cromatografia em camada delgada.....	24
II.2.3.2. Cromatografia em fase gasosa.....	25
II.2.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	25
II.2.4. Método de redução de íons cúpricos.....	26

II.2.5. Reagentes específicos para cobre: cuproína, neo cuproína e batocuproína.....	29
II.3. Formação de Complexo entre Ácido Ascórbico e Ferro	31
II.4. Ferro.....	33
II.4.1. Importância nutricional e absorção.....	33
II.4.2. Quantidade diária recomendada.....	37
II.5. Métodos de Determinação de Ferro.....	38
II.5.1. Métodos colorimétricos.....	38
II.5.2. Titulação potenciométrica de óxi-redução.....	40
II.5.3. Absorção atômica.....	41
II.5.4. Emissão atômica.....	41
 CAPÍTULO III - PARTE EXPERIMENTAL.....	 43
III.1. Material.....	44
III.1.1. Instrumental.....	44
III.1.2. Material de vidro.....	45
III.1.3. Reagentes.....	46
III.1.4. Amostras de suco de laranja.....	47
III.1.5. Material utilizado para o ensaio biológico....	47
III.2. Métodos.....	49
III.2.1. Preparo de soluções.....	49
III.2.2. Determinações analíticas.....	52
III.2.2.1. Determinação de ácido ascórbico por redução de Cu^{2+} em sistema bifásico.....	52

III.2.2.2. Determinação de Fe^{2+} por redução de Cu^{2+} em sistema bifásico.....	54
III.2.2.3. Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} em sistema bifásico.....	55
III.2.2.4. Adaptação do sistema bifásico para um sistema monofásico.....	56
III.2.2.5. Determinação de ácido ascórbico e de Fe^{2+} por redução de Cu^{2+} em um sistema de uma fase...	57
III.2.2.6. Determinação da concentração de cobre com <u>cu</u> proína por redução com hidroxilamina.....	59
III.2.2.7. Determinação de Fe^{2+} pelo método da orto-fenantrolina.....	60
III.2.3. Estudos da formação de complexo entre ácido ascórbico e Fe^{2+} com soluções puras.....	62
III.2.3.1. Experimentos preliminares para acerto de <u>con</u> dições.....	62
III.2.3.2. Experimentos para estimativa da porcentagem de complexo entre Fe^{2+} e H_2Asc em tampão acetato....	63
III.2.3.3. Experimentos para estimativa da porcentagem de complexo entre Fe^{2+} e H_2Asc em um tampão misto acetato-citrato.....	65
III.2.4. Estudos em um sistema natural: suco de laranja concentrado.....	66
III.2.4.1. Determinação da acidez total (expressa como ácido cítrico) do suco de laranja concentrado	66

III.2.4.2. Determinação da concentração de ácido ascórbico (vitamina C) do suco de laranja concentrado.....	66
III.2.4.3. Determinação da concentração de ferro no suco de laranja concentrado.....	67
III.2.4.4. Preparo de suco de laranja enriquecido com Fe^{2+} (sulfato ferroso) para estudos de estocagem.....	68
III.2.4.5. Determinação do teor de vitamina C, da mistura de vitamina C e Fe^{2+} e do Fe^{2+} no suco de laranja durante a estocagem.....	69
III.2.4.6. Determinação da concentração de Fe^{2+} do suco durante a estocagem.....	71
III.2.4.7. Estudo dos pigmentos do suco de laranja (carotenóides) antes e após a estocagem.....	72
III.2.4.8. Determinação da concentração de vitamina C (ácido ascórbico) no suco de laranja liofilizado.....	73
III.2.4.9. Determinação da concentração de ferro no suco de laranja liofilizado.....	73
III.2.5. Ensaio biológico: efeito da vitamina C (ácido ascórbico) sobre a biodisponibilidade de Fe^{2+} na repleção da hemoglobina de ratos anêmicos..	73
III.2.5.1. Métodos de análise.....	76

	Página
CAPÍTULO IV - RESULTADOS.....	77
IV.1. Estudos em Sistema Bifásico.....	78
IV.2. Estudos em Sistema de Uma Fase.....	86
IV.3. Estudos de Formação de Complexo entre Ácido Ascó <u>r</u> bico e Fe^{2+} no Sistema de Uma Fase.....	110
IV.4. Estudos em um Sistema Natural: Suco de Laranja Concentrado.....	118
IV.5. Ensaio Biológico.....	149
 CAPÍTULO V - DISCUSSÃO.....	 166
V.1. Determinação de Ácido Ascó <u>r</u> bico, de Fe^{2+} e de Mistu <u>r</u> ras Equimolares de Ambos em Sistema Bifásico.....	167
V.2. Estudos do Meio de Reação (Sistema de Uma Fase)...	171
V.2.1. Concentração do etanol.....	171
V.2.2. Influência da concentração dos tampões na reação de redução de íons cúpricos.....	173
V.2.3. Influência da adição de NaCl e formulação do tam <u>p</u> pão definitivo.....	175
V.2.4. Estudos da velocidade de reação do ácido ascó <u>r</u> bi <u>c</u> o e do Fe^{2+} com Cu^{2+}	176
V.3. Determinação de Ácido Ascó <u>r</u> bico, de Fe^{2+} e de Mis- turas Equimolares de Ambos em Sistema de Uma Fase, pela Reação de Redução de Íons Cúpricos.....	178
V.4. Formação do Complexo Ferro-Ácido Ascó <u>r</u> bico.....	181

	Página
V.4.1. Estimativa de formação do complexo levando em <u>con</u> ta as perdas dos componentes por oxidação.....	183
V.5. Experimentos de Estocagem do Suco de Laranja Con- centrado Adicionado de Fe^{2+}	186
V.6. Evolução dos Pigmentos no Suco Estocado com e sem Adição de Fe^{2+}	192
V.7. Ensaio Biológico.....	196
V.8. Escolha do Melhor Procedimento Experimental.....	198
CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES.....	199
APÊNDICE.....	203
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	217

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 01 - Estudo do efeito do pH na determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema bifásico) em tampão acetato 0,50 M.....	78
Tabela 02 - Estudo do efeito do pH na determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema bifásico) em tampão citrato 0,50 M.....	85
Tabela 03 - Estudo do efeito do pH na determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema bifásico) em tampão metafosfato 0,50 M.....	85
Tabela 04 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão acetato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 2,65.....	86
Tabela 05 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão acetato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 4,65.....	96

Tabela 06 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão acetato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 6,00.....	96
Tabela 07 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão citrato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 2,65.....	97
Tabela 08 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão citrato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 4,65.....	97
Tabela 09 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão citrato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 6,00.....	98
Tabela 10 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão metafosfato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 2,65.....	98
Tabela 11 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão metafosfato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 4,65.....	99

Tabela 12 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão metafosfato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 6,00.....	99
Tabela 13 - Influência da concentração de etanol na absorvância da reação entre ácido ascórbico ($2,50 \times 10^{-3}$ M) e Cu^{2+} em tampão acetato $2,50 \times 10^{-2}$ M.....	108
Tabela 14 - Influência da concentração de etanol na absorvância da reação entre Fe^{2+} ($2,5 \times 10^{-3}$ M) e Cu^{2+} em tampão acetato $2,50 \times 10^{-2}$ M...	109
Tabela 15 - Influência da concentração de etanol na absorvância da reação entre ácido ascórbico ($2,50 \times 10^{-3}$ M) e Cu^{2+} em tampão citrato $2,50 \times 10^{-2}$ M.....	111
Tabela 16 - Influência da concentração de etanol na absorvância da reação entre Fe^{2+} ($2,50 \times 10^{-3}$ M) e Cu^{2+} em tampão citrato $2,50 \times 10^{-2}$ M...	112
Tabela 17 - Estimativa da porcentagem de complexo entre H_2Asc e Fe^{2+} através da diminuição da absorvância (relativa ao complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$) em função do tempo de reação, de soluções individuais de H_2Asc , de Fe^{2+} e de misturas equimolares ($2,50 \times 10^{-4}$ M) de ambos. Valo-	

res de absorbância a 545 nm. Em tampão acetato ($2,50 \times 10^{-2}$ M).....	114
Tabela 18 - Estimativa da porcentagem de complexo entre H_2Asc e Fe^{2+} através da diminuição da absorbância (relativa ao complexo $[Cu(cuproína)_2]^+$ em função do tempo de reação, de soluções individuais de H_2Asc , de Fe^{2+} e de misturas equimolares de ambos. Valores de absorbância a 545 nm. Em tampão misto (acetato $2,50 \times 10^{-2}$ M/citrato $3,125 \times 10^{-3}$ M/NaCl $6,0 \times 10^{-2}$ M).....	120
Tabela 19 - Experimento de Estocagem 1. Efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre a $[H_2Asc]$ e a $[Fe^{2+}]$ do suco de laranja concentrado adicionado de ferro. Valores de absorbância a 545 nm. Amostras Ia a IVa: temperatura ambiente; amostras Ib a IVb: $T = + 5,0^\circ C$; amostras Ic a IVc: $T = - 18,0^\circ C$...	126
Tabela 20 - Experimento de Estocagem 2. Efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre a $[H_2Asc]$ e a $[Fe^{2+}]$ de suco de laranja concentrado adicionado de ferro. Valores de absorbância a 545nm. Amostras Ia a IVa: temperatura ambiente; amostras Ib a IVb: $T = +5,0^\circ C$; amostras Ic a IVc: $T = -18,0^\circ C$	131

- Tabela 21 - Experimento de Estocagem 2. Efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre a $[Fe^{2+}]$ do suco de laranja concentrado adicionado de ferro. Valores de absorbância a 510 nm. Amostras Ia a IVa: temperatura ambiente; amostras Ib a IVb: $T = +5,0^{\circ}C$; amostras Ic a IVc: $T = -18,0^{\circ}C$ 132
- Tabela 22 - Perdas de vitamina C e Fe^{2+} (expressas em absorbância e em porcentagem) do suco de laranja sem e com ferro em várias relações molares estocado à temperatura ambiente por 49 dias. As perdas correspondem às diferenças de absorbância entre o primeiro dia e o dia considerado..... 137
- Tabela 23 - Perdas de vitamina C e Fe^{2+} (expressas em absorbância e em porcentagem) do suco de laranja sem e com ferro em várias relações molares estocado sob refrigeração a $+ 5,0^{\circ}C$ por 49 dias. As perdas correspondem às diferenças de absorbância entre o 1º dia e o dia considerado..... 138
- Tabela 24 - Perdas de vitamina C e Fe^{2+} (expressas em absorbância e em porcentagem) do suco de laranja sem e com ferro em várias relações molares estocado sob congelação a $- 18,0^{\circ}C$

por 49 dias. As perdas correspondem às diferenças de absorbância entre o 1º dia e o dia considerado.....	139
Tabela 25 - Conversão das leituras de Fe^{2+} feitas por o-fenantrolina (510 nm) para 2,2'-biquinolina (545 nm).....	140
Tabela 26 - Variação da absorbância dos carotenóides do suco de laranja com e sem adição de Fe^{2+} armazenado congelado a $-18,0^{\circ}C$, por 49 dias.	146
Tabela 27 - Variação da absorbância dos carotenóides do suco de laranja com e sem adição de Fe^{2+} armazenado à temperatura ambiente, por 49 dias.	147
Tabela 28 - Variação da absorbância dos pigmentos da fração aquosa do suco de laranja armazenado à temperatura ambiente por 49 dias.....	148
Tabela 29 - Divisão dos ratos em grupos de acordo com o peso.....	149
Tabela 30 - Dosagem de hemoglobina dos ratos (g/100 mL) a 540 nm (início do experimento).....	150
Tabela 31 - Dosagem da hemoglobina dos ratos (g/100 mL) a 540 nm no final da fase de depleção.....	151
Tabela 32 - Consumo de ração (g). Período de repleção (14 dias).....	152

Página

Tabela 33 - Consumo de ferro (mg). Período de repleção (14 dias).....	154
Tabela 34 - Repleção da hemoglobina. Período: 14 dias..	156
Tabela 35 - Repleção da hemoglobina.....	158
Tabela 36 - Biodisponibilidade de ferro de várias dietas. Período de repleção: 14 dias.....	162
Tabela A.01 - Estudo do efeito do pH na determinação de ácido ascórbico pela redução de íons cúpricos (sistema bifásico) em tampão acetato 0,50 M.....	204
Tabela A.02 - Estudo do efeito do pH na determinação de ácido ascórbico pela redução de íons cúpricos (sistema bifásico) em tampão citrato 0,50 M.....	204
Tabela A.03 - Estudo do efeito do pH na determinação de ácido ascórbico pela redução de íons cúpricos (sistema bifásico) em tampão metafosfato 0,50 M.....	205
Tabela A.04 - Estudo do efeito do pH na determinação de Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema bifásico) em tampão acetato 0,50 M....	205

Tabela A.05 - Estudo do efeito do pH na determinação de Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema bifásico) em tampão citrato 0,50 M....	206
Tabela A.06 - Estudo do efeito do pH na determinação de Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema bifásico) em tampão metafosfato 0,50 M	206
Tabela A.07 - Estudo do efeito do pH na determinação de ácido ascórbico pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão acetato 0,50 M.....	207
Tabela A.08 - Estudo do efeito do pH na determinação de ácido ascórbico pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão citrato 0,50 M.....	207
Tabela A.09 - Estudo do efeito do pH na determinação de ácido ascórbico pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M.....	208
Tabela A.10 - Estudo do efeito do pH na determinação de ácido ascórbico pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão citrato $2,5 \times 10^{-2}$ M.....	208

Tabela A.11 - Estudo do efeito do pH na determinação de ácido ascórbico pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão metafosfato $2,5 \times 10^{-2}$ M.....	209
Tabela A.12 - Estudo do efeito do pH na determinação de Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão acetato 0,50 M.	209
Tabela A.13 - Estudo do efeito do pH na determinação de Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M.....	210
Tabela A.14 - Estudo do efeito do pH na determinação de Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão citrato $2,5 \times 10^{-2}$ M.....	210
Tabela A.15 - Estudo do efeito do pH na determinação de Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão metafosfato $2,5 \times 10^{-2}$ M.....	211
Tabela A.16 - Determinação de Cu^{2+} por redução com hidroxilamina e complexação com cuproína em meio de tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M.....	211

Tabela A.17 - Determinação de Cu^{2+} por redução com hidroxilamina e complexação com cuproína em meio de tampão citrato $2,5 \times 10^{-2}$ M.....	212
Tabela A.18 - Curva padrão da determinação de Fe^{2+} com o-fenantrolina (sem utilizar hidroxilamina) em tampão acetato 0,50 M. Valores de absorbância a 510 nm.....	212
Tabela A.19 - Curva padrão da determinação de Fe^{2+} com o-fenantrolina (sem hidroxilamina) em tampão citrato 0,50 M. Valores de absorbância a 510 nm.....	213
Tabela A.20 - Curva padrão da determinação de Fe^{2+} com o-fenantrolina (usando hidroxilamina como redutor) em tampão acetato e em tampão citrato 0,50 M. Valores de absorbância a 510 nm.....	213
Tabela A.21 - Curva padrão da determinação de Fe^{2+} com o-fenantrolina (com hidroxilamina) em meio de HCl 2,0%. Valores de absorbância a 510 nm.....	214
Tabela A.22 - Curva padrão da determinação de Fe^{2+} com o-fenantrolina (com hidroxilamina) em meio de H_2SO_4 0,10 M. Valores de absorbância a 510 nm.....	214

- Tabela A.23 - Evolução da absorbância (relativa ao complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ em função do tempo de reação de uma mistura equimolar de ácido ascórbico e Fe^{2+} ($2,27 \times 10^{-4}$ M) em tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M..... 215
- Tabela A.24 - Evolução da absorbância (relativa ao complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ em função do tempo de reação de uma mistura equimolar de ácido ascórbico e Fe^{2+} ($2,27 \times 10^{-4}$ M) em tampão citrato $2,5 \times 10^{-2}$ M..... 216

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

- Figura 01 - Curvas de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$
 Determinação de ácido ascórbico em meio de
 tampão acetato 0,50 M em sistema bifásico.
 Efeito do pH..... 79
- Figura 02 - Curvas de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$
 Determinação de ácido ascórbico em meio de
 tampão citrato 0,50 M em sistema bifásico.
 Efeito do pH..... 80
- Figura 03 - Curvas de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$
 Determinação de ácido ascórbico em meio de
 tampão metafosfato 0,50 M em sistema bifási
 co. Efeito do pH..... 81
- Figura 04 - Curvas de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$
 Determinação de Fe^{2+} em meio de tampão ace-
 tato 0,50 M em sistema bifásico. Efeito do
 pH..... 82
- Figura 05 - Curvas de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$
 Determinação de Fe^{2+} em meio de tampão ci-
 trato 0,50 M em sistema bifásico. Efeito do
 pH..... 83

- Figura 06 - Curvas de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$
Determinação de Fe^{2+} em meio de tampão metafosfato em sistema bifásico. Efeito do pH.. 84
- Figura 07 - Curvas de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$
Determinação de ácido ascórbico em meio de tampão acetato 0,50 M em sistema de uma fase. Efeito do pH..... 87
- Figura 08 - Curvas de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$
Determinação de ácido ascórbico em meio de tampão citrato 0,50 M em sistema de uma fase. Efeito do pH..... 88
- Figura 09 - Curvas de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$
Determinação de ácido ascórbico em meio de tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M em sistema de uma fase. Efeito do pH..... 89
- Figura 10 - Curvas de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$
Determinação de ácido ascórbico em meio de tampão citrato $2,5 \times 10^{-2}$ M em sistema de uma fase. Efeito do pH..... 90
- Figura 11 - Curvas de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$
Determinação de ácido ascórbico em meio de tampão metafosfato $2,5 \times 10^{-2}$ M em sistema de uma fase. Efeito do pH..... 91

- Figura 12 - Curvas de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$
Determinação de Fe^{2+} em meio de tampão acetato 0,50 M em sistema de uma fase. Efeito do pH..... 92
- Figura 13 - Curvas de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$
Determinação de Fe^{2+} em meio de tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M em sistema de uma fase. Efeito do pH..... 93
- Figura 14 - Curvas de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$
Determinação de Fe^{2+} em meio de tampão citrato $2,5 \times 10^{-2}$ M em sistema de uma fase. Efeito do pH..... 94
- Figura 15 - Curvas de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$
Determinação de Fe^{2+} em meio de tampão metafosfato $2,5 \times 10^{-2}$ M em sistema de uma fase. Efeito do pH..... 95
- Figura 16 - Influência da concentração molar dos tampões acetato e citrato em pH 2,65, pH 4,65 e pH 6,00 na determinação de ácido ascórbico e de Fe^{2+} pela reação de redução de íons cúpricos..... 101
- Figura 17 - Influência da adição de NaCl ao tampão misto acetato/citrato ($2,50 \times 10^{-2}$ M / $3,125 \times 10^{-3}$ M) na determinação de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela reação de redução de íons cúpri

- cos em pH 2,65, 4,00, 4,65 e 6,00..... 102
- Figura 18 - Tempo de desenvolvimento da cor do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ na reação de ácido ascórbico com Cu^{2+} e de Fe^{2+} com Cu^{2+} em tampões de pH 4,65: acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M; acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M / NaCl $6,0 \times 10^{-2}$ M; acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M / citrato $3,125 \times 10^{-3}$ M e acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M / NaCl $6,0 \times 10^{-2}$ M / citrato $3,125 \times 10^{-3}$ M. $[\text{Ácido ascórbico}] = 1,25 \times 10^{-5}$ M; $[\text{Fe}^{2+}] = 2,5 \times 10^{-5}$ M..... 103
- Figura 19 - Curva de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ Determinação de Cu^{2+} por redução com hidroxilamina em meio de tampão acetato (ou citrato) $2,5 \times 10^{-2}$ M em pH de 1,65 a 6,00... 104
- Figura 20 - Determinação de Fe^{2+} com orto-fenantrolina (com hidroxilamina). Curva padrão em tampão acetato (ou citrato) 0,50 M pH 4,65..... 105
- Figura 21 - Determinação de Fe^{2+} com orto-fenantrolina (com hidroxilamina). Curva padrão em HCl 2,0%..... 106
- Figura 22 - Determinação de Fe^{2+} com orto-fenantrolina (com hidroxilamina). Curva padrão em H_2SO_4 0,10 M..... 107

- Figura 23 - Evolução da absorvância (relativa ao complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ da mistura equimolar de ácido ascórbico e Fe^{2+} ($2,27 \times 10^{-4}$ M) em função do tempo de reação em tampões acetato e citrato de sódio $2,5 \times 10^{-2}$ M..... 113
- Figura 24 - Evolução da absorvância (relativa ao complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ em função do tempo de soluções individuais de ácido ascórbico e de Fe^{2+} e da mistura equimolar ($2,5 \times 10^{-4}$ M) de ambos, em tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M, pH 2,65..... 115
- Figura 25 - Evolução da absorvância (relativa ao complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ em função do tempo de soluções individuais de ácido ascórbico e de Fe^{2+} e da mistura equimolar ($2,5 \times 10^{-4}$ M) de ambos, em tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M, pH 4,00..... 116
- Figura 26 - Evolução da absorvância (relativa ao complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ em função do tempo de soluções individuais de ácido ascórbico e de Fe^{2+} de mistura equimolar ($2,5 \times 10^{-4}$ M) de ambos, em tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M, pH 4,65..... 117

- Figura 27 - Formação do complexo $[\text{Fe}(\text{HAsc})]^+$ em tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M de pH 2,65, 4,00 e 4,65..... 119
- Figura 28 - Evolução da absorvância (relativa ao complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ em função do tempo de soluções individuais de ácido ascórbico e de Fe^{2+} e da mistura equimolar ($2,5 \times 10^{-4}$ M) de ambos, em tampão misto (acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M/citrato $3,125 \times 10^{-3}$ M/NaCl $6,0 \times 10^{-2}$ M), pH 2,65..... 121
- Figura 29 - Evolução da absorvância (relativa ao complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ em função do tempo de soluções individuais de ácido ascórbico e de Fe^{2+} e da mistura equimolar ($2,5 \times 10^{-4}$ M) de ambos, em tampão misto (acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M/citrato $3,125 \times 10^{-3}$ M/NaCl $6,0 \times 10^{-2}$ M), pH 4,00..... 122
- Figura 30 - Evolução da absorvância (relativa ao complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ em função do tempo de soluções individuais de ácido ascórbico e de Fe^{2+} e da mistura equimolar ($2,5 \times 10^{-4}$ M) de ambos, em tampão misto (acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M/citrato $3,125 \times 10^{-3}$ M/NaCl $6,0 \times 10^{-2}$ M), pH 4,65..... 123

- Figura 31 - Formação do complexo $[\text{Fe}(\text{HAsc})]^+$ em tampão misto (acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M/citrato $3,125 \times 10^{-3}$ M/NaCl $6,0 \times 10^{-2}$ M) de pH 2,65, 4,00 e 4,65..... 124
- Figura 32 - Experimento de Estocagem 1. Evolução da absorbância (545 nm) de suco de laranja com e sem adição de Fe^{2+} através da estocagem à temperatura ambiente por 55 dias..... 128
- Figura 33 - Experimento de Estocagem 1. Evolução da absorbância (545 nm) de suco de laranja com e sem adição de Fe^{2+} através da estocagem sob refrigeração a + 5,0°C por 55 dias..... 129
- Figura 34 - Experimento de Estocagem 1. Evolução da absorbância (545 nm) de suco de laranja com e sem adição de Fe^{2+} através da estocagem sob congelação a - 18,0°C por 55 dias..... 130
- Figura 35 - Experimento de Estocagem 2. Evolução da absorbância a 545 nm de suco de laranja com e sem adição de Fe^{2+} através da estocagem à temperatura ambiente por 49 dias..... 133
- Figura 36 - Experimento de Estocagem 2. Evolução da absorbância a 545 nm de suco de laranja com e sem adição de Fe^{2+} através da estocagem sob refrigeração a + 5,0°C por 49 dias..... 134

Figura 37 - Experimento de Estocagem 2. Evolução da absorvância a 545 nm do suco de laranja com e sem adição de Fe^{2+} através de estocagem sob congelação a $- 18,0^{\circ}C$ por 49 dias.....	135
Figura 38 - Perda de Fe^{2+} (%) em suco de laranja adicionado de sulfato ferroso durante a estocagem por 49 dias.....	141
Figura 39 - Perda de vitamina C do suco de laranja estocado à temperatura ambiente, a $+ 5,0^{\circ}C$ e a $- 18,0^{\circ}C$ durante 49 dias.....	142
Figura 40 - Espectro de absorção dos carotenóides de suco de laranja com e sem Fe^{2+} armazenado a $- 18,0^{\circ}C$ por 49 dias.....	143
Figura 41 - Espectros de absorção dos carotenóides de suco de laranja com e sem Fe^{2+} armazenado à temperatura ambiente por 49 dias.....	144
Figura 42 - Espectros de absorção dos pigmentos solúveis em água de suco de laranja com e em Fe^{2+} armazenado à temperatura ambiente por 49 dias	145
Figura 43 - Repleção da hemoglobina x ferro ingerido...	160
Figura 44 - Repleção da hemoglobina x tempo.....	161

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A deficiência de ferro da população brasileira é um dos casos de desnutrição mais longamente reconhecido pelo meio científico e pelas autoridades sanitárias, porém nunca resolvido. Ultimamente, face à deterioração do padrão alimentar médio, a carência de ferro atingiu uma frequência e intensidade alarmantes, constatada no dia-a-dia dos postos de saúde e hospitais.

Caso os governos estaduais ou federais venham a implementar os seus programas de alimentação institucional com medidas para reverter essa situação, uma das soluções viáveis seria fortificar algum alimento com ferro inorgânico. Nesse esquema, o suco de laranja, componente rotineiro do cardápio da merenda escolar, aparece como uma escolha obrigatória, em vista da capacidade da vitamina C de preservar a forma ferrosa e formar quelatos de ferro de alta assimilação pelo organismo.

Esta proposta sugere o preparo de suco de laranja concentrado e fortificado com sulfato ferroso na própria indústria processadora do suco, para ser distribuído na forma refrigerada ou congelada nos locais da merenda escolar. O suco seria então diluído na proporção certa para fornecer entre 25 e 100% das necessidades diárias de ferro, de acordo com o interesse do programa alimentar. Desta maneira, seria evitada a má dosagem e o manuseio excessivo pelos operadores.

Essa idéia simples não havia sido abordada anteriormente, portanto, desconheciam-se os problemas provenientes da introdução de íons ferrosos num sistema relativamente complexo como o suco de laranja. Particularmente, desconhecia-se o comportamento do sistema ferro-vitamina C estocado nas condições

de tempo e temperatura empregadas pela indústria e pela merenda.

A pesquisa desenvolvida nesta Tese teve como objetivo avaliar fenômenos químicos, sensoriais e nutricionais do suco de laranja adicionado de quantidades variáveis de sulfato ferroso. Os experimentos foram realizados primeiro com soluções puras de ácido ascórbico e sulfato ferroso separadamente para otimizar as condições analíticas. Foram estudados o efeito do pH (2,65 - 6,00) e da presença de ácido cítrico na reprodutibilidade das determinações. A seguir, foram estudadas misturas equimolares de ácido ascórbico e sulfato ferroso para verificar eventuais reações entre os compostos, em função do pH e da presença de um quelante competitivo como o ácido cítrico.

A fase seguinte da pesquisa teve como objetivo realizar estudos com suco de laranja industrial (concentrado a 50% de sólidos totais) adicionado de sulfato ferroso para dar relações de vitamina C : Fe^{2+} de 1:1, 2:1 e 5:1. As amostras foram armazenadas em diferentes condições e a evolução dos teores de vitamina C e de Fe^{2+} foi acompanhada por quase dois meses. Nas determinações analíticas de vitamina C e de Fe^{2+} foi usada a redução de Cu^{2+} para Cu^{+} que forma um complexo colorido com 2,2'-biquinolina. As determinações de Fe^{2+} individualmente foram feitas por complexação com 1,10-fenantrolina.

Finalmente, foram realizados ensaios biológicos com ratos para verificar se os teores de Fe^{2+} determinados analiticamente no suco causavam repleção da hemoglobina em animais anêmicos.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. Ácido Ascórbico: estrutura e propriedades

Ácido ascórbico é um sólido cristalino branco com ponto de fusão a 192°C e fórmula molecular $C_6H_8O_6$. É uma lactona insaturada, sendo um forte agente redutor /1/. Normalmente reage como ácido monobásico sendo que o valor do pK_1 para o grupo hidróxi 3 é 4,17 e o pK_2 para o grupo hidróxi 2 é 11,57 /2/. As propriedades redutoras são devidas ao grupamento $-C(OH) = C(OH) - C = O$ com duas ligações duplas conjugadas, e as propriedades complexantes do ácido ascórbico provém da configuração 2,3-endiol /3/. Ambas as propriedades, às vezes operam simultaneamente. O espectro de absorção do ácido ascórbico mostra um máximo a 245 nm em meio ácido e a 265 nm em meio alcalino /4/.

II.1.1. Importância nutricional

Ácido ascórbico, uma importante vitamina solúvel em água (32,0 g/100 mL a 25°C) também conhecido como vitamina C, existe na natureza em duas formas: reduzida e oxidada (ácido de hidroascórbico) /5/. É encontrado em todos os tecidos vivos. Em quase todos os mamíferos, a vitamina C é produzida no fígado, a partir da glicose /6/. Mas os seres humanos, os macacos e alguns outros animais não possuem a enzima que torna o fígado capaz de sintetizá-lo, devendo, portanto, obtê-lo através da dieta /7/.

Frutas cítricas, vegetais verdes, tomates, batatas, pimentas, caju e goiaba são algumas fontes importantes de vitamina C, mas o conteúdo varia dependendo da variedade, fatores ambientais e processamento /5/.

A vitamina C se concentra nos órgãos e tecidos de alta atividade metabólica: as glândulas adrenais e pituitária, o cérebro, olhos, ovários e outros tecidos vitais.

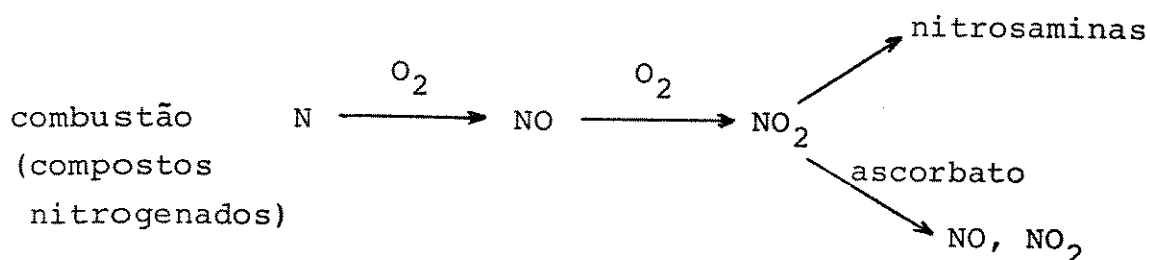
Qualquer forma de stress resulta numa abrupta redução no nível de vitamina C do organismo. Uma das mais importantes funções do ácido ascórbico está na síntese e conservação do colágeno, uma proteína que atua como o cimento que sustenta e mantém os tecidos e os órgãos do corpo juntos. O colágeno não pode ser formado sem ácido ascórbico (ele atua na hidroxilação da prolina); na sua falta, um colágeno precursor não fibroso é formado /6/. Quando a vitamina C está em falta, é o distúrbio na produção de colágeno que causa os horríveis aspectos do escorbuto, ossos frágeis que se fraturam ao menor impacto (o colágeno dá elasticidade e resistência aos ossos), artérias enfraquecidas que se rompem e sangram, etc.. A deterioração gradual da formação do colágeno está intimamente envolvida com o processo global de envelhecimento.

A deficiência severa de vitamina C resulta no escorbuto, cujos sintomas incluem hemorragia nos músculos e na pele, dores nas juntas e articulações, um enfraquecimento geral do tecido conjuntivo, letargia, perda de apetite e anemia. O início do escorbuto é precedido por uma falência das forças, a energia se esgota rapidamente ao menor esforço. A pele se torna pálida e sem brilho. As gengivas incham e inflamam, os dentes caem e a

respiração se torna difícil. O sangue penetra nos músculos e em outros tecidos, causando manchas negras. Nos estágios finais, profunda exaustão e diarreia, assim como problemas pulmonares e renais, levam à morte /6/.

A vitamina C age no organismo como um potente desintoxicante. Ela anula os efeitos de metais pesados como chumbo, mercúrio e arsênio, o monóxido de carbono e o dióxido de enxofre da poluição do ar e muitos carcinogênicos que, se não desintoxicados, podem causar câncer. Por exemplo, o ácido ascórbico pode exercer considerável efeito inibitório na formação de nitrosaminas a partir de nitrito (carnes), aminas e amidas (peixes) usados em alimentos preservados, em cosméticos (di ou tri-etanolamina), em cigarro e em muitas drogas, que são aminas secundárias ou terciárias /7/.

A reação que ocorre na queima de cigarros é a seguinte:



O ácido ascórbico também atua no metabolismo do colesterol, na transformação do colesterol em ácidos biliares, exclusivamente no estágio de formação do 7 α -hidróxicolesterol. Na ausência de ácido ascórbico, um acúmulo de colesterol nos tecidos de cobaias foi confirmado por vários autores /6/.

A biosíntese da carnitina, a partir da lisina, envol-

ve duas etapas de hidroxilação dependentes do ascorbato. A carnitina acyl-CoA transferase é a enzima chave que permite ao ácido graxo de cadeia longa penetrar as membranas interiores do fígado para que ocorra a liberação do potencial energético nele estocado. Cientistas sugeriram que os sinais de cansaço, um dos sintomas mais comuns precursores do escorbuto, pode ser atribuído à deficiência da carnitina.

Além de participar do metabolismo da histamina e prostaglandinas, da síntese de catecolaminas, o ácido ascórbico pode ainda ser usado no tratamento da esquizofrenia, de viroses e pode aumentar o Q.I. em alguns pontos /6/. Em alimentos é usado como antioxidante /7/.

Uma outra função de grande importância do ácido ascórbico é a de aumentar a absorção do ferro não-heme dos alimentos. A absorção do ferro não-heme depende de vários fatores entre os quais, componentes inibidores presentes na dieta e por precipitar como hidróxido férrico quando o pH se eleva no intestino delgado. Assim, o ácido ascórbico aumenta a absorção do ferro por evitar sua precipitação ou por manter o ferro na forma reduzida e/ou por formar um quelato com íons férricos /8/.

Os efeitos do ácido ascórbico e de alimentos contendo a mesma quantidade de ácido ascórbico (vitamina C) parecem ser os mesmos. Um aumento de 2 a 3 vezes na absorção do ferro não-heme de uma dieta pode ser esperado adicionando alimentos que contenham de 50 - 100 mg de ácido ascórbico /9/. Assim, o ácido ascórbico deve ser incluído no tratamento da anemia, além do ferro.

Ingestão diária recomendada: O Committee on Dietary Allowances recomenda a ingestão diária de 60 mg de vitamina C para adultos de ambos os sexos /10/. Com uma velocidade média de catabolismo do ascorbato de $2,9 \pm 0,6$ por cento /11/ e uma eficiência média de absorção do ascorbato de 85 por cento /12/, a ingestão diária de 60 mg de vitamina C seria necessária para manter uma reserva de ascorbato no organismo de 1500 mg. Uma reserva dessa magnitude protegerá contra os sinais iniciais de escorbuto, um adulto do sexo masculino por um período de 30-45 dias /10/.

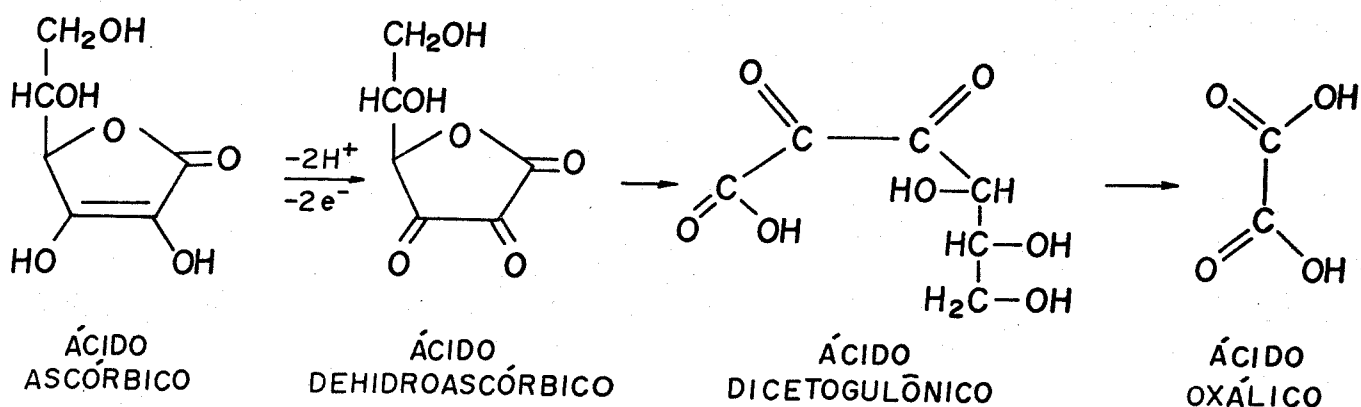
No entanto, o Dr. Michael Lesser considera que a quantidade de vitamina C diária varia muito de um indivíduo para outro, podendo estar entre 100 e 200 mg, o que pode ser conseguido através de uma boa dieta /6/. Linus Pauling /13/, Prêmio Nobel de Química, testou 110 plantas cruas e concluiu que a dose diária ótima de vitamina C está entre 2,3 e 9,4 g (ele toma 10 g por dia). O Dr. Michael Lesser considera outros fatores: as pessoas primitivas não respiravam fumaça, não bebiam água contaminada com cobre (o cobre inativa a vitamina C), não comiam alimentos preservados com nitratos, ou fumavam cigarros (cada cigarro destrói 25 mg de vitamina C). As pessoas primitivas não eram expostas a raios X que abaixam o nível de vitamina C, ou sujeitas à poluição de chumbo, mercúrio e cádmio, e a vida nas selvas pré-históricas deveria ser menos estressante que na selva de Manhattan ou na mina de alcatrão de Los Angeles /6/.

Dessa forma, cada pessoa deve usar a intuição sobre a quantidade de vitamina C necessária a partir de uma análise de todos esses fatores em sua vida diária.

A tabela a seguir mostra um sumário de importantes in formações sobre ácido ascórbico, sinais de deficiência e fontes naturais.

II.1.2. Reações do ácido ascórbico

Ácido ascórbico é rapidamente oxidado a ácido dehidroascórbico por oxigênio, de acordo com a reação:



A reação é aparentemente reversível /1/ e é função da temperatura, do pH e do teor de oxigênio da amostra aquosa. A auto-oxidação é fortemente catalisada por diversos íons metálicos, principalmente Cu(II) e Fe(III). O ácido dehidroascórbico pode ser oxidado a ácido dicetogulônico que, por hidrólise, produz ácido oxálico.

Sob condições anaeróbicas, o ácido ascórbico se degrada em furfural e dióxido de carbono.

Vitamina C (ácido ascórbico) /6/

Sintomas e sinais de deficiência	Quantid. diária recomendada	Dosagem suplementar	Dosagem terapêutica	Fontes naturais ricas
<p>(Escorbuto agudo)</p> <p>aspecto pálido; perda do vigor; cansaço fácil; lassitude, dificuldade de respirar; desinterese por exercícios; perda de apetite; anemia; vontade de dormir; dores passageiras nas juntas e membros, especialmente nas pernas; manchas pretas.</p> <p>(último estágio)</p> <p>gengivas inflamadas que sangram facilmente, inchadas e esponjosas; manchas vermelhas; pequenas hemorragias na pele, especialmente nas pernas nos poros e vermelhas; urina no sangue.</p>	<p>100 mg (LESSER)</p> <p>60 mg (RDA)</p>	<p>1.000 a 2.000 mg diárias</p> <p>Se fumante, mínimo de 2 g diárias (2.000 mg)</p>	<p>virose aguda, gripes, resfriados - 1 a 2 g toda hora acordada.</p> <p>stress - 1 a 2 g/hora acordada.</p> <p>"senilidade" - consumo - 1 a 2 g/dia.</p> <p>dor no final da coluna devido degeneração do disco espinal - 500 mg a 5 g/dia.</p> <p>poluição do ar - 3 g/dia com vitamina E e A.</p> <p>Doença Mental</p> <p>sintomas suaves - fadiga, pessimismo, preocupação - 3 g/dia.</p> <p>sintomas moderados - ansiedade, confusão, depressão, insônia - 3 a 10 g/dia.</p>	<p>frutas cítricas, vegetais verdes, tomates, batata, pimentas, couve-flor, salsaínia, caju, goiaba.</p>
<p>(Escorbuto avançado)</p> <p>aspecto sem cor; fraqueza violenta; o menor esforço causa palpitação e falta de ar; gengivas inflamadas e sangrando; os dentes começam a se soltar e podem cair; respiração muito difícil; feridas não cicatrizam; grande dor nos membros; ossos quebram com facilidade; pneumonia; morte por colapso súbito.</p>				

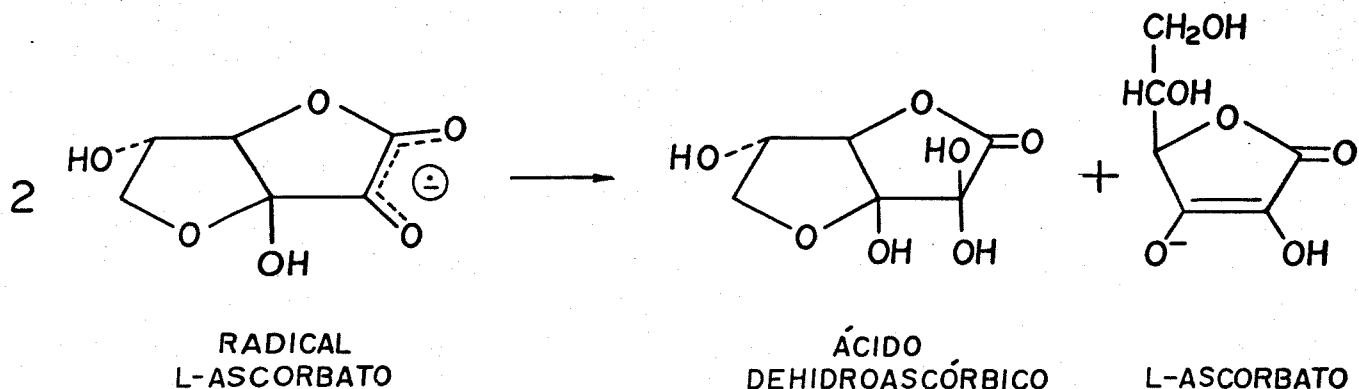
Vitamina C (ácido ascórbico) /6/ (continuação)

Sintomas e sinais de deficiência	Quantid. diária recomendada	Dosagem suplementar	Dosagem terapêutica	Fontes naturais ricas
<p>(Sintomas mentais)</p> <p>fadiga; apatia; lassitude; confusão; depressão; expressão de dor no rosto franzido; testa franzida.</p>			<p>sintomas graves - severa depressão, esgotamento nervoso - 3 a 30 g/dia.</p> <p>heroína e outras drogas - cerca de 50 g/dia.</p>	

II.1.2.1. Reações de redução por ácido ascórbico por transferência de um elétron

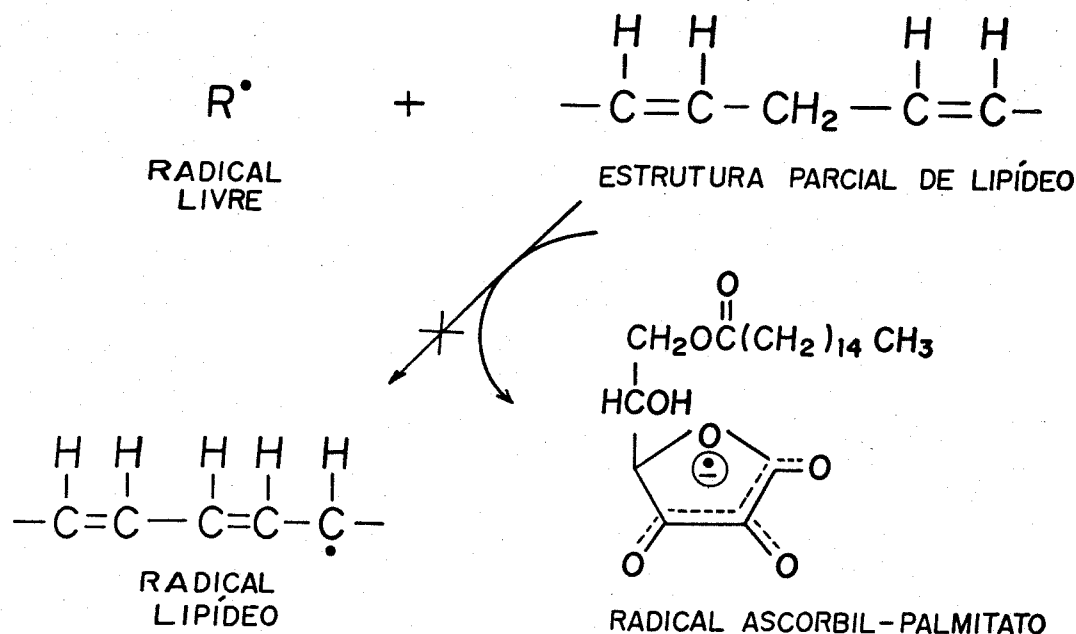
A mais importante propriedade química do ácido L-ascórbico (H_2A) é sua facilidade de oxidação pela transferência de um ou de dois elétrons /14/. Quando um elétron é transferido na etapa limitante da velocidade, o primeiro produto formado a partir do ácido L-ascórbico é o radical ácido L-ascórbico (HA^\bullet), também chamado ácido monodehidroascórbico ou ácido semidehidroascórbico. O radical ácido L-ascórbico (HA^\bullet) é um ácido forte com pK 0,45 e no pH fisiológico ele existe como um ânion radical ($A^{\bullet-}$). A estrutura de $A^{\bullet-}$ parece ser bicíclica segundo alguns autores /15/, mas outros acreditam que uma dupla ligação $C_2 - C_3$ esteja presente em $A^{\bullet-}$ /16/.

Radicais livres que danificam lipídeos e outros compostos prontamente oxidáveis em alimentos e tecidos são eliminados pela redução com L-ascorbato /7/. Na reação, um elétron é transferido para o radical livre de HA^- dando um radical ascorbato ($A^{\bullet-}$). Esse radical funciona tanto como um bom agente oxidante quanto como um bom agente redutor: ele reage consigo mesmo para produzir uma mistura 1:1 de ácido L-ascórbico e ácido dehidroascórbico /14/.



Admite-se geralmente que a rancificação oxidativa em lipídeos é iniciada quando um radical livre ataca uma molécula de lipídeo para dar um radical alquila. Essa etapa de iniciação é terminada na presença de L-ascorbil-6-palmitato (AP), um derivado do ácido ascórbico solúvel em lipídeos. Esse radical não tem estrutura cíclica, mas o elétron desemparelhado está de localizado ao longo de seis átomos. Além disso, o AP também pode se desproporcionar em AP e dehidroascorbil-6-palmitato.

Devido à sua reatividade com radicais livres, ascorbil-palmitato e ácido ascórbico se comportam como antioxidantes típicos: eles evitam a formação de peróxido em lipídeos e retardam o início da reação em cadeia que causa a deterioração de óleos vegetais, gordura animal, peixe, margarina, leite, vitamina A e carotenóides /17/.

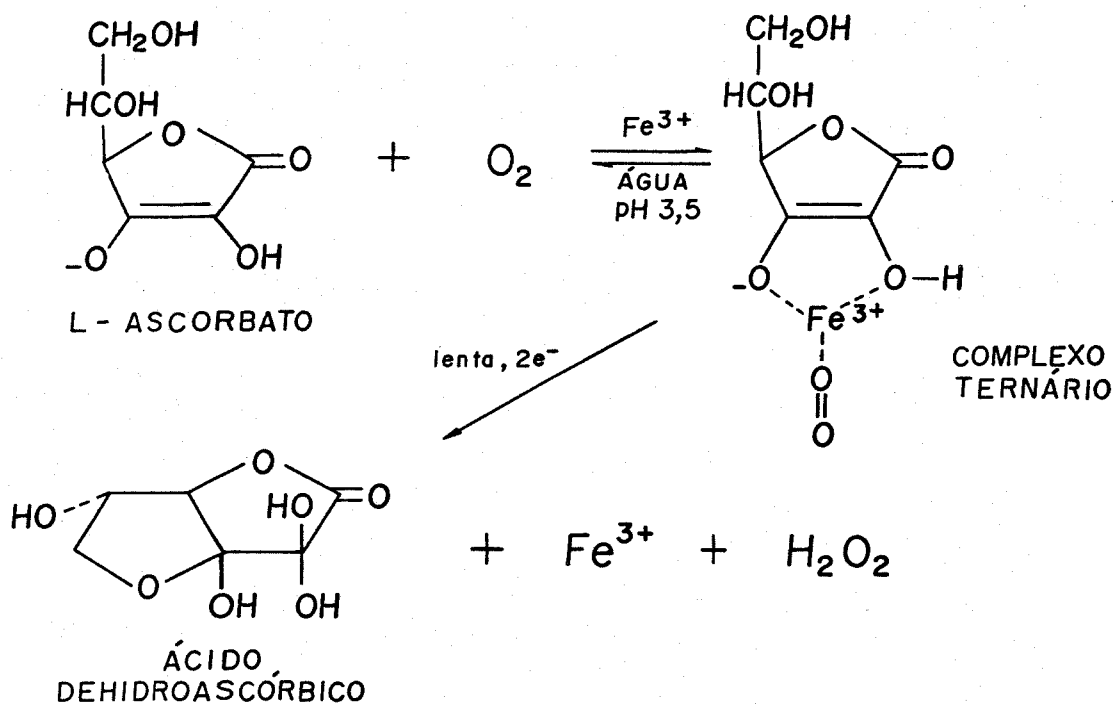


INIBIÇÃO DA REAÇÃO ENTRE UM RADICAL LIVRE E UM LIPÍDEO POR
 L-ASCORBIL - 6 - PALMITATO /14/.

Ácido ascórbico reage ainda com o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical peridroxil (HO_2^\bullet), radical hidroxila (HO^\bullet) e oxigênio singlete. Essas reações por ácido ascórbico retardam a auto-oxidação dos lipídeos /14/.

II.1.2.2. Reações de redução por ácido ascórbico por transferência de dois elétrons

A reação do L-ascorbato com oxigênio molecular na presença de íons dos metais de transição é de primordial importância na química do ascorbato. Os metais de transição, especialmente íons cúpricos e férricos, catalisam a auto-oxidação ligando o L-ascorbato e o oxigênio em um complexo ternário proposto por Martell /18/.



REAÇÃO DE OXIGÊNIO COM L-ASCORBATO NA PRESENÇA DE $Fe(III)$.

Dois elétrons π do L-ascorbato no complexo estão ligados ao oxigênio através do íon metálico de transição /19/. O

complexo se dissocia e os produtos são ácido dehidroascórbico, peróxido de hidrogênio e o íon metálico. Na maioria dos alimentos, o ácido dehidroascórbico é rapidamente hidrolisado a ácido 2,3-dicetogulônico, a reação é não-reversível e resulta em perda de atividade da vitamina C /7/.

A reação catalisada por metais entre O_2 e H_2A aumenta quando a acidez diminui de pH 1,5 a 3,5, confirmando que o ânion L-ascorbato está presente no complexo intermediário. A perda auto-oxidativa de H_2A se acelera próximo de pH 7,0 quando reações secundárias se tornam importantes /14/.

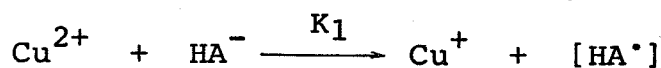
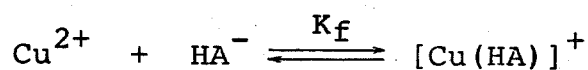
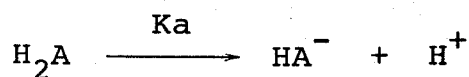
O complexo ternário explica a oxidação mais rápida do H_2A por uma mistura de oxigênio e íon metálico /18/. A complexação do íon férrico pelo ascorbato (HA^-) é uma reação muito mais rápida do que a redução do íon férrico pelo H_2A e o complexo $[Fe(III) \cdot HA^-]$ é estável entre pH 2 e 8 e muito mais estável que o complexo $[Fe(II) \cdot HA^-]$ /20/.

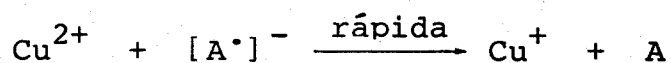
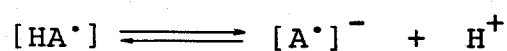
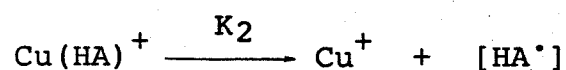
A auto-oxidação é o mecanismo responsável pela maior parte das perdas de ácido ascórbico em alimentos. Algumas técnicas usadas para preservar a vitamina C são: deaerar a amostra, evitar contato com metais, adicionar quelantes de metais como citrato, fosfatos e EDTA, abaixar a atividade da água, abaixar o pH /21/.

II.1.2.3. Reação de oxidação do ácido ascórbico por íons metálicos: Fe^{3+} e Cu^{2+}

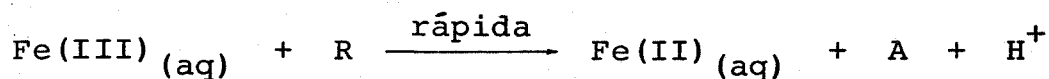
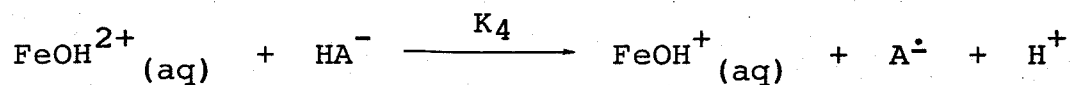
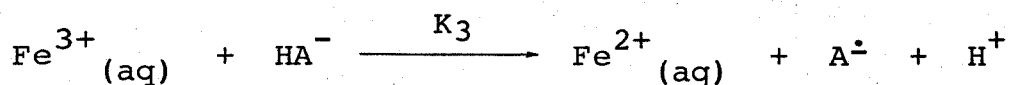
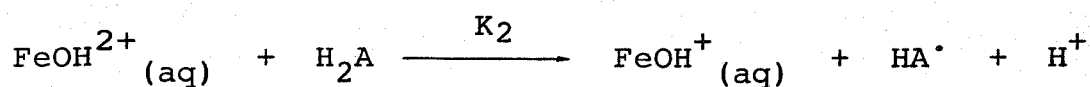
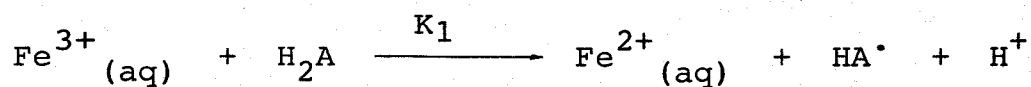
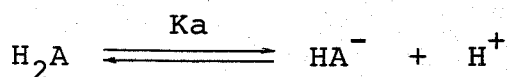
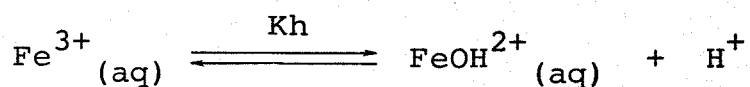
Sabe-se há muito tempo que cobre(II) oxida ácido ascórbico em condições anaeróbicas e catalisa a oxidação de ácido ascórbico pelo oxigênio /19, 22/. A maioria dos estudos tem concentrado sua atenção na reação de Cu(II) catalisada por oxigênio e prestado uma atenção limitada à reação direta de cobre(II) com ácido ascórbico embora essa reação possa ser utilizada como um método rápido, sensível e seletivo de determinação de ácido ascórbico /23/.

Xu e Jordan /24/ fizeram um estudo da reação de Cu(II) com ácido ascórbico em que tentam esclarecer seu mecanismo. A reação é dependente do pH (de forma inversa) e da concentração do íon metálico. Inicialmente, o íon Cu(II) forma um complexo reversível com o íon ascorbato HA^- que, ao se dissociar, dá origem a um radical livre ácido L-ascórbico HA^\bullet pela reação de Cu(II) com HA^- . Esse radical é ácido e se dissocia rapidamente em A^\bullet e H^+ . O radical livre ascorbato A^\bullet então reage com outro íon Cu(II) dando origem a Cu(I) e ácido dehidroascórbico. Todas as etapas do mecanismo podem ser resumidas no seguinte esquema:





Martinez e Uribe /25/ fizeram um estudo semelhante pela técnica de stopped-flow para estudar a influência da acidez na reação de oxidação de ácido ascórbico por Fe^{3+} e confirmar seu mecanismo. O esquema de reações proposto foi o seguinte:



onde Fe(III) representa as duas formas possíveis do íon férrico, $\text{Fe}^{3+}(\text{aq})$ ou $\text{FeOH}^{2+}(\text{aq})$; Fe(II) indica as formas correspondentes ao íon ferroso, $\text{Fe}^{2+}(\text{aq})$ ou $\text{FeOH}^+(\text{aq})$, R é o radical HA^\bullet ou o radical A^\bullet ; H_2A é o ácido L-ascórbico; HA^- seu ânion e A é o ácido L-dehidroascórbico.

Sobre a influência da acidez, os autores não puderam emitir nenhuma conclusão pois na faixa de acidez usada no experimento ($[\text{H}^+] = 1 - 3 \text{ M}$), a concentração de H_2A era muito maior que a concentração de HA^- .

II.2. Métodos Analíticos para a Determinação de Ácido Ascórbico

Durante a última década, muitas publicações apareceram descrevendo análises de ácido ascórbico em amostras de alimentos, farmacêuticas e biológicas /26/. Isso provém da importância desse composto do ponto de vista nutricional, clínico, farmacológico e industrial. Os principais métodos de análise do ácido ascórbico podem ser sumarizados em:

II.2.1. Métodos que utilizam as propriedades redutoras do ácido ascórbico

1- Titrimetria: o método titrimétrico mais clássico utiliza como reagente titulante o 2,6-diclorofenolindofenol

(DCFIF) /27/. As soluções do reagente são azuis em pH neutro e rosa em pH ácido. A estequiometria da reação redox foi inicialmente proposta por Tillmans /28/. A reação é rápida e é de primeira ordem em relação a cada um dos reagentes. Esse método foi utilizado por vários pesquisadores para dosar ácido ascórbico em vários tipos de amostras de alimentos /29/. É necessário, entretanto, não esquecer que esse método pode levar a resultados errôneos devido à presença de outras substâncias redutoras na amostra (por exemplo, fenóis, sulfidrilos, trioses redutoras e íons metálicos), sendo, portanto, necessário eliminar as substâncias interferentes, o que pode tornar o método longo e complexo.

Outros reagentes de óxido-redução que podem ser utilizados são: tricloroacetato de ferroceno, ferrocianeto de potássio, bromato de potássio, iodo, nitrato duplo de cério e amônio, nitrato ou sulfato de cobre, etc. /27/.

2 - Métodos espectroscópicos: há métodos espectroscópicos que utilizam um indicador de óxido-redução na sua forma oxidada. O reagente padrão para a análise de ácido ascórbico é o 2,6-dicloro-indofenol; o método consiste em medir a absorbância do DCIF a 518 nm antes e depois da adição da amostra.

Uma outra classe de reações colorimétricas de redox envolve a redução de íons metálicos pelo ácido ascórbico para produzir uma solução colorida estável /26/. Um dos métodos mais comuns envolve a redução de Fe(III) a Fe(II) pela vitamina. Um complexo de Fe(II) colorido se forma depois da adição do agente quelante. A absorbância é medida no máximo de absorção do com-

plexo e é diretamente proporcional à concentração de ácido ascórbico. Os agentes quelantes de Fe(II) mais comuns são a α, α' -bipiridina, a 2,4,6-tripiridil-S-triazina (TPZ), a ferrozina (3-(2-piridil-5,6-bis(ácido fenilsulfônico)-1,2,4-triazina)) e a 1,10-fenantrolina. As vantagens da ferrozina sobre outros reagentes para Fe(II) incluem solubilidade, estabilidade e uma alta absorvidade molar (27.900) $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ quando comparada com os complexos da fenantrolina (11.000) $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ou da α, α' -bipiridina (8.650) $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ /30/.

Outro íon metálico que pode ser utilizado na determinação de ácido ascórbico é o Cu^{2+} que sendo reduzido a Cu^+ pode ser complexado por 2,2-biquinolina(cuproína) formando um complexo púrpura avaliado espectrofotometricamente a 545 nm. A sensibilidade do método é de 4,0 $\mu\text{g/mL}$. Esse método foi citado na literatura por Sieh e Sweet /31/ e tem sido objeto de estudo de Contreras, G.E. /32/.

3 - Reações de derivatização: um outro método colorimétrico clássico envolve medidas de absorvância do composto formado entre dinitrofenilhidrazina (DNFH) e a forma oxidada do ácido ascórbico. Nesse método, comumente denominado de método de Roe e Kuether /33/, o ácido ascórbico é primeiro convertido a ácido dehidroascórbico por meio de um agente oxidante adequado. Dinitrofenilhidrazina é, então, adicionada e, depois de um breve tempo de incubação, a cor é produzida depois da acidificação com ácido sulfúrico concentrado. A absorvância é medida a 520 nm e é proporcional às concentrações do ácido ascórbico original e do ácido dehidroascórbico.

Um outro método clássico de derivatização envolve a reação de ácido ascórbico com a 4-metóxi-2-nitroanilina diazotada. Inicialmente estudado por Schmall et alii /34/, o método envolve a formação em meio alcalino de um composto azul, cuja absorvância (a 570 nm) é proporcional à concentração do ácido ascórbico original. Outras vitaminas e ácido dehidroascórbico não reagem com o reagente. O método é, portanto, apropriado para estudos de estabilidade em medicamentos.

II.2.2. Métodos eletroquímicos

A eletro-oxidação de ácido ascórbico na superfície de um eletrodo segue um mecanismo irreversível /35/ envolvendo a perda de 2 elétrons e 2 prótons H^+ para formar ácido dehidroascórbico. Esse produto reage rapidamente via hidratação irreversível para formar ácido dicetogulônico.

O ácido ascórbico tem uma constante de velocidade rápida e heterogênea com muitos tipos de eletrodos, entretanto não é de surpreender que se encontrem muitos métodos eletroanalíticos /36/. Outros pesquisadores /37/ aplicaram a voltametria linear com eletrodo de pasta de carbono para determinar ácido ascórbico em frutas frescas, vegetais, multivitaminas e bebidas. Os voltamogramas foram corridos em soluções de ácido metafosfórico e a faixa de linearidade esteve entre 10^{-6} e 10^{-3} M. Para determinar ácido ascórbico na presença de Fe(II), foi necessário adicionar 5-nitro-1,10-fenantrolina. Esse reagente comple-

xou o ferro(II), e o complexo tinha um potencial de oxidação mais alto, o que permitiu medir seletivamente o ácido ascórbico. O método foi comparado com o método titrimétrico com 2,6-dicloroindofenol /38/ e apresentou limite de detecção mais baixo devido à melhor seletividade.

Outros métodos eletroquímicos têm sido usados para determinar ácido ascórbico, como a voltametria diferencial de pulso e a amperometria /26/. A determinação de ácido ascórbico em tabletes foi feita também pela análise de injeção em fluxo /39/ e pelo método coulométrico /40/.

II.2.3. Métodos cromatográficos

Devido ao fato de a maior parte dos métodos espectroscópicos e eletroquímicos não poderem distinguir entre ácido ascórbico, dehidroascórbico, d-isoascórbico ou outro composto oxidável, não é de surpreender que métodos de separação sejam usados para aumentar a seletividade /26/.

II.2.3.1. Cromatografia em camada delgada

Foi usada /41/ para separar os ácidos L-ascórbico e d-isoascórbico presentes em carnes. A fase móvel é a butanona saturada com água e a quantificação é efetuada por densitometria após a revelação com 2,6-dicloroindofenol ou com ácido molibdo-

fosfórico. As características desse método não são muito satisfatórias porque a quantidade mínima detectável de ácido ascórbico é de 80 mg por quilograma de alimento.

II.2.3.2. Cromatografia em fase gasosa

É um método de separação muito eficaz mas infelizmente, o ácido ascórbico é destruído antes de ser vaporizado. É então, necessário transformá-lo num derivado volátil /42/. O derivado é isolado através de uma coluna do tipo silicone e detectado por ionização de chama. Essa técnica dá bons resultados para a dosagem da vitamina C em farinhas, no entanto, devido à complexidade da técnica, normalmente se prefere a cromatografia líquida de alta eficiência.

II.2.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

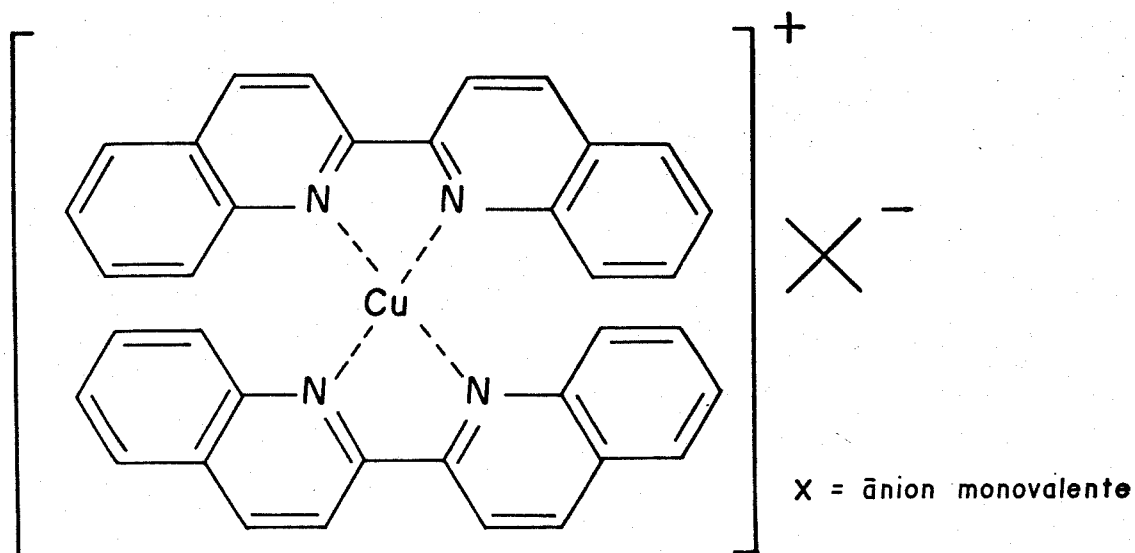
Sua grande vantagem é não estar sujeita aos problemas de interferências e ainda permite, em uma só operação, não somente a dosagem do ácido L-ascórbico, mas também de seus metabólitos e compostos de estrutura semelhante /43/. É uma técnica particularmente interessante quando se quer estudar a estabilidade do ácido ascórbico num alimento. No entanto, Hughes /1/ faz uma crítica a essa técnica em relação a efeitos de residência das espécies na fase móvel em separações feitas em uma coluna de Lichrosorb-NH₂ e KH₂PO₄/CH₃CN (50/50) como fase móvel.

II.2.4. Método de redução de íons cúpricos

Contreras, G. E. /32/, avaliando tocoferóis em vários tipos de amostras, se utilizaram das propriedades redutoras do tocoferol que, reagindo com compostos de cobre, deram origem a íons cuprosos. Estes, em contato com um quelante específico, formaram um complexo colorido que foi avaliado espectrofotometricamente. Os autores utilizaram a cuproína, a neocuproína e a batocuproína como complexantes dos íons cúpricos.

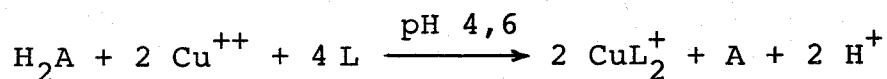
Posteriormente, Contreras et alii /23/ aplicaram esse método para a determinação de ácido ascórbico em muitos tipos de amostras, comparando os resultados com o método de titulação com 2,6-diclorofenol indofenol. O método consta inicialmente da extração do ácido ascórbico das frutas e hortaliças com ácido metafosfórico 5% e o extrato é agitado vigorosamente com um pequeno volume de clorofórmio para remover vitamina E, compostos terpênicos, taninos e outros compostos lipossolúveis com propriedades redutoras.

A seguir, a fase aquosa tamponada é agitada com um solvente orgânico (álcool isoamílico) contendo íons cúpricos e cuproína. O complexo formado de cor púrpura, $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$, solúvel em álcool isoamílico, é avaliado espectrofotometricamente a 545 nm.



FÓRMULA ESTRUTURAL DO COMPLEXO ENTRE ION CUPROSO
E 2,2' - BIQUINOLINA

A reação que ocorre durante o processo é a seguinte:



onde H_2A é o ácido ascórbico, A é o ácido dehidroascórbico e L é o quelante cuproína.

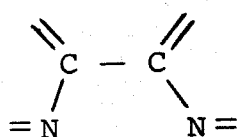
A importância do sistema bifásico está na eliminação dos interferentes solúveis em água presentes em alguns alimentos (por exemplo, açúcares redutores, cisteína e pigmentos do tipo das antocianinas). Num sistema de uma fase, esses compostos, quando presentes, também reduziriam cobre, dando valores irreais do teor de ácido ascórbico, como constatado por Contre-ras et alii /23/ na análise de vegetais como repolho roxo, raba nete, beterraba, etc..

A seguir apresentamos alguns dados dos teores de ácido ascórbico em frutas e hortaliças determinados por Contreras et alii pelo método de redução de íons cúpricos /23/ e pelo método convencional com 2,6-diclorofenolindofenol /38/.

Vegetal	Teores de ácido ascórbico (mg/100 g)	
	Método com Cu^{++}	Método com 2,6 - DCFIF (titulação)
Pimentão doce	165,4	163,9
Pimentão chapéu	28,5	26,8
Repolho branco	46,2	43,4
Abobrinha	14,6	13,9
Maxixe	15,8	16,4
Vagem	17,3	18,2
Chuchu	6,9	6,4
Batata	27,7	26,1
Caqui	19,5	19,1
Manga	34,7	33,8
Laranja (suco)	49,9	47,5
Goiaba	254,0	258,2
Cenoura	8,1	7,6
Tomate	18,1	18,5
Abóbora	7,7	8,2
Salsinha	81,0	91,7

II.2.5. Reagentes específicos para cobre: cuproína, neocuproína e batocuproína /44/

Esses compostos são de muito interesse pois formam que latos estáveis num anel de cinco lados com íons metálicos. Sua característica comum, que também ocorre na 1,10-fenantrolina e na 2,2'-bipiridina, é o grupamento atômico



que é responsável pela reação.

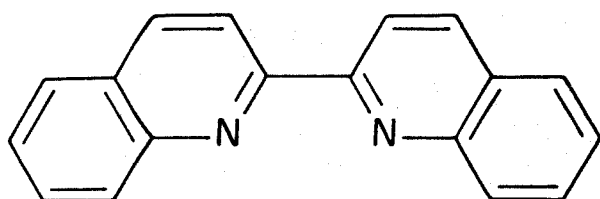
A cuproína (2,2'-biquinolina), a neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) e a batocuproína (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina) são particularmente importantes pois não formam complexos com íons bivalentes (Fe^{2+} e Cu^{2+}) já que apresentam substituintes volumosos adjacentes aos nitrogênios imínicos; ao contrário, formam complexos intensamente coloridos com íons cuprosos, de fórmula CuL_2^+X^- e CuL^+X^- onde X^- é um ânion monovalente.

O biquelato $\text{Cu}(\text{cuproína})_2^+$ é intensamente roxo ($\lambda_{\text{máx}} = 546 \text{ nm}$, $\epsilon = 6.220 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), formando-se em soluções aquosas de pH 2,0 a 9,0, das quais pode ser extraído em álcool isoamílico ou n-hexanol para avaliação fotométrica.

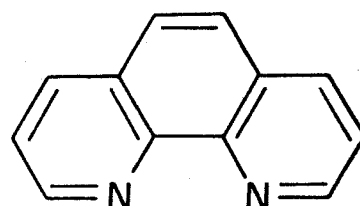
A neocuproína forma com íons cuprosos um complexo de cor laranja ($\lambda_{\text{máx}} = 454 \text{ nm}$), em soluções de pH 3,0 a 10, podendo ser extraído em álcool isoamílico ou clorofórmio. O coeficiente de absortividade molar desse complexo, $\epsilon = 7.950 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

O biquelato $\text{Cu}(\text{batocuproína})_2^+$ é de cor laranja ($\lambda_{\text{máx}} =$

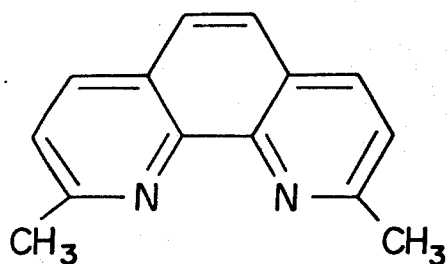
479 nm) sendo obtido nas mesmas condições que os complexos anteriores. Sua vantagem é a grande sensibilidade ($\epsilon = 14.160 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), mas sua desvantagem é o alto preço.



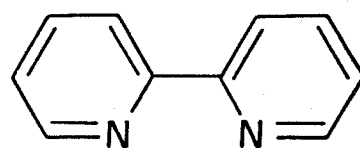
CUPROÍNA



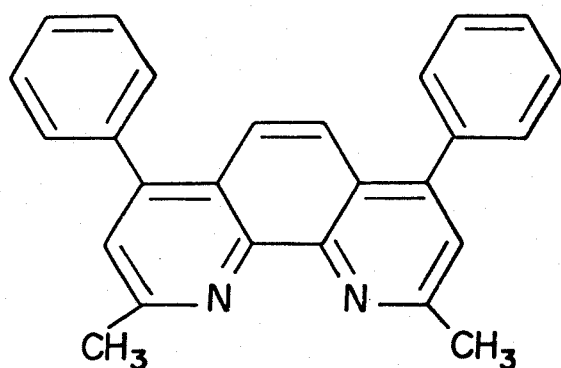
1,10 - FENANTROLINA



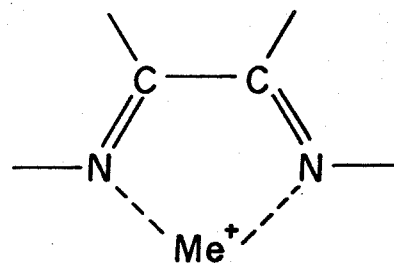
NEOCUPROÍNA



2,2' - BIPIRIDINA



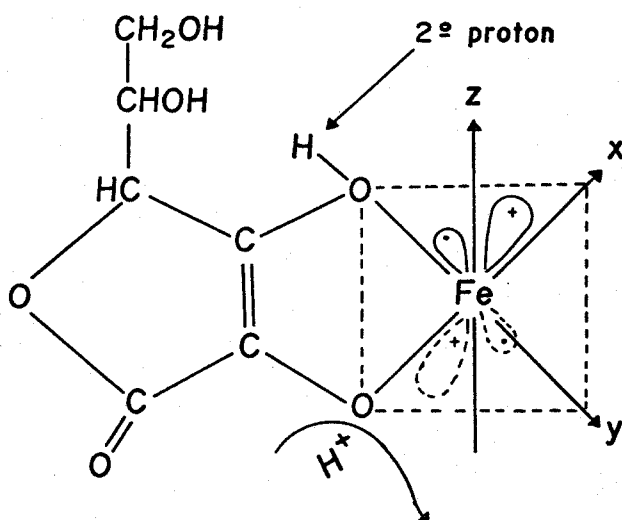
BATOCUPROÍNA

ESTRUTURA BÁSICA
DE
 α, α' - DIIMINA

FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS COMPLEXANTES ESPECÍFICOS
PARA IONS CUPROSOS E FERROSOS

II.3. Formação de Complexo entre Ácido Ascórbico e Ferro

Khan e Martell /19/, estudando a oxidação do ácido ascórbico catalisada por Cu(II) e Fe(III), chegaram à formação de um composto intermediário ferro-ascorbato envolvido na reação de oxidação do ânion ascorbato cuja estrutura foi por eles proposta como sendo:



ESTRUTURA PROPOSTA PARA O COMPLEXO FERRO-ASCORBATO /20/.

Conrad e Schade /45/ demonstraram a formação de complexos ferro-ascorbato quando adicionaram ácido ascórbico à solução de cloreto férrico, obtendo complexos de cor púrpura. A formação desses complexos mantém o ferro em solução na faixa de pH de 2 a 11.

Martinez e Uribe /46/ sintetizaram e isolaram o complexo azul de ácido ascórbico com Fe^{3+} e, após estudos espec-

troscópicos, propuseram sua estrutura como sendo $\text{Fe}(\text{HA})_2^+$.

Gorman e Clydesdale /20, 47/ determinaram as constantes de estabilidade termodinâmica dos complexos férricos e ferrosos de ascorbato. As constantes de estabilidade para os complexos de ascorbato férrico e ferroso foram encontradas na faixa de $1,90 \times 10^3$ a $2,61 \times 10^4$ e $7,69 \times 10^{-3}$ a $6,95 \times 10^{-2}$, respectivamente.

Martinez et alii /48/, por meio da técnica de stopped-flow, determinaram a constante de equilíbrio de formação do biquelato entre ácido ascórbico e Fe(III) e propuseram a estrutura do complexo.

Nesses estudos os autores sempre procuram ressaltar a importância do ácido ascórbico seja para manter o ferro no estado reduzido, impedindo sua precipitação, seja formando um complexo com íons férricos, impedindo sua complexação com outros compostos presentes em alimentos /7/ que prejudicam sua absorção.

II.4. Ferro

II.4.1. Importância nutricional e absorção

O ferro, elemento presente em todas as células do organismo e envolvido com um grande número de reações bioquímicas, tem uma importância nutricional largamente conhecida /49/. A anemia nutricional é, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) /50/, um dos maiores problemas de saúde pública de países em desenvolvimento. Sua maior causa é a deficiência de ferro /51/.

A anemia ferropriva alcança sua prevalência máxima entre as populações do terceiro mundo, onde às dietas deficientes somam-se fatores patológicos agravantes como infecções parasitárias e outras carências nutricionais, capazes de agravar ou desencadear deficiências de ferro /52/.

A prevalência da anemia ferropriva é um problema de saúde global, sua repercussão clínica sobre o organismo pode ser dividida em efeitos hematológicos e não hematológicos /53/. Os efeitos hematológicos são aqueles que resultam em anemia ferropriva, a mais comum das anemias, que ocorre como o balanço negativo entre o aporte de ferro e as necessidades do organismo, ou por perdas crônicas de ferro /54/.

A diminuição da hemoglobina impede a perfeita oxigenação dos tecidos, restringindo a capacidade física do homem proporcionalmente à sua gravidade. Porém, mecanismos fisiológi-

cos de adaptação à deficiência de ferro permitem que indivíduos gravemente anêmicos continuem executando suas atividades em níveis inferiores de eficiência, até a descompensação que pode levar à falência cardíaca /54, 55/.

Os efeitos não hematológicos da deficiência de ferro incluem declínio da performance aeróbica do tecido muscular, efeitos deletérios sobre os tecidos epiteliais, efeito depressor sobre a imunidade celular, redução de reações enzimáticas de oxidação e redução onde atua como parte de enzimas ou co-fator /56/. O ferro pode ainda ter efeito direto sobre a síntese do D.N.A. e na divisão celular /57/.

No organismo humano existe cerca de três a quatro gramas de ferro. A maior parte, cerca de 65% faz parte da hemoglobina; aproximadamente 4% constitui a mioglobina; menos de 1% faz parte de enzimas como: catalase, peroxidases, citocromos, monoaminoxidases. Embora representem uma pequena porcentagem do montante total de ferro, essa fração é de importância vital, pois essas enzimas participam de reações de oxidação e redução; 25% do conteúdo total de ferro estão armazenados nos compostos de depósito, ferritina e hemosiderina /58,59/.

A absorção do ferro pode ser subdividida em três fases principais: primeira, fase intraluminal, na qual o alimento é digerido e o ferro solubilizado; segunda, fase mucosa, em que o ferro é captado pelas células mucosas e transportado pela serosa, ou retido como ferritina; terceira, de transporte aos órgãos hematopoiéticos /60/. Os mecanismos pelos quais a mucosa intestinal parece apreciar a quantidade de ferro que deve ser absorvida permanece ainda obscuro. A porção proximal do intesti

no delgado, principal sítio da absorção do ferro, tem a habilidade de inibir a absorção de quantidades desnecessárias desse nutriente. Sabe-se que indivíduos depletados absorvem cerca de 70%, enquanto em condições de normalidade das reservas apenas 10% do ferro ingerido é absorvido /61/.

A absorção do ferro deve ser considerada sob dois ângulos: a absorção do ferro heme e a absorção do ferro não-heme /62/.

O ferro heme é absorvido diretamente pela mucosa intestinal como uma metaloporfirina complexa e sua absorção não é ou é muito pouco afetada pela composição da refeição /63 , 64, 65/. Embora o ferro heme (aquele ligado à hemoglobina) represente apenas 5 a 10% do ferro total das dietas, especialmente entre as populações pobres, o mesmo contribui com 1/3 do ferro efetivamente absorvido /66/.

O ferro não-heme, ou seja, aquele que não está ligado à hemoglobina, encontrado em alimentos de origem vegetal, ovos, leite e derivados, constitui 85 a 90% das dietas, sua absorção é influenciada por vários fatores /67/ e, ao contrário do ferro heme que é efetivamente bem absorvido, a fração do ferro não-heme absorvida é muito pequena, é referido na literatura como ferro de baixa biodisponibilidade /68 /.

Os fatores que influenciam a absorção do ferro não-heme podem ser estimuladores como o ácido ascórbico /69/, o mais potente e mais estudado, facilita a absorção pela formação de quelatos solúveis tanto em pH alto quanto baixo /70 , 71/. A inclusão de suco de laranja ou limão durante a refeição aumenta a absorção do ferro 3 a 4 vezes /72/. Carne e peixe também

são apontados como estimuladores da absorção do ferro, assim como as secreções gástricas podem facilitar a absorção do ferro /44/.

Os fatores inibidores são representados pelos taninos, cálcio ou fosfato que formam complexos insolúveis com o ferro, os tanatos, fosfatos e oxalatos que sendo muito estáveis, são pouco digeríveis /73/. Os ftatos têm seu efeito inibidor ainda questionado.

Os principais sinais da deficiência de ferro são: anemia com dificuldade de concentração, perda de memória, depressão, vertigens, fraqueza, respiração difícil, tornozelo inchado, unhas quebradiças, perda de cabelo, pele pálida, exaustão / 6 /.

As principais fontes naturais de ferro são as carnes, fígado e órgãos, ovos e vegetais de folhas verdes / 6 /.

A escolha dos alimentos que compõem a refeição tem importância decisiva na determinação da biodisponibilidade do ferro, que depende da interação dos vários alimentos ingeridos simultaneamente /74,67/.

A definição de biodisponibilidade proposta para todos os nutrientes é que ela é uma proporção da quantidade total do nutriente em um alimento ou dieta que é digerido, absorvido e metabolizado pelas vias normais.

II.4.2. Quantidade diária recomendada

A absorção do ferro é um processo complexo influenciado pela mucosa intestinal /62/ e por uma série de fatores que aumentam ou diminuem a biodisponibilidade do ferro / 7 /. A perda média de ferro num adulto saudável do sexo masculino é estimada em aproximadamente 1 mg/dia /10/. Na mulher adulta, há uma perda adicional de 0,5 mg/dia devido ao período menstrual /6 /. Considerando que a estimativa média de absorção do ferro não-heme é de 10%, o RDA /10/ e o Dr Michael Lesser / 6 / recomendam a ingestão diária de 10 mg para o homem adulto, 15 a 20 mg para mulheres em fase menstrual ou gestantes e 12 mg para crianças. Essas quantidades são suficientes para manter uma reserva de ferro de aproximadamente 500 mg no organismo.

II.5. Métodos de Determinação de Ferro

II.5.1. Métodos colorimétricos

a) Método do tiocianato /75/

Tiocianato forma um complexo vermelho com íon férrico. A intensidade da cor, assim como o λ máximo, depende do pH, da temperatura, e tempo de repouso, todos os quais devem ser mantidos constantes para bons resultados. O método do tiocianato sofre várias desvantagens: a cor é pouco estável, a estequiometria indefinida e a lei de Beer não é exatamente seguida. Por outro lado, o método é bem estabelecido, o reagente é barato e prontamente disponível e pode ser usado em meio fortemente ácido. Interferências incluem: fluoreto, fosfatos e oxalatos; prata e o íon mercurioso dão tiocianatos insolúveis; cobre, bismuto, titânio, urânio e molibdênio dão cores. O íon mercúrico, Cd, Zn, Sb(III) formam complexos de tiocianato e reduzem a intensidade da cor do complexo com ferro. Co interfere por causa de sua própria cor; isto pode ser evitado fazendo-se as leituras de transmitância a dois λ diferentes.

O complexo pode ser extraído por vários solventes orgânicos: álcool isoamílico é vantajoso. É importante que todo o ferro esteja na forma férrica; isto pode ser assegurado adicionando excesso de solução de KMnO_4 acidificada. O excesso de KMnO_4 é rapidamente reduzido pelo tiocianato e não dá cor. Acidez usada: 0,05 - 1 N em HCl ou HNO_3 ; $\lambda_{\text{máx}} = 480$ nm.

b) Método da orto-fenantrolina /75, 76/

A determinação se baseia no complexo vermelho-alarandado $[(C_{12}H_8N_2)_3Fe]^{++}$ formado por o-fenantrolina com o íon ferroso.

O método da 1,10-fenantrolina pode ser considerado padrão para a determinação colorimétrica de traços de ferro. É adaptável a muitos tipos de amostra, a cor é estável e intensa o suficiente para que quantidades muito pequenas de ferro possam ser prontamente determinadas, abaixo de 0,1 ppm.

O ferro precisa estar no estado ferroso; cloreto de hidroxilamina é normalmente usado para assegurar a redução, mas hidroquinona e hipofosfito de sódio também podem ser usados. A amostra deve estar em solução e o pH da amostra deve ser ajustado para 2,0 - 6,0. Uma vez que a cor é desenvolvida, é estável por diversos meses. Aldeídos, cetonas e agentes oxidantes interferem por consumir a hidroxilamina. $\lambda_{\text{máx}} = 510 \text{ nm}$; $\epsilon = 11.100 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

c) Método da Batofenantrolina /75/

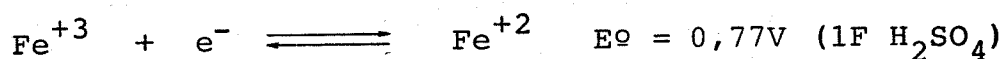
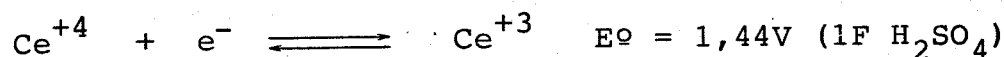
(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)

O coeficiente de extinção molar do complexo ferroso é muito maior (22.350) $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ que para a 1,10-fenantrolina, e pode ser extraído de soluções aquosas com alguns solventes imiscíveis como álcool isoamílico e álcool n-hexílico. $\lambda_{\text{máx}} = 533 \text{ nm}$. O reagente é consideravelmente mais caro que seu parente; entretanto, em casos em que a sensibilidade de 1,10-fenantrolina é suficiente, não é necessário substituir pela batofenantrolina. Seu

uso, entretanto, aumenta a capacidade de métodos colorimétricos a 5 ppb, ou cerca de 20 vezes mais sensível que a fenantrolina. Serve para determinar traços de Fe em águas, soro sanguíneo, urina, vinho e alguns metais.

II.5.2. Titulação potenciométrica de óxi-redução /77, 78/

Um eletrodo de platina responde rapidamente a muitos importantes pares oxidação-redução e desenvolve um potencial que é dependente da relação entre a concentração (atividade) dos reagentes e produtos das semi-reações. Por exemplo, um eletrodo de platina e eletrodo de calomelano saturado podem ser empregados para a titulação de Fe(II) com Ce(IV); as duas semi-reações são:



O eletrodo é sensível às duas semi-reações tal que seu potencial pode ser calculado a partir da razão:

$$\frac{[\text{Ce}^{+3}]}{[\text{Ce}^{+4}]} \quad \text{ou de} \quad \frac{[\text{Fe}^{+2}]}{[\text{Fe}^{+3}]}$$

Isto é, a interação entre as espécies ocorre até que os poten-

ciais de meia-cela sejam idênticos; e o potencial de eletrodo pode ser então considerado como o potencial de um dos pares.

II.5.3. Absorção atômica /77, 78/

Mede-se a radiação absorvida pelos átomos neutros no estado fundamental.

A absorção atômica tem se tornado o mais usado método instrumental analítico para a determinação de baixas concentrações de metais em uma grande variedade de amostras. Para a análise de ferro, as medidas são efetuadas a 248 nm com chama de óxido nitroso-acetileno. Com essa chama, a faixa ótima de trabalho é 6 - 60 µg/mL em solução aquosa. A sensibilidade do ferro a 248 nm é 0,15 µg/mL para 1% de absorção e limites de detecção de 0,01 - 0,03 µg/mL podem ser alcançados.

A espectrofotometria de absorção atômica permite determinar em torno de 65 elementos, na faixa de 1 a 10 ppm, com uma precisão de $\pm 1\%$ ou melhor.

II.5.4. Emissão atômica /77, 78/

O fundamento da espectroscopia de emissão é a propriedade que têm os átomos e os íons monoatômicos em estado gasoso, quando térmica ou eletricamente excitados, de emitir radiações características nas regiões UV e visível. O conjunto de radia-

ções características emitidas por uma espécie atômica ou iônica constitui o seu espectro de emissão. A caracterização do comprimento de onda de uma radiação permite identificar o elemento emissor. A medida da intensidade da radiação pode servir para a determinação da concentração do elemento emissor.

A fonte energética deve volatilizar a amostra e converter os componentes individuais em átomos ou íons monoatômicos e deve fornecer energia suficiente para promover a excitação eletrônica das espécies atômicas ou iônicas.

Os limites de detecção variam para cada elemento. Vão desde ppm até ppb.

Lee e Clydesdale /79/ apresentaram um trabalho em que propõem métodos para determinar todas as formas do ferro: elementar, solúvel, iônico e complexada. As principais técnicas utilizadas são espectrofotometria de absorção atômica e a determinação colorimétrica usando batofenantrolina.

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Material

III.1.1. Instrumental

As medidas de volume da solução padrão de sulfato ferroso para análise por espectrofotometria de absorção atômica foram feitas com uma Microbureta Metrohm, utilizando-se uma ponteira de 0,5000 mL.

As medidas de pH das amostras e das soluções tampões foram feitas em um pHmetro Micronal B 221 utilizando-se um eletrodo de vidro combinado.

Para centrifugar soluções, quando necessário, utilizou-se uma centrífuga Fanem Excelsa-2 a 2.000 rpm.

A digestão de amostras por via úmida foi feita utilizando-se um bloco de digestão Tecnal modelo TE 4025 com tubos de 250 mL e a digestão de amostras por via seca (calcinação) foi feita numa mufla Fanem modelo 413 a 550°C.

Para efetuar as pesagens de amostras e reagentes utilizou-se uma balança analítica Ainsworth com desvio = $\pm 0,0001$ g.

A determinação de ferro nas amostras de urina e fezes dos ratos foram feitas em um Espectrofotômetro de absorção atômica Perkin-Elmer 5.000.

As medidas de absorbância do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ e do complexo $[\text{Fe}(\text{ofen})_3]^{2+}$ durante as análises de vitamina C e ferro de soluções modelo e do suco de laranja foram feitas em um Espectrofotômetro Micronal B 295 III com cubetas de 1,25 cm.

As medidas de absorvância para determinar a taxa de hemoglobina do sangue dos ratos foram feitas em um Espectrofotômetro Bausch & Lomb Spectronic 20 com cubetas de 1,00 cm.

III.1.2. Material de vidro

O material de vidro utilizado para medidas de volume, tais como pipetas de transferência e buretas foram aferidos em temperatura entre 20 e 25°C. Pipetas graduadas foram utilizadas sem aferimento.

Balões volumétricos utilizados para preparar soluções padrão foram aferidos entre 20 e 25°C.

Foram utilizados tubos de ensaio com tampa rosqueada, com capacidade de 15 e 30 mL, para efetuar as reações e análises em sistema bifásico.

Foi utilizada uma pipeta automática com ponteira de 20 µL para coletar o sangue dos ratos.

Foram utilizados cadinhos de porcelana para digestão de amostras por via seca (calcinação) e tubos de digestão de 250 mL para digestão de amostras por via úmida.

III.1.3. Reagentes

Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico:

- 2,2'-biquinolina (cuproína, $C_{18}H_{12}N_2$) da marca Riedel-de-Haën, MM 256,31 g/mol.
- 1,10-fenantrolina ($C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$) da marca Riedel-de-Haën, MM 196,23 g/mol.
- ácido L(+) ascórbico ($C_6H_8O_6$) da marca Merck, MM 176,13 g/mol.
- sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) da marca Merck, MM 278,02 g/mol.
- cloridrato de hidroxilamina ($NH_2 \cdot OH \cdot HCl$) da marca Riedel-de-Haën, MM 69,49 g/mol.
- acetato cúprico ($Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$) da Carlo Erba, MM 199,64 g/mol.
- acetato de sódio anidro ($C_2H_3NaO_2$) da Riedel-de-Haën, MM 82,03.
- ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) da Riedel-de-Haën, MM 210,148.
- ácido metafosfórico (HPO_3) da Riedel-de-Haën, MM 79,98.
- hidróxido de sódio (NaOH) da Ecibra, MM 40,00.

- ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido acético e ácido nítrico da marca Merck.

- álcool isoamílico da marca Reagen submetido à purificação mediante tratamento com sal de cobre (II) e destilação /23/.

- etanol absoluto e tolueno da marca Merck submetidos ao mesmo tratamento para purificação que o álcool isoamílico.

- clorofórmio das marcas Merck ou Riedel-de-Haën.

III.1.4. Amostras de suco de laranja

Foram utilizadas duas marcas comerciais de suco de laranja concentrado de duas indústrias do Estado de São Paulo, sem adição de conservantes nem sacarose.

III.1.5. Material utilizado para o ensaio biológico

- 36 ratos da linhagem Wistar Hannover.

- 36 gaiolas metabólicas de aço inox.

- componentes para preparar a ração, quais sejam: caseína (USP), óleo de soja ou de milho (comercial), mistura mine

ral, mistura vitamínica, amido (maisena) e açúcar (sacarose), suco de laranja concentrado liofilizado.

A composição da mistura mineral foi a seguinte:

para 100,00 g de mistura

carbonato de cálcio (CaCO_3)	40,84 (g)
bifosfato de potássio (KH_2PO_4)	38,90
cloreto de sódio (NaCl)	13,93
sulfato de magnésio (MgSO_4)	5,73
sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0,40
sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,05
sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,04
cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,002
iodeto de potássio (KI)	0,079

A composição da mistura vitamínica foi a seguinte:

para 1.000,00 g de mistura

vitamina A	3,60 (g)
vitamina D_3	1,00
vitamina E	10,00
ácido ascórbico (vitamina C)	45,00
cloreto de tiamina (B_1)	1,00
cloreto de piridoxina (B_6)	1,00
biotina	0,02
pantotenato de cálcio	3,00
ácido fólico	0,09
riboflavina	1,00
cianocobalamina (B_{12})	1,35

inositol	5,00
menadiona	2,25
ácido p-aminobenzóico	5,00
niacina	4,50
dextrose	766,19
cloreto de colina	150,00

III.2. Métodos

III.2.1. Preparo de soluções

Solução 1 - solução de ácido ascórbico: foi preparada uma solução contendo 400 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico em água destilada, a qual foi diluída no momento da análise para dar 40 $\mu\text{g/mL}$ (0,227 $\mu\text{moles/mL}$) ou outra concentração de acordo com o experimento. A solução foi protegida da luz e utilizada imediatamente.

Solução 2 - solução de sulfato ferroso heptahidratado: foi preparada uma solução contendo 126,83 $\mu\text{g/mL}$ em Fe^{2+} , que foi diluída no momento do uso para dar 12,683 $\mu\text{g/mL}$ (0,227 $\mu\text{moles/mL}$) ou outra concentração de acordo com o experimento. A solução foi protegida da luz e utilizada imediatamente.

Solução 3.I - solução de cuproína (2,2' - biquinolina) em tolueno: foi preparada dissolvendo-se 100 mg de cuproína em 50,0 mL de tolueno. A solução foi protegida da luz e guardada em geladeira.

Solução 3.II - solução saturada de cuproína em etanol: adicionou-se aproximadamente 100 mg de cuproína a 100,0 mL de etanol. A solução foi protegida da luz, agitada no misturador (shaker) por uma hora e conservada em geladeira.

Solução 4.I - solução de acetato cúprico em álcool isoamílico: utilizou-se 0,075 g de acetato cúprico para cada 100,0 mL de álcool isoamílico (0,075%), agitando-se até dissolver.

Solução 4.II - solução de acetato cúprico em água: utilizou-se 0,075 g de acetato cúprico para cada 100,0 mL de água destilada (0,075%).

Solução 5.I - reagente de complexação I: foi preparado misturando-se 10,0 mL da solução de cuproína em tolueno (3.I) com 90,0 mL da solução de acetato cúprico em álcool isoamílico (4.I) ou seja, na proporção de 1:9, respectivamente.

Solução 5.II - reagente de complexação II: foi preparado misturando-se três partes em volume da solução de cuproína em etanol (3.II) com uma parte em volume da solução de acetato cúprico em água (4.II) ou seja, na proporção de 3:1, respectivamente.

Solução 6 - solução de orto-fenantrolina 0,50% (m/V) em etanol 50% (V/V), protegida da luz e conservada em geladeira.

Solução 7 - solução de cloreto de hidroxilamina 10% em água destilada: foram dissolvidos 10,0 g de cloreto de hidroxilamina para 100,0 mL de solução.

Solução 8 - solução tampão acetato 0,50 M: preparou-se ácido acético 0,50 M e acetato de sódio 0,50 M, que foram misturadas para dar soluções com pH 2,65, 4,65 e 6,00. Tampões com molaridades menores foram preparados a partir de soluções mais diluídas do ácido e do sal.

Solução 9 - solução tampão citrato 0,50 M: foi preparada a partir de solução de ácido cítrico 0,50 M, levando-se ao pH desejado pela adição de gotas de uma solução saturada de hidróxido de sódio. Tampões com molaridades menores foram preparados da mesma maneira, partindo-se de soluções mais diluídas do ácido.

Solução 10 - solução tampão metafosfato 0,50 M: foi preparada segundo o mesmo procedimento utilizado para o preparo da solução 9.

Solução 11 - solução tampão misto: foi preparada a partir de solução tampão acetato $5,0 \times 10^{-2}$ M e solução tampão citrato $6,25 \times 10^{-3}$ M e NaCl adicionado para dar $6,0 \times 10^{-2}$ M na solução final.

Solução 12 - suco de laranja diluído: foi preparado diluindo-se 1,00 g do suco concentrado para 50,0 mL com água destilada. A solução foi descartada após uma hora.

Solução 13 - solução de Drabkin's: dissolveu-se 1,00 g de NaHCO_3 , 52,0 mg de KCN e 198 mg de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em água e diluiu-se para um litro. Estocou-se em frasco escuro.

III.2.2. Determinações analíticas

III.2.2.1. Determinação de ácido ascórbico por redução de Cu^{2+} em sistema bifásico

O método foi o relatado por Contreras et alii / 23 /, porém foi investigada também a influência do pH e da natureza do tampão, aspectos não abordados na pesquisa original. O método consiste na redução de Cu^{2+} pelo ácido ascórbico, gerando Cu^+ que forma um complexo púrpura com a 2,2'-biquinolina (cuproína). Um mol de ácido ascórbico reduz dois moles de Cu^{2+} que formam 2 moles de $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ avaliado a 545 nm.

O sistema analítico consta de uma fase orgânica de álcool isoamílico carregando o Cu^{2+} e a cuproína (reagente de complexação I) e de uma fase aquosa tamponada que contém o ácido ascórbico. A reação ocorre por agitação energética das duas fases. O complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ fica na camada orgânica. O uso da reação em duas fases evita a redução de Cu^{2+} por outros redu

tores que reagem mais lentamente que o ácido ascórbico e que, em alguns extratos, são relativamente importantes /80/.

Os estudos sobre a influência dos tipos de tampões de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do complexo foram realizados com tampão acetato, citrato e metafosfato 0,50 M de pH 2,65, 4,00, 4,65 e 6,00. Para tanto, os volumes dos reagentes e sua ordem de adição foram os seguintes:

Amostras Reagentes ^a (mL)	1	2	3	4	Branco
Sol. tampão	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sol. H ₂ Asc. ^b	0,50	1,00	1,50	2,00	0,00
Água	3,50	3,00	2,50	2,00	4,00
Reagente de Complexação I	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00

^a - Ordem de adição

^b - A concentração da solução de ácido ascórbico (H₂Asc) utilizada nos experimentos foi de 0,227 μ moles/mL, ou seja, $2,27 \times 10^{-4}$ moles/L.

Os tubos foram agitados vigorosamente por dois minutos e, após a separação de fases (ou centrifugação a 2.000 rpm), avaliou-se a absorbância da fase orgânica a 545 nm. Com esses dados calculou-se o valor de ϵ' para cada condição.

III.2.2. Determinação de Fe^{2+} por redução de Cu^{2+} em sistema bi fásico

A determinação de Fe^{2+} por redução de Cu^{2+} e posterior complexação do Cu^+ com cuproína não havia sido relatado na literatura. Nesta pesquisa foi de importância primordial estabelecer sob quais condições seria possível determinar o teor de Fe^{2+} pelo método da cuproína, já que dessa maneira, usando apenas uma reação química, ter-se-ia a informação sobre o destino da vitamina C e do Fe^{2+} em suco de laranja enriquecido com sulfato ferroso.

O procedimento foi o mesmo adotado para o ácido ascórbico: testaram-se a influência da molaridade e do pH dos tampões acetato, citrato e metafosfato para verificar sob quais condições a determinação de Fe^{2+} seria quantitativa. Os reagentes foram os seguintes:

Reagentes ^a (mL)	Amostras				
	1	2	3	4	Branco
Sol. tampão	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sol. Fe^{2+}	0,25	0,50	1,00	2,00	0,00
Água	3,75	3,50	3,00	2,00	4,00
Reagente de Complexação I	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00

^a - Ordem de adição

As etapas seguintes foram as mesmas já descritas para a determinação de ácido ascórbico.

III.2.2.3. Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} em sistema bifásico

A mistura de quantidades equimolares de ácido ascórbico e de Fe^{2+} foi estudada seguindo o mesmo procedimento utilizado para os compostos individuais nos tampões acetato, citrato e metafosfato 0,50 M em pH 2,65, 4,65 e 6,00. Cada seqüência utilizou os volumes indicados:

Amostras Reagentes ^a (mL)	1	Branco
	Sol. tampão	1,00
Sol. H_2Asc	1,00	0,00
Água	2,00	4,00
Reagente de Complexação I	5,00	5,00
Sol. Fe^{2+}	1,00	0,00

^a - Ordem de adição

III.2.2.4. Adaptação do sistema bifásico para um sistema monofásico

O sistema bifásico, pelo fato de precisar de agitação e centrifugação, limitou bastante os estudos da reação em tempos inferiores a 5 minutos. Por isso, investigou-se a possibilidade de formular um meio homogêneo. A troca de álcool isoamílico por etanol forneceu um meio monofásico, porém foi preciso verificar em que medida este meio permitiria a reação de redução e se o complexo $\text{Cu}(\text{cuproína})_2^+$ permaneceria solúvel para avaliação espectrofotométrica.

Com essa finalidade, foram planejados experimentos testando concentrações de etanol de 50 a 80% (V/V), em meios de tampão acetato e citrato $2,5 \times 10^{-2}$ M, com pH ajustado em 2,65, 4,65 e 6,00. O esquema para redução do Cu^{2+} por ácido ascórbico em meio etanólico foi o seguinte:

Reagentes ^a (mL)	Etanol (%)		Branco (50)	Branco (80)
	50	80		
Etanol absoluto	2,50	4,00	2,50	4,00
Tampão	0,90	0,90	0,90	0,90
H ₂ Asc (2,5 μmoles/mL)	0,10	0,10	0,00	0,00
Água	1,50	0,00	1,60	0,10
Reag. Compl. II	3,00	3,00	3,00	3,00

^a - Ordem de adição

Concentrações menores que 50% de etanol não foram consideradas por causar precipitação do quelante.

O comportamento do Fe^{2+} em meio etanólico foi estudado de maneira idêntica à do ácido ascórbico. A concentração da solução de Fe^{2+} utilizada foi também de 2,5 $\mu\text{moles/mL}$.

Após avaliar os resultados, a concentração de etanol foi fixada em 72,5% (V/V) para a realização dos experimentos subseqüentes.

III.2.2.5. Determinação de ácido ascórbico e de Fe^{2+} por redução de Cu^{2+} em um sistema de uma fase

A reação foi estudada nos pH 2,65, 4,65 e 6,00 em meios de tampão acetato, citrato e metafosfato, tendo ácido ascórbico, Fe^{2+} ou a mistura equimolar de ambos como agentes redutores. Os volumes dos reagentes e sua ordem de adição nesses experimentos foram os seguintes:

Reagentes ^a (mL)	Amostras				
	1	2	3	4	Branco
Tampão	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Água	1,25	1,00	0,75	0,50	1,50
Amostra	0,25	0,50	0,75	1,00	0,00
Reag. compl. II	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Etanol	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00

a - Ordem de adição

A amostra pode ser a solução de ácido ascórbico, de Fe^{2+} ou suco de laranja diluído. O Reagente de Complexação II (solução 5.II) foi preparado misturando-se uma parte em volume da solução de acetato cúprico em água (solução 4.II) com 3 partes em volume de etanol saturado com cuproína (solução 3.II).

Após a adição dos reagentes, os tubos são levemente agitados e a absorvância da solução medida a 545 nm.

Nas determinações conjuntas de ácido ascórbico e Fe^{2+} a composição do sistema foi a seguinte:

Amostras Reagentes ^a (mL)	1	2	3	4	Branco
Solução tampão	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Água	1,00	0,50	0,00	0,00	1,50
Sol. H_2Asc	0,25	0,50	0,75	1,00	0,00
Sol. Fe^{2+}	0,25	0,50	0,75	1,00	0,00
Reag. compl. II	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Etanol	5,00	5,00	5,00	4,50	5,00

^a - Ordem de adição

Foi estudada também a influência da concentração dos tampões acetato e citrato, na faixa de $2,5 \times 10^{-2}$ M a $2,5 \times 10^{-1}$ M nas determinações conjuntas de ácido ascórbico e de ferro pela redução de íons cúpricos a fim de conhecer-se a concentração mais adequada do tampão para ser utilizada nos experimentos se-

guintes.

Estudou-se ainda o comportamento do sistema em um tampão misto acetato/citrato, tentando-se reproduzir as mesmas condições que seriam encontradas nas determinações de ácido ascórbico e de ferro no suco de laranja diluído.

Avaliou-se também o efeito da força iônica nas reações estudadas através da adição de solução de cloreto de sódio na faixa de $1,0$ a $6,0 \times 10^{-2}$ M a um tampão misto acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M/citrato $3,125 \times 10^{-3}$ M.

Fez-se ainda um estudo para avaliar o tempo de desenvolvimento da cor após as determinações de ácido ascórbico e de Fe^{2+} em várias condições: a) em tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M; b) em tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M/NaCl $4,0 \times 10^{-2}$ M; c) em tampão misto acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M/citrato $3,125 \times 10^{-3}$ M; d) em tampão misto acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M/citrato $3,125 \times 10^{-3}$ M/NaCl $4,0 \times 10^{-2}$ M. Após a adição e mistura dos reagentes, a absorvância foi lida de 10 segundos até 30 minutos.

III.2.2.6. Determinação da concentração de cobre com cuproína por redução com hidroxilamina

A fim de comprovar o valor de ϵ do complexo $\text{Cu}(\text{cuproína})_2^+$ relatado na literatura /76/ foi feita a determinação de Cu^{2+} usando hidroxilamina como redutor em meios de tampão acetato e de citrato $2,5 \times 10^{-2}$ M nos pH 2,65, 4,00, 4,65 e 6,00. O sistema de reação foi composto por:

Reagentes (mL)	Amostras				
	1	2	3	4	Branco
Tampão	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80
Sol. hidroxilamina	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Sol. Cu ²⁺	0,10	0,20	0,40	0,80	-
Água	2,60	2,50	2,30	1,90	2,70
Etanol/cuproína	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00

A solução de Cu²⁺ utilizada era $1,0 \times 10^{-3}$ M. A solução de hidroxilamina era 10% em água e como reagente de complexação utilizou-se etanol saturado com cuproína.

III.2.2.7. Determinação de Fe²⁺ pelo método da orto-fenantrolina

A determinação é baseada no complexo vermelho-alaranjado $[(C_{12}H_8N_2)_3Fe]^{2+}$ formado por o-fenantrolina e o íon ferroso. O íon férrico é reduzido a ferroso com hidrocloreto de hidroxilamina (NH₂.OH.HCl) para a determinação de ferro total. A cor é independente do pH na faixa de 2,0 - 9,0 /76/. A intensidade da cor é proporcional à quantidade de ferro presente e é determinada pela leitura da absorvância da solução a 510 nm, on

de o complexo apresenta o pico de máximo. A constante de absorvidade molar do complexo, ϵ , é de $11.100 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, segundo a literatura /76/.

O método estima o ferro total. O íon ferroso pode ser determinado omitindo a redução com hidroxilamina, e ferro férrico pode então ser obtido por diferença.

As determinações de Fe^{2+} e ferro total foram feitas em meios de tampão acetato 0,50 M, pH 2,65 e 4,65, em tampão citrato 0,50 M, pH 4,65, em HCl 2,0% e em H_2SO_4 0,10 M.

Os reagentes utilizados para a construção da curva padrão em cada condição foram os seguintes:

Amostras Reagentes ^a (mL)	Amostras				
	1	2	3	4	Branco
Tampão ^b	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Água	2,25	2,00	1,75	1,50	2,50
Solução Fe^{2+}	0,25	0,50	0,75	1,00	0,00
Hidroxilamina ^c 15 minutos	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Solução o-fen	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50

a - Ordem de adição

b - ou solução diluída de HCl (2,0%) ou H_2SO_4 0,10 M

c - utilizada (10% em água) nas determinações de Fe total, devendo-se esperar 15 minutos para que a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} ocorra; nas determinações de Fe^{2+} pode ser substituída por água destilada.

A concentração da solução de Fe^{2+} utilizada foi de 0,227 $\mu\text{moles/mL}$ ou seja, $2,27 \times 10^{-4}$ moles/L.

O pH do Branco nas curvas com HCl ou H_2SO_4 era de 3,50.

III.2.3. Estudos da formação de complexo entre ácido ascórbico e Fe^{2+} com soluções puras

III.2.3.1. Experimentos preliminares para acerto de condições

Inicialmente as soluções de ácido ascórbico e de Fe^{2+} utilizadas eram de concentração $2,27 \times 10^{-4}$ M e o meio de reação era de tampão acetato ou citrato $2,5 \times 10^{-2}$ M com pH ajustado em 2,65, 4,65 e 6,00. O tampão (0,50 mL), a solução de ácido ascórbico (1,00 mL) e a solução de Fe^{2+} (1,00 mL) foram misturadas suavemente e esperou-se de zero até 120 minutos. Então, interrompeu-se a reação adicionando-se, sob agitação, o reagente de complexação II (3,00 mL) e diluiu-se com etanol (5,00 mL) para leitura espectrofotométrica a 545 nm. O decréscimo de absorvância que foi registrado, em função do tempo, poderá corresponder à formação de um complexo entre Fe^{2+} e H_2Asc , que subtrairia parte desses reagentes, diminuindo suas concentrações no estado livre. Porém, a diminuição da absorvância poderá ter outras causas, pesquisadas em ensaios posteriores.

III.2.3.2. Experimentos para estimativa da porcentagem de complexo entre Fe^{2+} e H_2Asc em tampão acetato

Neste experimento, o registro da evolução da absorbância da mistura equimolar de Fe^{2+} e H_2Asc foi acompanhado pelo registro paralelo da absorbância do H_2Asc puro e do Fe^{2+} puro. No sistema usou-se apenas tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M de pH 2,65, 4,00 e 4,65, sendo a concentração das soluções de Fe^{2+} e de H_2Asc de $1,25 \times 10^{-3}$ M. Houve também mudanças no volume de tampão e no volume final da mistura de reação, de acordo com o esquema seguinte:

Reagentes (mL)	Mistura (M)	H_2Asc (H)	Fe^{2+} (F)	Branco
Tampão	0,90	0,90	0,90	0,90
Sol. H_2Asc	0,10	0,10	0,00	0,00
Sol. Fe^{2+}	0,10	0,00	0,10	0,00
Água destilada	0,00	0,00	0,00	0,20

Os reagentes foram misturados e deixou-se reagirem de zero a 25 minutos. A reação foi interrompida pela adição do reagente de complexação II (1,50 mL) e diluída com etanol absoluto (2,40 mL) para leitura espectrofotométrica que foi feita 1 minu

to após a adição do reagente de complexação.

O experimento forneceu três valores de absorvância para cada tempo: absorvância (M), absorvância (H) e absorvância F que foram relacionadas na seguinte fórmula para o cálculo da porcentagem de complexo:

$$\text{complexo (\%)} = \frac{S_t - M_t}{S_0} \times 100$$

sendo:

$S_t = H_t + F_t$ = soma das absorvâncias do H_2Asc e do Fe^{2+} no tempo t

H_t = absorvância do H_2Asc no tempo t

F_t = absorvância do Fe^{2+} no tempo t

M_t = absorvância da mistura no tempo t

$S_0 = H_0 + F_0$ = soma das absorvâncias do H_2Asc e do Fe^{2+} no tempo zero

H_0 = absorvância do H_2Asc no tempo zero

F_0 = absorvância do Fe^{2+} no tempo zero

Para obter o valor $S_0 = H_0 + F_0$, o reagente de complexação foi adicionado após o tampão, antes de qualquer um dos reagentes.

III.2.3.3. Experimentos para estimativa da porcentagem de complexo entre Fe^{2+} e H_2Asc em um tampão misto acetato-citrato

Dada a impossibilidade de eliminar o íon citrato do suco de laranja, julgamos apropriado realizar estudos do complexo entre Fe^{2+} e H_2Asc em um tampão mais próximo do real. Para tanto, foi preparado um tampão misto de acetato de sódio $2,50 \times 10^{-2}$ M e citrato de sódio $3,13 \times 10^{-3}$ M (concentração do citrato próxima da que existe no suco diluído) com pH ajustado em 2,65, 4,00 e 4,65. Foi ainda acrescentado cloreto de sódio para dar $6,00 \times 10^{-2}$ M na solução final, como agente de estabilização da cor.

O esquema do experimento foi semelhante ao detalhado para o tampão acetato (item III.2.3.2), mudando apenas o tampão acetato pelo tampão misto com cloreto de sódio. A obtenção das absorvâncias no tempo zero e o cálculo da porcentagem de complexo também seguiram o mesmo procedimento.

III.2.4. Estudos em um sistema natural: suco de laranja concentrado

III.2.4.1. Determinação da acidez total (expressa como ácido cítrico) do suco de laranja concentrado

Titularam-se alíquotas de 5,00 mL de uma solução 5,0% do suco de laranja em água destilada com solução padronizada de NaOH (0,049297 N) usando fenolftaleína como indicador. O ponto final da titulação foi determinado pela mudança de cor da solução de amarelo para rosa ou alaranjado. A porcentagem de ácido cítrico foi obtida pela fórmula:

$$\% \text{ ácido cítrico} = \frac{\text{vol. NaOH} \times N_{\text{NaOH}}}{\text{massa (g) amostra}} \times 100 \times 0,06404$$

que fornece a quantidade de ácido cítrico (em gramas) existente em 100,0 mL de solução.

III.2.4.2. Determinação da concentração de ácido ascórbico (vitamina C) do suco de laranja concentrado

Diluíram-se 12,50 g do suco concentrado para 100,0 mL com água destilada. A solução foi agitada vigorosamente com 5,00 mL de clorofórmio para remover carotenóides, fenóis, taninos, terpenóides e outros compostos que poderiam interferir na deter

minação do ácido ascórbico. Utilizou-se 1,00 mL da camada aquosa (fase superior) e fez-se a determinação química do ácido ascórbico segundo Contreras et alii /23/. Essa determinação foi também feita pelo método proposto em nossa pesquisa, onde se determinou o ácido ascórbico pela reação de redução de íons cúpricos em um sistema de uma fase. O sistema foi composto pelos seguintes reagentes:

- 1,00 mL de tampão acetato pH 4,65
- 1,00 mL do suco diluído (fase superior)
- 3,00 mL do reagente de complexação II
- 5,00 mL de etanol.

A solução é levemente agitada e a absorvância determinada a 545 nm.

III.2.4.3. Determinação da concentração de ferro no suco de laranja concentrado

Diluiu-se 1,00 g do suco concentrado para 50,00 mL com água destilada e agitou-se a solução vigorosamente com 5,00 mL de clorofórmio para remover os componentes sólidos do suco. Utilizou-se 2,00 mL da camada superior para a determinação de ferro. O sistema foi composto pelos seguintes reagentes:

- 2,00 mL do suco diluído
- 1,50 mL de tampão acetato pH 4,65
- 1,00 mL de solução de hidroxilamina
(espera-se 15 minutos).

- 0,50 mL de solução de o-fen.

A solução é levemente agitada e a absorbância medida a 510 nm.

III.2.4.4. Preparo de suco de laranja enriquecido com Fe^{2+} (sulfato ferroso) para estudos de estocagem

Com base no número de moles de vitamina C (ácido ascórbico) existente em cada grama de suco concentrado, preparou-se 100,0 mL de uma solução de sulfato ferroso heptahidratado contendo 828 μmoles de Fe^{2+} por mililitro (equimolar com o teor de ácido ascórbico do suco) e pequenos volumes dessa solução foram adicionados ao suco concentrado misturando-se cuidadosamente para não incorporar ar. As preparações obtidas foram as seguintes:

Amostra I - 500,0 g de suco concentrado, sem adição de Fe^{2+} (controle).

Amostra II - 500,0 g de suco concentrado + 2,0 mL da solução de Fe^{2+} (828 $\mu\text{moles/mL}$).

Amostra III - 500,0 g de suco concentrado + 5,0 mL da solução de Fe^{2+} (828 $\mu\text{moles/mL}$).

Amostra IV - 500,0 g de suco concentrado + 10,0 mL da solução de Fe^{2+} (828 $\mu\text{moles/mL}$).

A proporção entre os números de moles de ácido ascórbico : Fe^{2+} em cada amostra foi:

Amostra I - controle (sem Fe^{2+})

Amostra II - $\text{nH}_2\text{Asc} : \text{nFe}^{2+} = 5:1$

Amostra III - $\text{nH}_2\text{Asc} : \text{nFe}^{2+} = 2:1$

Amostra IV - $\text{nH}_2\text{Asc} : \text{nFe}^{2+} = 1:1$

As amostras I a IV foram subdivididas em três sub-amostras resultando 12 preparações que foram colocadas em frascos de 125 mL de vidro escuro com tampa hermética.

Uma série de quatro amostras: Ia, IIa, IIIa e IVa foi deixada à temperatura ambiente; uma segunda série: Ib, IIb, IIIb e IVb foi estocada em geladeira a $+5,0^\circ\text{C}$ e uma última série: Ic, IIc, IIIc e IVc foi estocada num freezer a $-18,0^\circ\text{C}$.

As amostras foram mantidas nas condições referidas por 55 dias no Experimento de Estocagem 1 e por 49 dias no Experimento de Estocagem 2. O experimento 1 serviu apenas para aprimorar condições operacionais para serem modificadas, se necessário, no experimento 2.

O controle das mudanças nas concentrações de Fe^{2+} e de H_2Asc no decorrer da estocagem foi feito a cada 7 dias.

III.2.4.5. Determinação do teor de vitamina C, da mistura de vitamina C e Fe^{2+} e do Fe^{2+} no suco de laranja durante a estocagem

Na data do controle, o conteúdo do frasco foi misturado suavemente e foram retiradas aproximadamente 5,0 g de suco.

O frasco foi tampado rapidamente e retornado à estocagem. Da quantidade retirada foi pesado 1,00 g de suco e diluído para 50,0 mL com água destilada. Agitou-se vigorosamente com 5,00 mL de clorofórmio e centrifugou-se uma alíquota a 2.000 rpm. A camada superior das amostras II, III e IV foi usada para a determinação da vitamina C + Fe^{2+} remanescentes e a camada superior das amostras I (que não têm ferro adicionado) permite unicamente a determinação da vitamina C.

A reação foi realizada em tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M, pH 4,65, adicionado de cloreto de sódio 0,06 M porém sem citrato (que foi fornecido pelo suco). A ordem de adição e os volumes dos reagentes foram os seguintes:

- 1,00 mL do tampão
- 1,00 mL do suco diluído
- 3,00 mL do reagente de complexação II
- 5,00 mL de etanol.

Os reagentes foram misturados levemente e a absorbância a 545 nm foi registrada após 1 minuto.

A perda relativa de vitamina C e da mistura de vitamina C + Fe^{2+} no período considerado, expressa em porcentagem, foi obtida pela fórmula seguinte:

$$\text{Perda (\%)} = \frac{\text{Abs. no dia 1} - \text{Abs. no dia considerado}}{\text{Abs. no dia 1}} \times 100$$

III.2.4.6. Determinação da concentração de Fe^{2+} do suco durante a estocagem

Foi utilizada a mesma solução diluída e tratada com clorofórmio das amostras II, III e IV, do item anterior. O Fe^{2+} foi determinado pelo método da orto-fenantrolina /75/ de acordo com a seqüência seguinte:

- 1,00 mL de tampão acetato 0,50 M pH 4,65
 - 2,00 mL do suco diluído
 - 1,00 mL de solução de hidroxilamina 10%
- Mistura-se e espera-se 15 minutos.
- 0,50 mL de água destilada
 - 0,50 mL de o-fenantrolina 0,50% em etanol 50%.

A absorvância da solução foi determinada a 510 nm contra um branco em que o suco é substituído por água destilada.

A concentração de ferro foi calculada mediante uma curva padrão de Fe^{2+} com o-fenantrolina em tampão acetato 0,50 M pH 4,65 (Figura 20).

Esse resultado corresponde ao ferro total. O Fe^{2+} é obtido eliminando da reação a hidroxilamina. A perda de Fe^{2+} é calculada como no item anterior.

III.2.4.7. Estudo dos pigmentos do suco de laranja (carotenóides) antes e após a estocagem

A análise dos pigmentos foi feita de acordo com o método a seguir: 10,0 g do suco concentrado foram diluídos para 250,0 mL com água destilada. Em seguida, foi feita uma separação da fração de carotenóides e da fração dos pigmentos solúveis em água, mediante uma partição no sistema de Bligh e Dyer /81/. Para isso, foram colocados em um tubo de 70 mL com tampa de rosca, os seguintes reagentes:

- 18,0 mL do suco diluído
- 20,0 mL de metanol
- 500 mg de bicarbonato de sódio
- 20,0 mL de clorofórmio

O tubo foi agitado vigorosamente por três minutos e as fases foram separadas por centrifugação a 2.000 rpm. Uma alíquota da camada metanol/água (fase superior) foi ajustada para pH 4,00 e a absorvância foi avaliada de 540 até 400 nm em cubetas de 1,25 cm, contra um branco de água destilada. A camada clorofórmica (inferior) foi agitada com Na_2SO_4 anidro e filtrada rapidamente em papel de filtro. Foram feitas leituras espectrofotométricas de 500 a 400 nm em cubetas de 1,25 cm contra um branco de clorofórmio. Os espectros de absorção assim obtidos correspondem às amostras do primeiro e do último dia de estocagem à temperatura ambiente e a $-18,0^\circ\text{C}$.

III.2.4.8. Determinação da concentração de vitamina C (ácido as córbito) no suco de laranja liofilizado

Diluiu-se 1,00 g do suco liofilizado para 50,00 mL com água destilada, agitou-se com 5,00 mL de clorofórmio e procedeu-se de maneira idêntica à utilizada no item III.2.4.2.

III.2.4.9. Determinação da concentração de ferro no suco de la- ranja liofilizado

Diluiu-se 1,00 g do suco liofilizado para 50,00 mL com água destilada, agitou-se com 5,00 mL de clorofórmio e procedeu-se de maneira idêntica à descrita no item III.2.4.3.

III.2.5. Ensaio biológico: efeito da vitamina C (ácido ascórbi- co) sobre a biodisponibilidade de Fe^{2+} na repleção da hemoglobina de ratos anêmicos

Os ratos (36) foram recebidos e classificados por ordem crescente de peso. Foram divididos em blocos de 6 ratos cada, com pesos próximos e em seguida sorteou-se um rato de cada bloco formando-se grupos de 6 ratos cada com pesos médios próxi-
mos. Determinou-se a taxa de hemoglobina retirando-se 20 μ L de sangue através de um pequeno corte na cauda, que foram coloca-

dos em 5,0 mL da solução de Drabkin's (solução 13). Avaliou-se a porcentagem de transmitância da solução resultante a 540 nm e converteu-se em g hemoglobina/100 mL de sangue comparando-se com uma tabela dada pela AOAC /82/. A Tabela 30 mostra esses dados. Em seguida, os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas de aço inoxidável com uma Dieta Padrão isenta de ferro e água deionizada.

Composição da Dieta Padrão:

- proteína (caseína) *	20%
- óleo	8%
- mistura mineral	5%
- mistura vitamínica	2%
- carboidratos	65% , sendo: amido 75% açúcar 25%

* A caseína tem aproximadamente 80% de proteína.

Foram feitas avaliações periódicas de taxa de hemoglobina dos ratos até que se tornassem anêmicos: fase de depleção da hemoglobina. Essa fase durou 55 dias.

De posse desses dados, os ratos foram classificados em 6 grupos de acordo com a taxa de hemoglobina sendo que cada grupo devia ter taxas médias de hemoglobina próximas.

A seguir os ratos foram alimentados com 6 tipos diferentes de dietas (uma para cada grupo) e a taxa de hemoglobina avaliada a cada 2 ou 3 dias até que os ratos tivessem recuperado o nível normal de hemoglobina (fase de repleção). A duração dessa fase foi de 14 dias.

A composição das dietas na fase de repleção encontra-se na tabela a seguir.

Composição das dietas da fase de repleção (em porcentagem)

COMPONENTES	DIETAS					
	A	B	C	D	E	F
caseína	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
óleo de soja	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
mistura mineral sem ferro	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
sulfato ferroso	0,0	≈ 0,014	≈ 0,014	≈ 0,014	≈ 0,014	≈ 0,014
mistura vitamínica sem ácido ascórbico	0,0	2,0	0,0	2,0	2,0	2,0
mistura vitamínica com ácido ascórbico	2,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0
amido	45,0	45,0	45,0	44,5	43,7	34,8
açúcar	15,0	15,0	15,0	10,4	3,6	0,0
suco de laranja liofilizado	0,0	0,0	0,0	5,1	12,6	25,2

Observação: o sulfato ferroso foi adicionado às dietas ao nível de 28,0 mg de Fe²⁺ por Kg de dieta.

III.2.5.1. Métodos de análise

A avaliação da taxa de hemoglobina do sangue dos ratos durante as fases de depleção e de repleção foi feita segundo o método da AOAC /82/, como descrito anteriormente.

O teor de ferro nas fezes após a fase de repleção foi medido por calcinação da amostra, dissolvendo-se as cinzas em ácido clorídrico 10%, avaliando-se o ferro através da formação do complexo com orto-fenantrolina, cuja absorbância é medida a 510 nm /75/.

O teor de ferro na urina após a fase de repleção foi avaliado por espectrofotometria de absorção atômica comparando-se os dados da leitura com uma curva padrão de ferro na faixa de 0,04 a 2,0 ppm, em meio de ácido nítrico 0,2%. As amostras de urina foram tratadas com ácido nítrico em bloco de digestão.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

IV.1. Estudos em Sistema Bifásico

As Figuras 01 a 06 apresentam os resultados das determinações individuais de ácido ascórbico e de Fe^{2+} pela reação de redução de íons cúpricos, em sistema bifásico, em meios de tampão acetato, citrato e metafosfato 0,50 M nos pHs 2,65, 4,00, 4,65 e 6,00. Os dados utilizados para a elaboração dessas figuras encontram-se nas Tabelas A.01 a A.06 (Apêndice).

As Tabelas 01 a 03 apresentam os dados de determinações conjuntas de ácido ascórbico e Fe^{2+} nos mesmos tampões e pHs anteriores.

Tabela 01 - Estudo do efeito do pH na determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema bifásico) em tampão acetato 0,50 M.

pH	Valores de absorvância (545 nm)			
	$2,27 \times 10^{-5} \text{M H}_2\text{Asc}$	$2,27 \times 10^{-5} \text{M Fe}^{2+}$	A obtida	A teórica
2,65	0,57	0,05	0,54	0,62
	0,60	0,04	0,56	0,64
4,65	0,39	0,38	0,74	0,77
	0,39	0,40	0,75	0,79
6,00	0,19	0,34	0,44	0,53
	0,20	0,36	0,42	0,56

Obs.: A obtida é a absorvância obtida na determinação conjunta de H_2Asc e Fe^{2+} e A teórica é a soma das absorvâncias das determinações individuais.

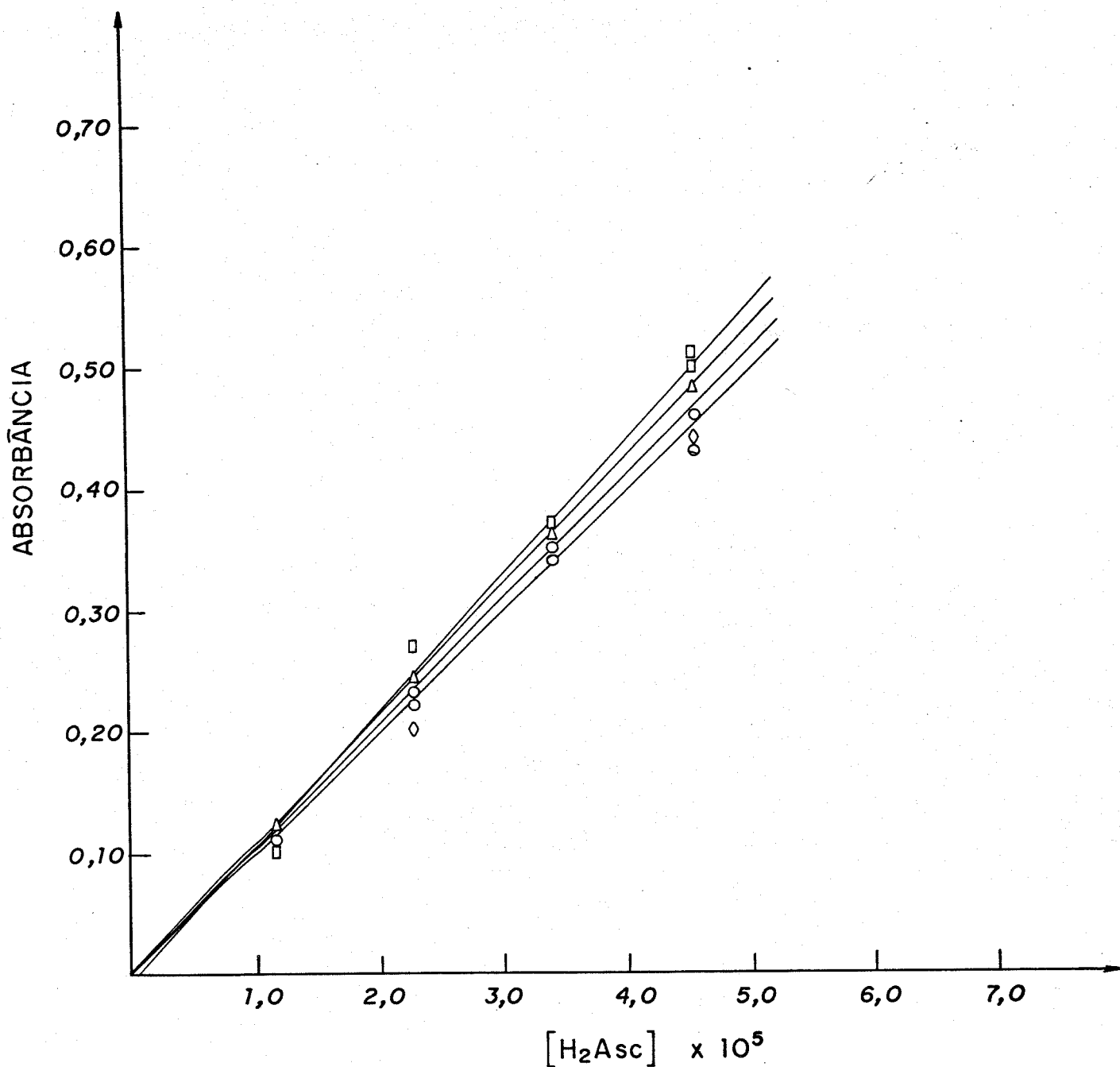


Figura 01

CURVAS DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO $[Cu(CUPROÍNA)_2]^+$ DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM MEIO DE TAMPÃO ACETATO 0,50 M EM SISTEMA BI-FÁSICO. EFEITO DO pH.

	pH	$\epsilon' \times 10^{-3}$ (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Equação da reta	r (coeficiente de correlação)
—○—	2,65	8,30	$y = 0,10x + 0,00$	1,00
—□—	4,00	9,00	$y = 0,11x - 0,01$	1,00
—△—	4,65	9,00	$y = 0,11x + 0,00$	1,00
—◇—	6,00	8,00	$y = 0,10x + 0,00$	0,99

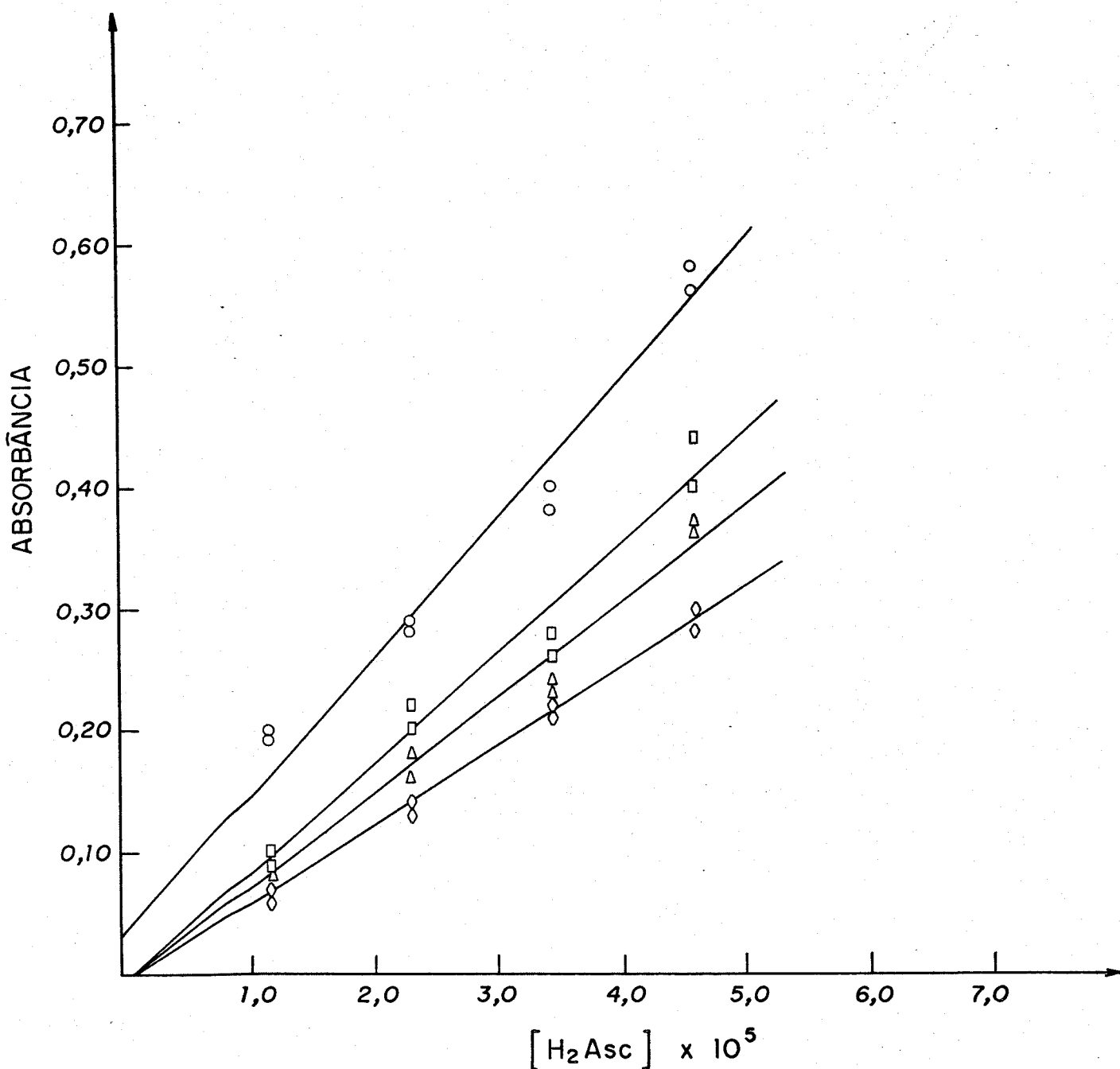


Figura O2

CURVAS DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO $[Cu(CUPROÍNA)_2]^+$ DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM MEIO DE TAMPÃO CITRATO 0,50 M EM SISTEMA BIFÁSICO. EFEITO DO pH.

	pH	$\epsilon' \times 10^{-3}$ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	Equação da reta	r
—○—	2,65	9,60	$y = 0,12x - 0,03$	0,99
—□—	4,00	7,20	$y = 0,09x - 0,01$	0,99
—△—	4,65	6,40	$y = 0,08x - 0,01$	0,99
—◇—	6,00	4,80	$y = 0,06x - 0,01$	1,00

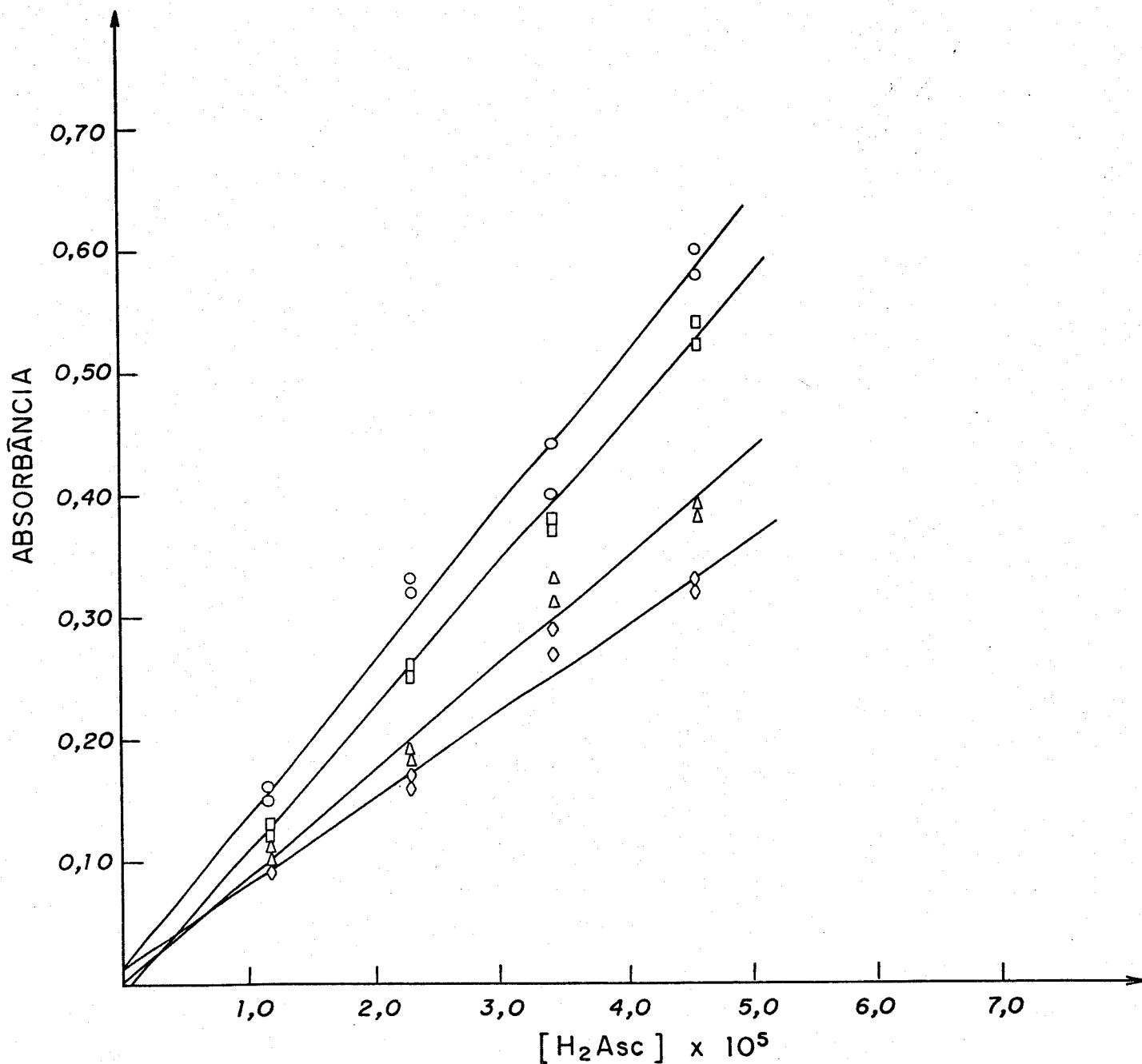


Figura 03

CURVAS DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO $[\text{Cu}(\text{CUPROÍNA})_2]^+$. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM MEIO DE TAMPÃO METAFOSFATO 0,50 M EM SISTEMA BIFÁSICO. EFEITO DO pH.

	pH	$\epsilon' \times 10^{-3}$ (L. mol ⁻¹ . cm ⁻¹)	Equação da reta	r
—○—	2,65	10,4	$y = 0,13x + 0,01$	0,99
—□—	4,00	9,60	$y = 0,12x - 0,01$	1,00
—△—	4,65	7,20	$y = 0,09x + 0,00$	0,99
—◇—	6,00	5,60	$y = 0,07x - 0,01$	0,99

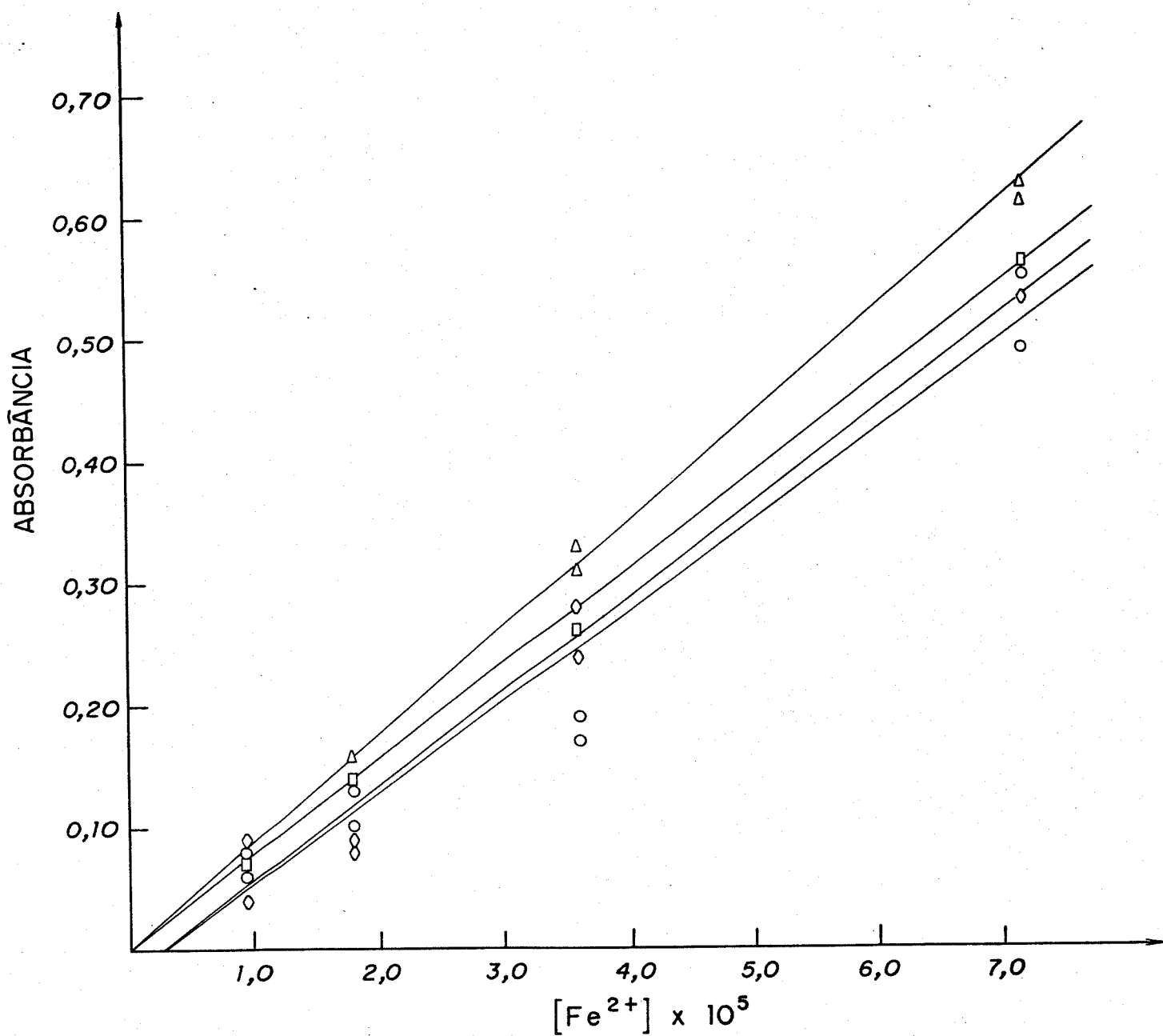


Figura 04

CURVAS DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO $[Cu(CUPROÍNA)_2]^+$. DETERMINAÇÃO DE Fe^{2+} EM MEIO DE TAMPÃO ACETATO 0,50 M EM SISTEMA BIFÁSICO. EFEITO DO pH.

	pH	$\epsilon' \times 10^{-3}$ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)	Equação da reta	r
○	2,65	5,80	$y = 0,07x - 0,02$	0,98
□	4,00	6,70	$y = 0,08x + 0,00$	1,00
△	4,65	6,70	$y = 0,08x + 0,00$	0,99
◇	6,00	6,70	$y = 0,08x - 0,02$	0,99

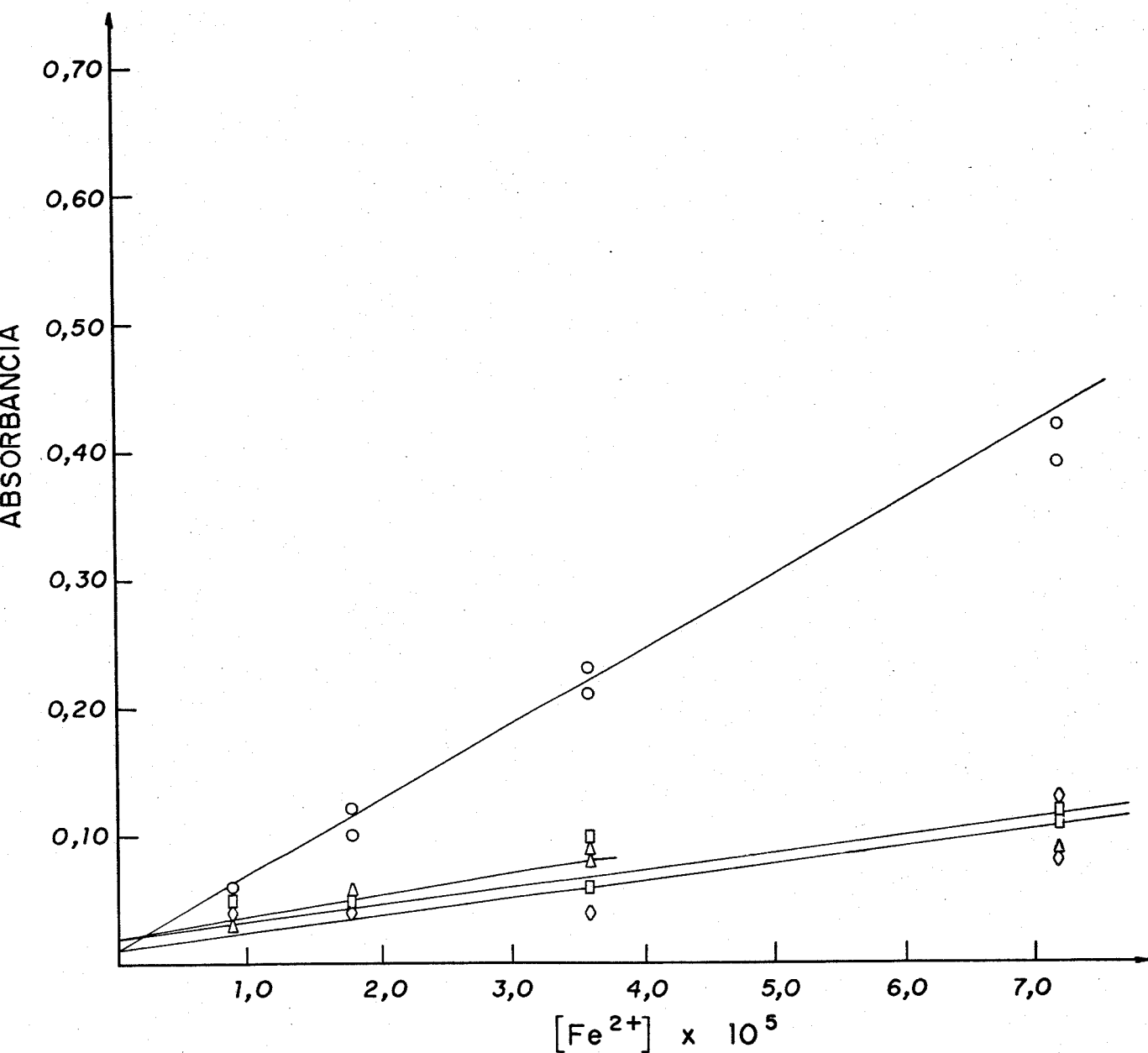


Figura 05

CURVAS DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO $[\text{Cu}(\text{CUPROÍNA})_2]^+$ DETERMINAÇÃO DE Fe^{2+} EM MEIO DE TAMPÃO CITRATO 0,50 M EM SISTEMA BIFÁSICO. EFEITO DO pH.

	pH	$\epsilon' \times 10^{-3}$ ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Equação da reta	r
—○—	2,65	5,00	$y = 0,06x + 0,01$	1,00
—□—	4,00	0,83	$y = 0,01x + 0,02$	0,92
—△—	4,65	1,67	$y = 0,02x + 0,01$	0,96*
—◇—	6,00	0,83	$y = 0,01x + 0,02$	0,86

* DESPREZOU-SE O ÚLTIMO PONTO DA CURVA

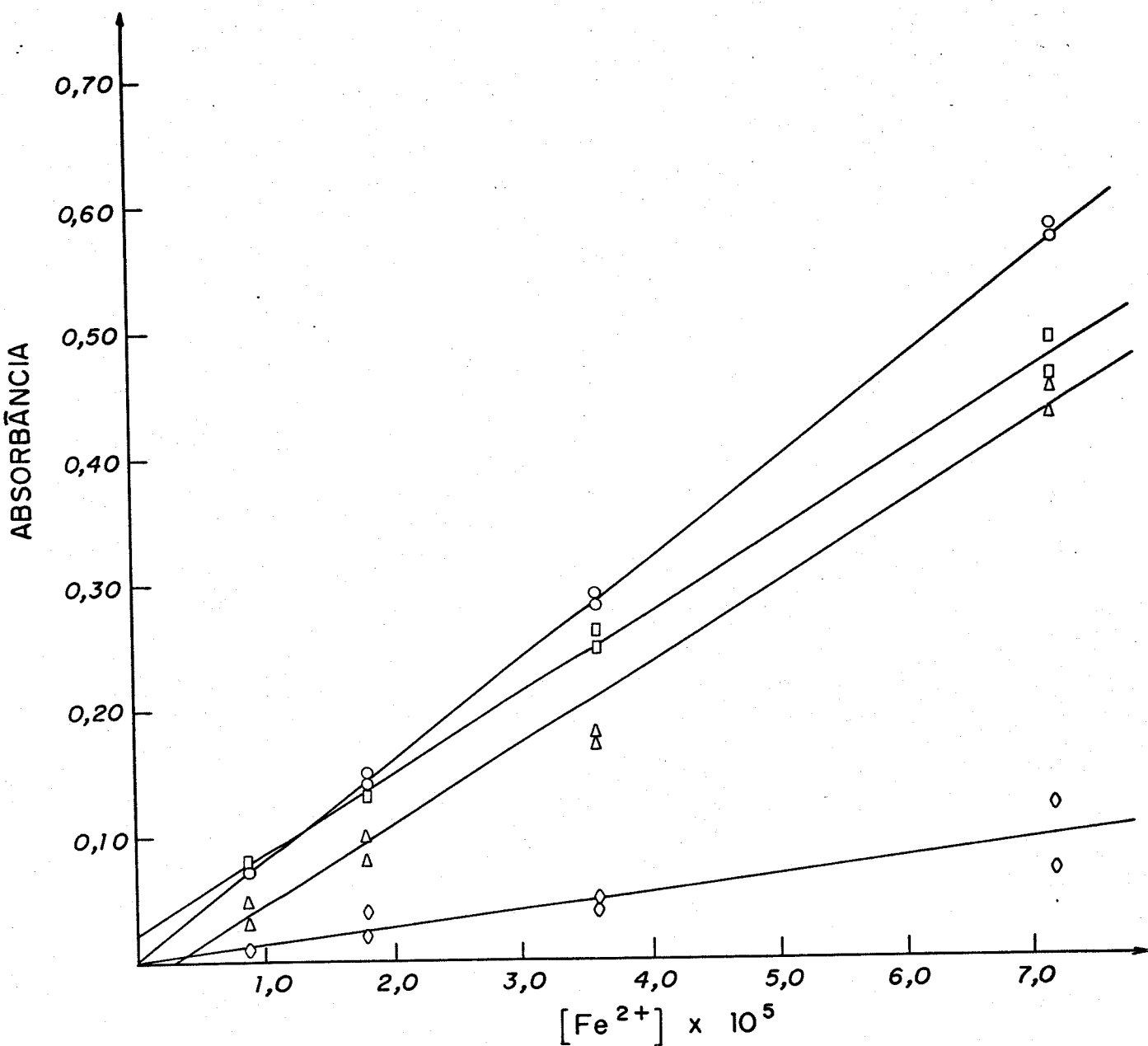


Figura 06

CURVAS DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO $[Cu(CUPROÍNA)_2]^+$. DETERMINAÇÃO DE Fe^{2+} EM MEIO DE TAMPÃO METAFOSFATO EM SISTEMA BIFÁSICO. EFEITO DO pH.

	pH	$\epsilon' \times 10^{-3}$ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)	Equação da reta	r
—○—	2,65	6,70	$y = 0,08x + 0,00$	1,00
—□—	4,00	5,00	$y = 0,06x + 0,02$	1,00
—△—	4,65	5,00	$y = 0,06x - 0,02$	0,99
—◇—	6,00	0,83	$y = 0,01x + 0,00$	0,93

Tabela 02 - Estudo do efeito do pH na determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema bifásico) em tampão citrato 0,50 M.

pH	Valores de absorvância (545 nm)			
	1,00 mL H_2Asc	1,00 mL Fe^{2+}	A obtida	A teórica
2,65	0,47	0,27	0,74	0,74
	0,48	0,25	0,73	0,73
4,65	0,13	0,03	0,31	0,16
	0,13	0,02	0,34	0,15
6,00	0,06	0,02	0,13	0,08
	0,06	0,01	0,15	0,07

Tabela 03 - Estudo do efeito do pH na determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema bifásico) em tampão metafosfato 0,50 M.

pH	Valores de absorvância (545 nm)			
	1,00 mL H_2Asc	1,00 mL Fe^{2+}	A obtida	A teórica
2,65	0,39	0,36	0,74	0,75
	0,34	0,34	0,72	0,68
4,65	0,09	0,03	0,42	0,12
	0,08	0,02	0,44	0,10
6,00	0,02	0,00	0,17	0,02
	0,02	0,00	0,18	0,02

Obs.: A concentração das soluções de H_2Asc e de Fe^{2+} utilizadas foi de $2,27 \times 10^{-4}$ moles/L e o volume total do meio de reação foi de 5,00 mL.

IV.2. Estudos em Sistema de Uma Fase

As Figuras 07 a 15 apresentam os resultados das determinações individuais de ácido ascórbico e de Fe^{2+} pela reação de redução de íons cúpricos, em sistema de uma fase, em meios de tampão acetato, citrato e metafosfato, nos pHs 2,65, 4,00, 4,65 e 6,00, e em diferentes concentrações do tampão. Os dados utilizados para a elaboração dessas figuras encontram-se nas Tabelas A.07 a A.15 (Apêndice).

As Tabelas 04 a 12 apresentam os dados de determinações conjuntas de ácido ascórbico e Fe^{2+} em sistemas de uma fase, nas mesmas condições anteriores.

Tabela 04 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão acetato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 2,65. A $[\text{H}_2\text{Asc}]$ e a $[\text{Fe}^{2+}]$ das soluções utilizadas foram $2,27 \times 10^{-4}$ moles/L, volume total no tubo de reação = 5,00 mL.

Amostra (mL)	Valores de absorvância (545 nm)			
	det. Fe^{2+}	det. H_2Asc	A obtida	A teórica
0,25	0,08	0,18	0,29	0,26
	0,08	0,19	0,30	0,27
0,50	0,18	0,37	0,58	0,55
	0,17	0,37	0,58	0,54
0,75	0,27	0,53	0,86	0,80
	0,28	0,56	0,86	0,84
1,00	0,36	0,75	1,20	1,11
	0,38	0,73	1,20	1,11

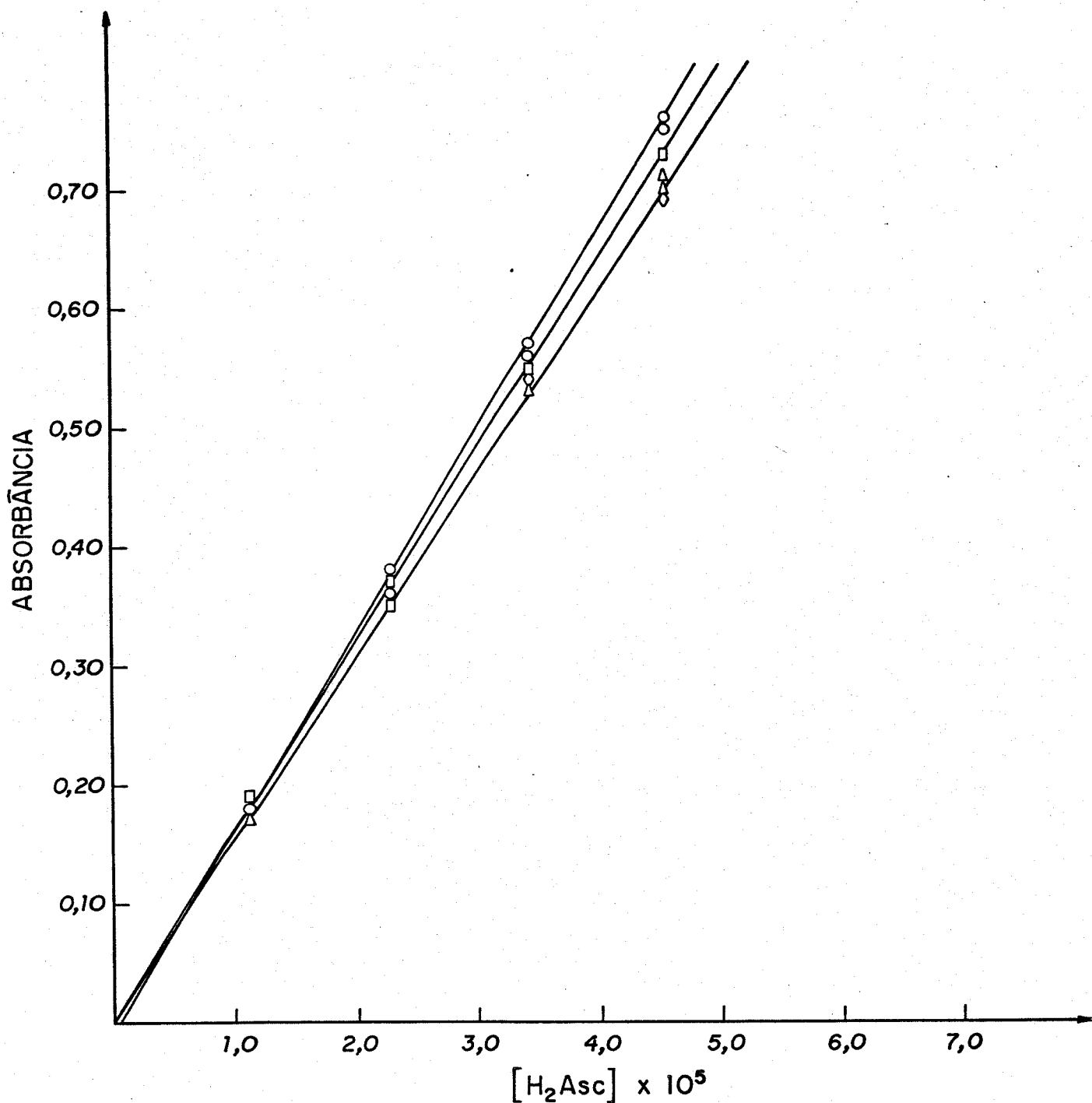


Figura 07

CURVAS DE ABSORÇÃO DE COMPLEXO $[Cu(CUPROÍNA)_2]^+$ DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM MEIO DE TAMPÃO ACETATO 0,50M EM SISTEMA DE UMA FASE. EFEITO DO pH.

	pH	$\epsilon' \times 10^{-3}$ (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Equação da reta	r
—○—	2,65	13,6	$y = 0,17x - 0,01$	1,00
—□—	4,00	12,8	$y = 0,16x + 0,00$	1,00
—△—	4,65	12,8	$y = 0,16x + 0,00$	1,00
—◇—	6,00	12,8	$y = 0,16x + 0,00$	1,00

AS RETAS pH 4,65 E pH 6,00 SÃO COINCIDENTES

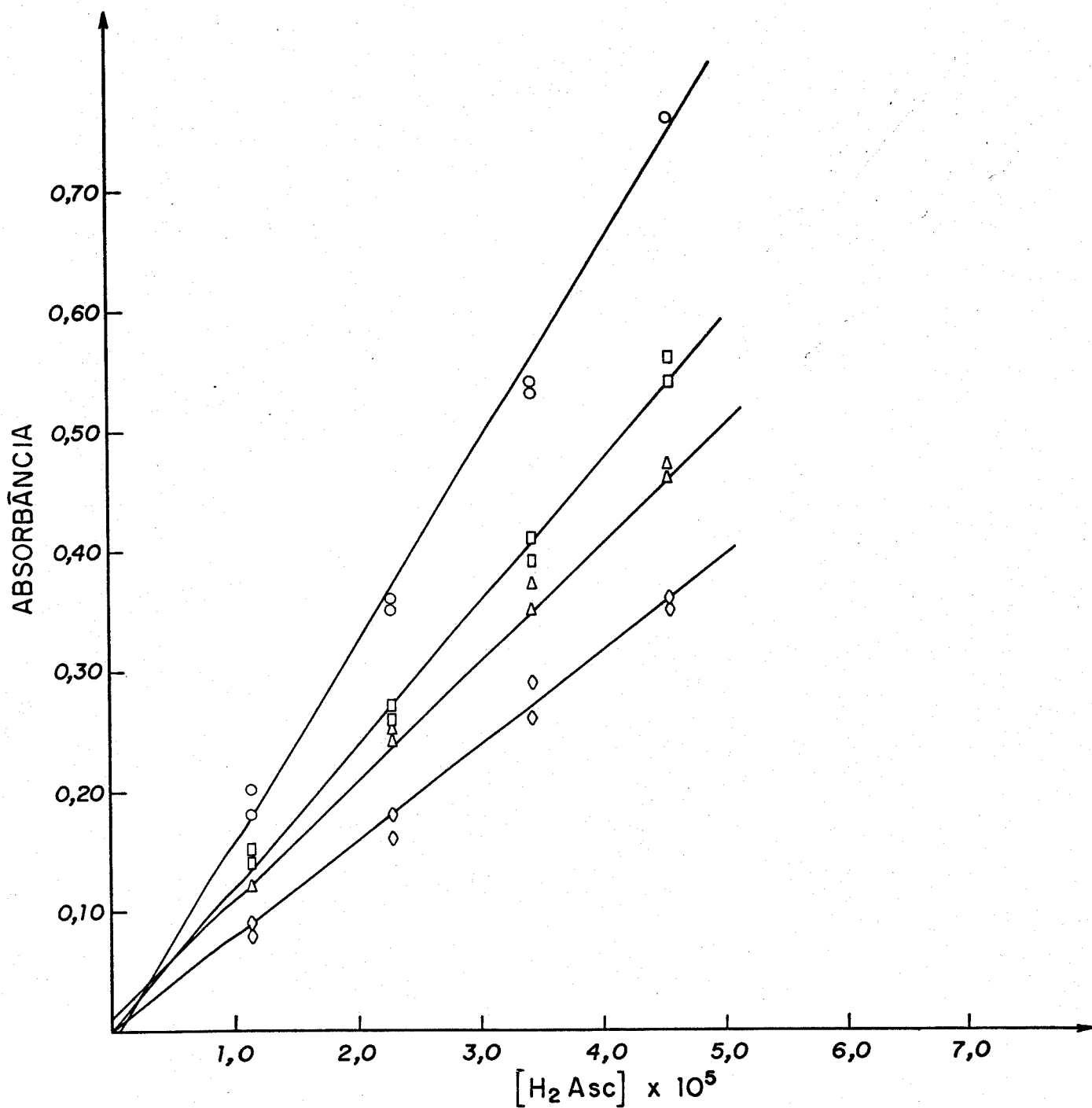
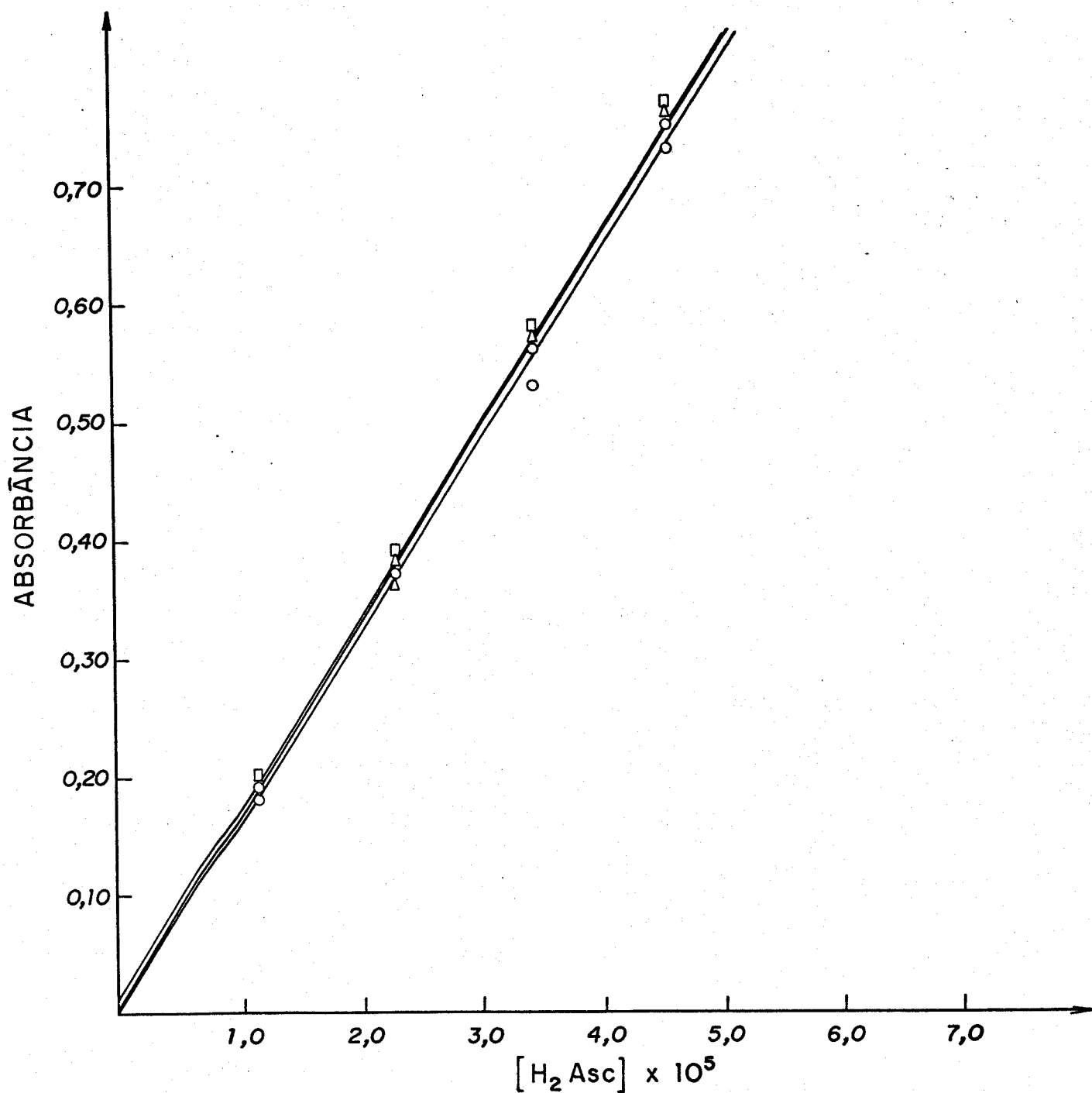


Figura 08

CURVAS DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO $[Cu(CUPROÍNA)_2]^+$. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM MEIO DE TAMPÃO CITRATO 0,50M EM SISTEMA DE UMA FASE. EFEITO DO pH.

	pH	$\epsilon' \times 10^{-3}$ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)	Equação da reta	r
—○—	2,65	12,8	$y = 0,16x - 0,01$	1,00
—□—	4,00	9,60	$y = 0,12x + 0,00$	1,00
—△—	4,65	8,00	$y = 0,10x + 0,01$	1,00
—◇—	6,00	6,00	$y = 0,08x + 0,00$	1,00



Figuras 09

CURVAS DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO $[Cu(CUPROÍNA)_2]^+$. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM MEIO DE TAMPÃO ACETATO $2,5 \times 10^{-2} M$ EM SISTEMA DE UMA FASE. EFEITO DO pH.

	pH	$\epsilon' \times 10^{-3}$ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)	Equação da reta	r
—○—	2,65	12,8	$y = 0,16x + 0,00$	1,00
—□—	4,00	13,6	$y = 0,17x + 0,01$	1,00
—△—	4,65	13,6	$y = 0,17x + 0,00$	1,00
—◇—	6,00	13,6	$y = 0,17x - 0,01$	1,00

AS 4 RETAS SÃO PRATICAMENTE COINCIDETES.

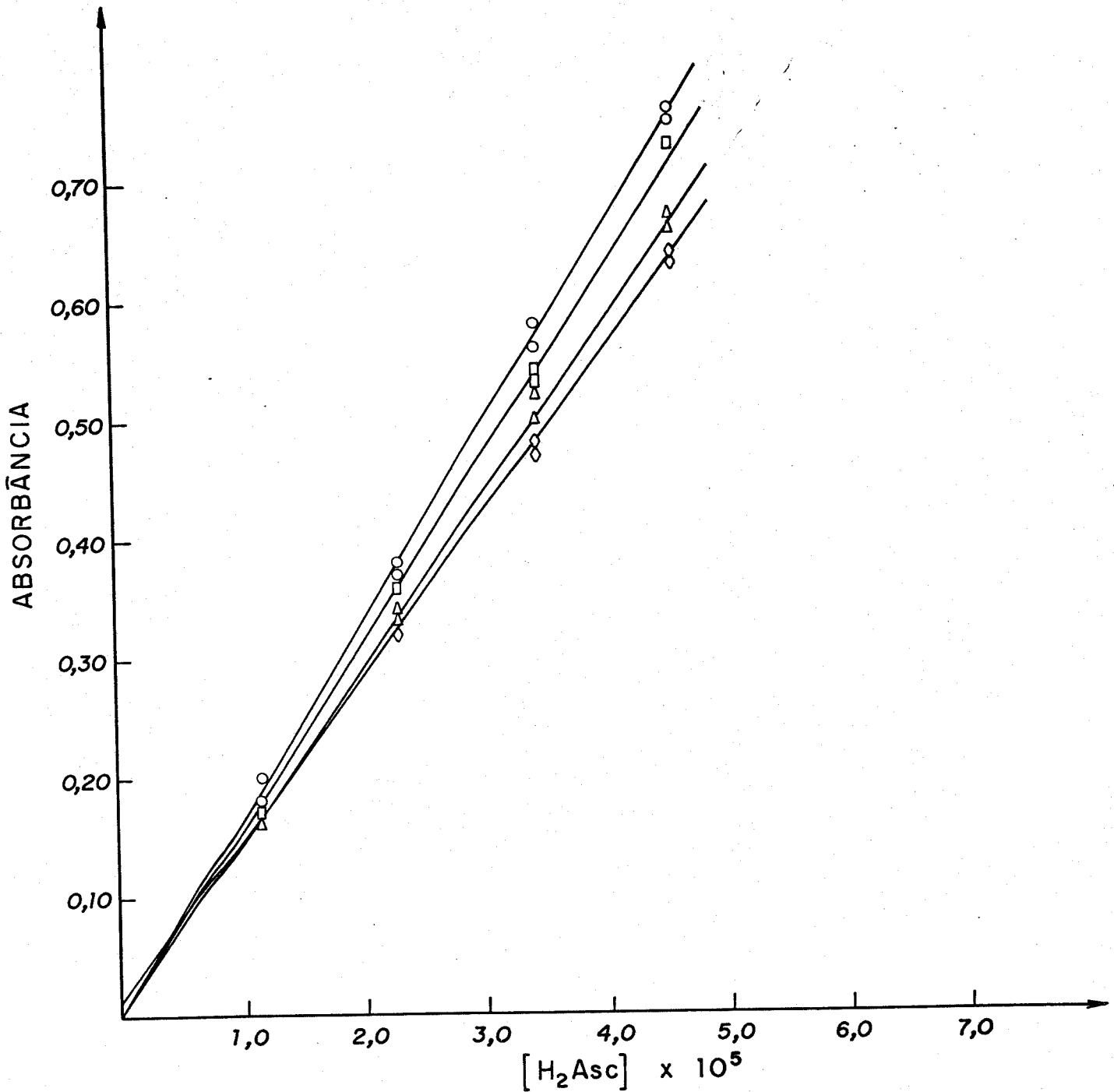


Figura 10

CURVAS DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO $[Cu(CUPROÍNA)_2]^+$. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM MEIO DE TAMPÃO CITRATO $2,5 \times 10^{-2} M$ EM SISTEMA DE UMA FASE. EFEITO DO pH.

	pH	$\epsilon' \times 10^{-3}$ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)	Equação da reta	r
—○—	2,65	13,6	$y = 0,17x + 0,00$	1,00
—□—	4,00	12,8	$y = 0,16x + 0,00$	1,00
—△—	4,65	12,0	$y = 0,15x + 0,00$	1,00
—◇—	6,00	11,2	$y = 0,14x + 0,01$	1,00

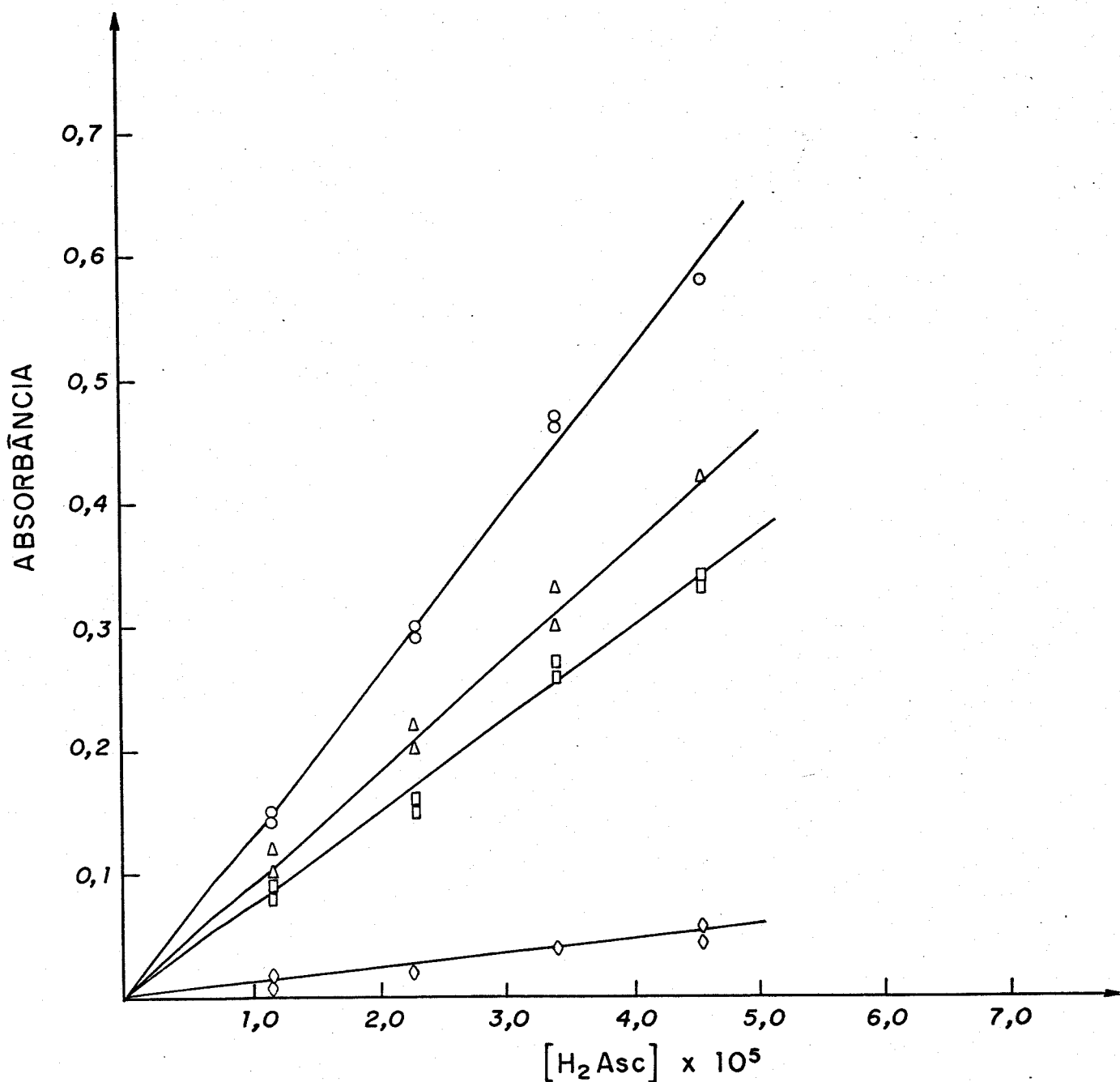


Figura 11

CURVAS DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO $[\text{Cu}(\text{CUPROÍNA})_2]^+$ DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM MEIO DE TAMPÃO METAFOSFATO $2,5 \times 10^{-2} \text{M}$ EM SISTEMA DE UMA FASE. EFEITO DO pH.

	pH	$\epsilon' \times 10^{-3}$ ($\text{L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Equação da reta	r
—○—	2,65	10,0	$y = 0,13x + 0,00$	1,00
—□—	4,00	6,00	$y = 0,08x + 0,00$	1,00
—△—	4,65	7,00	$y = 0,09x + 0,00$	1,00
—◇—	6,00	1,00	$y = 0,01x + 0,00$	0,97

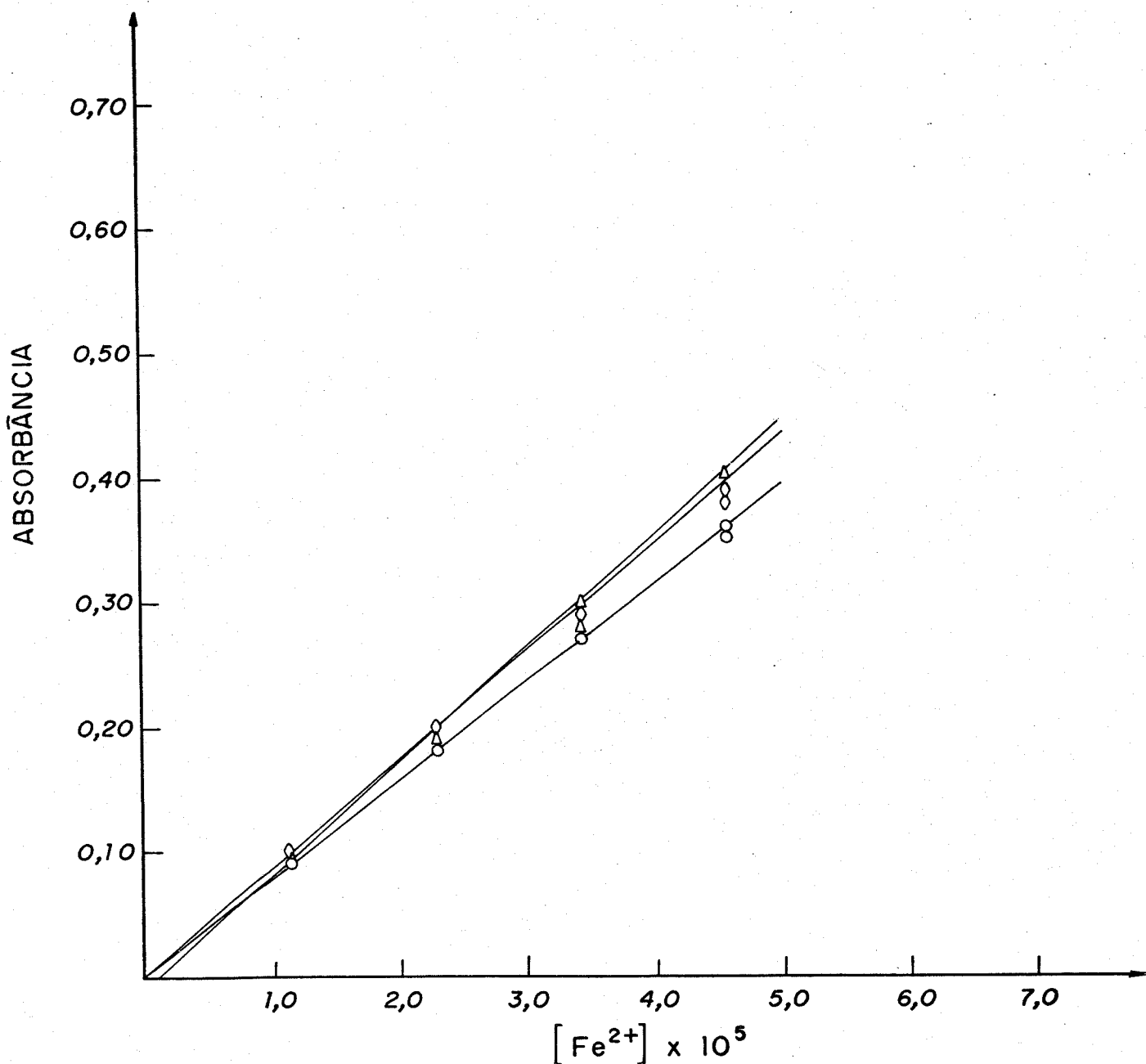


Figura 12

CURVAS DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO $[Cu(CUPROÍNA)_2]^+$. DETERMINAÇÃO DE Fe^{2+} EM MEIO DE TAMPÃO ACETATO 0,50 M EM SISTEMA DE UMA FASE. EFEITO DO pH.

	pH	$\epsilon' \times 10^{-3}$ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)	Equação da reta	r
—○—	2,65	6,00	$y = 0,08x + 0,00$	1,00
—△—	4,65	7,00	$y = 0,09x - 0,01$	1,00
—◇—	6,00	6,00	$y = 0,08x + 0,00$	1,00

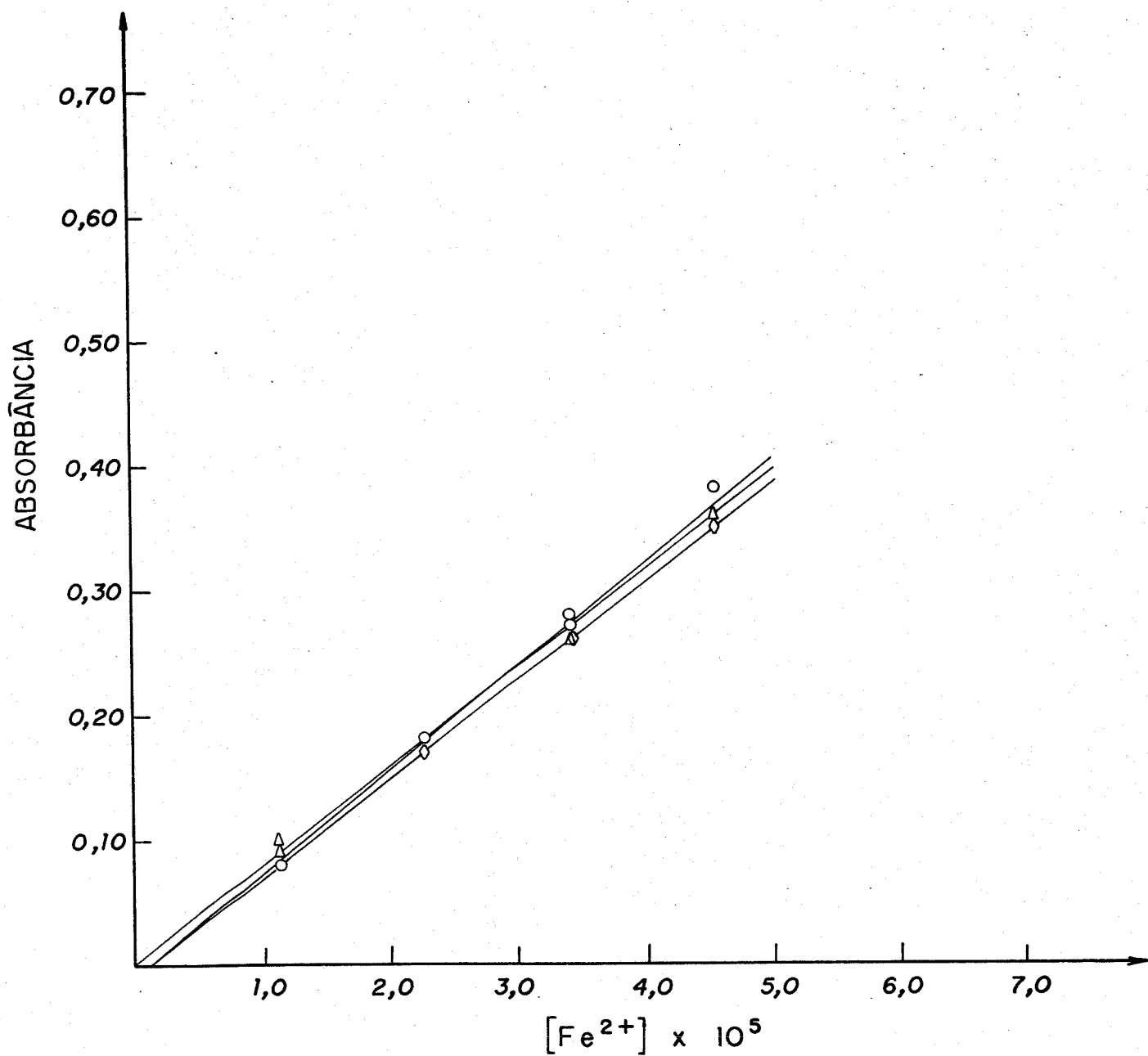


Figura 13

CURVAS DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO $[Cu(CUPROÍNA)_2]^+$. DETERMINAÇÃO DE Fe^{2+} EM MEIO DE TAMPÃO ACETATO $2,5 \times 10^{-2} M$ EM SISTEMA DE UMA FASE. EFEITO DO pH.

	pH	$\epsilon' \times 10^{-3}$ ($L \cdot mol^{-1} cm^{-1}$)	Equação da reta	r
—○—	2,65	6,00	$y = 0,08x - 0,01$	1,00
—△—	4,65	6,00	$y = 0,08x + 0,00$	1,00
—◇—	6,00	6,00	$y = 0,08x + 0,01$	1,00

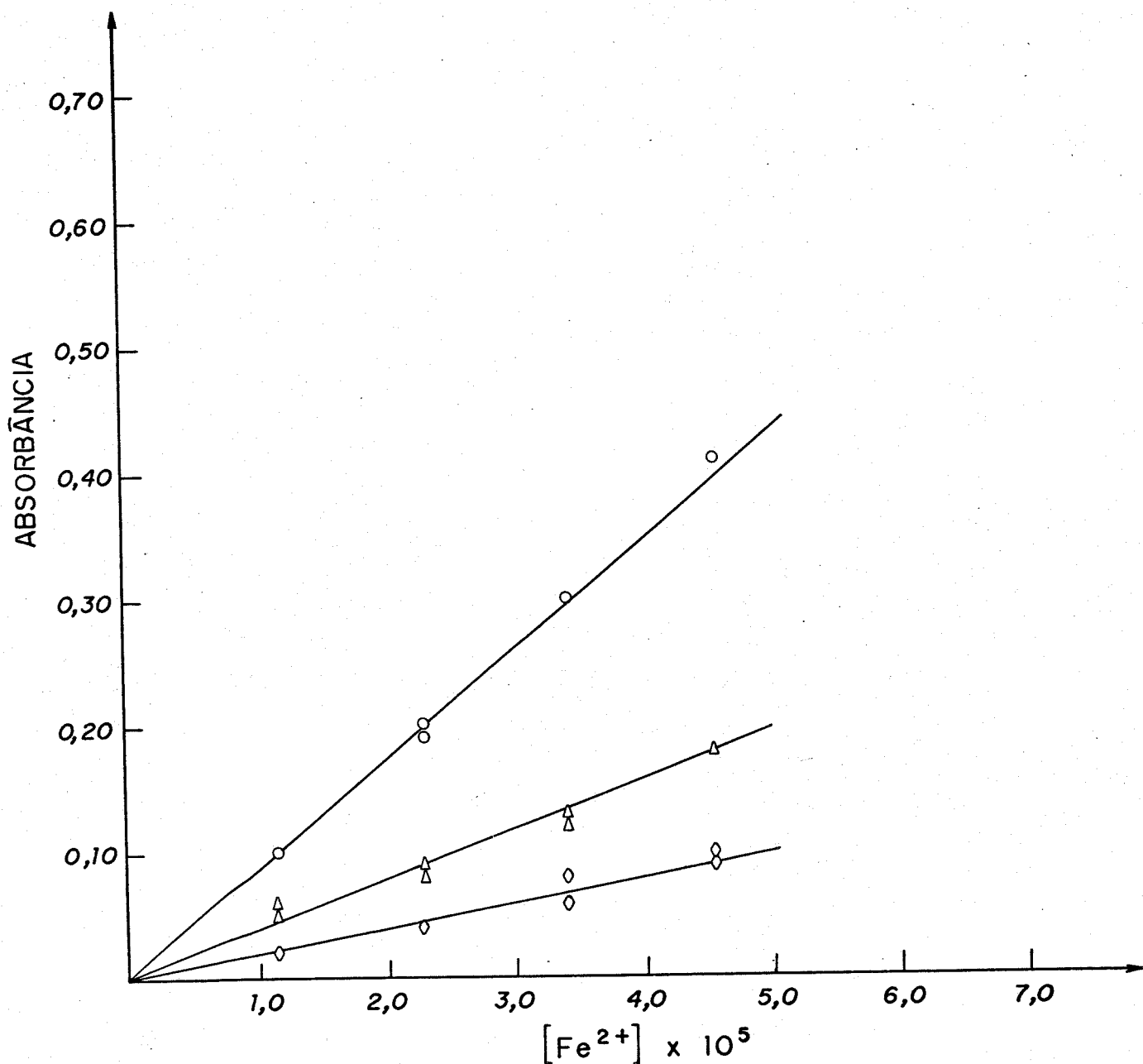


Figura 14

CURVAS DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO $[Cu(CUPROÍNA)_2]^+$ DETERMINAÇÃO DE Fe^{2+} EM MEIO DE TAMPÃO CITRATO $2,5 \times 10^{-2} M$ EM SISTEMA DE UMA FASE . EFEITO DO pH.

	pH	$\epsilon' \times 10^{-3}$ (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Equação da reta	r
—○—	2,65	7,00	$y = 0,09x + 0,09$	1,00
—△—	4,65	3,00	$y = 0,04x + 0,00$	0,99
—◇—	6,00	2,00	$y = 0,02x + 0,00$	0,98

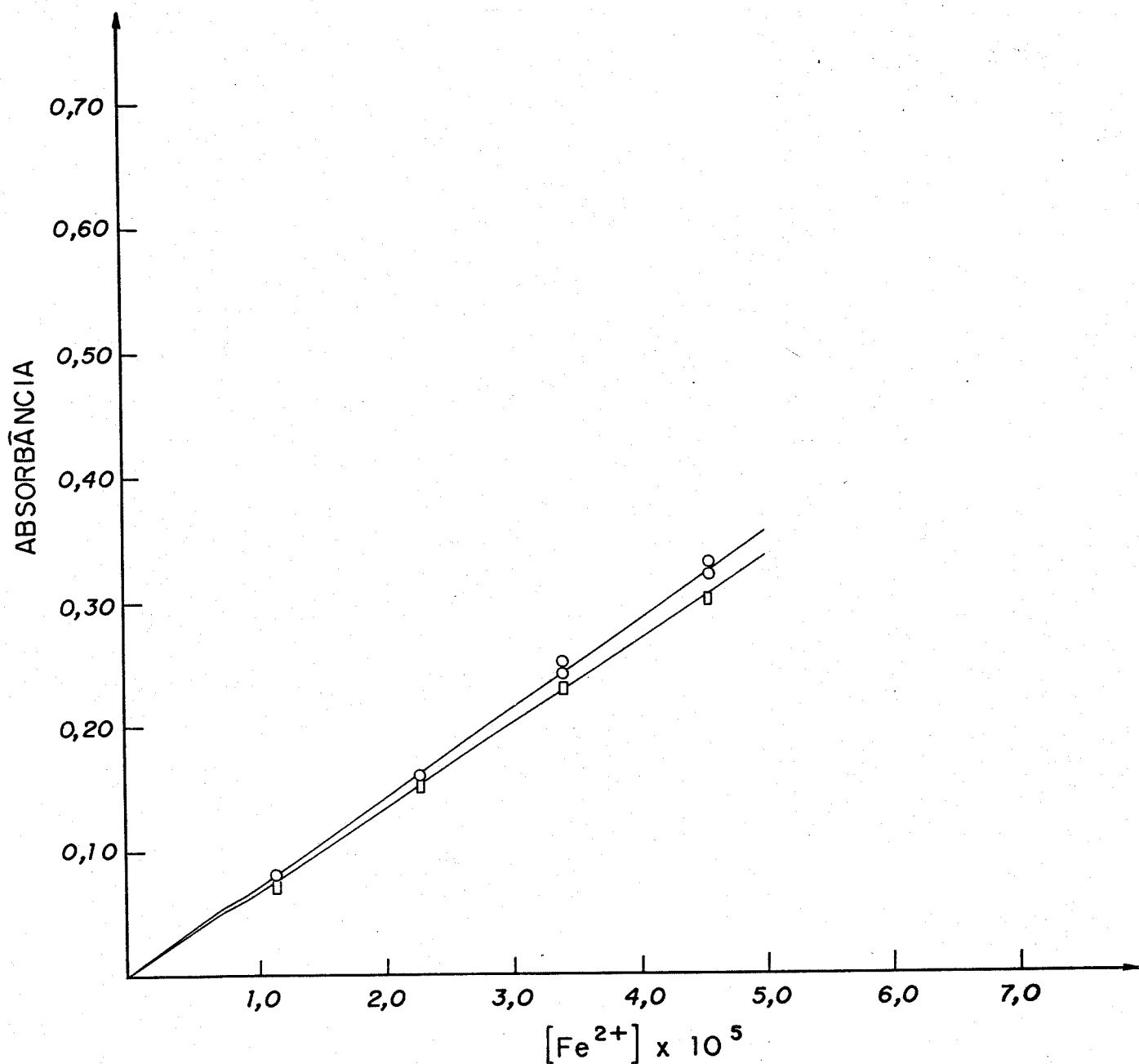


Figura 15

CURVAS DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO $[Cu(CUPROÍNA)_2]^+$. DETERMINAÇÃO DE Fe^{2+} EM MEIO DE TAMPÃO METAFOSFATO $2,5 \times 10^{-2} M$ EM SISTEMA DE UMA FASE. EFEITO DO pH.

	pH	$\epsilon' \times 10^{-3}$ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)	Equação da reta	r
—○—	2,65, 4,65 e 6,00	6,00	$y = 0,07x + 0,00$	1,00 (p/todos)
—□—	4,00	6,00	$y = 0,07x + 0,00$	1,00

Tabela 05 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão acetato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 4,65. $[\text{H}_2\text{Asc}]$ e $[\text{Fe}^{2+}] = 2,27 \times 10^{-4}$ M; V total = 5,00 mL.

Amostra (mL)	Valores de absorvância (545 nm)			
	det. Fe^{2+}	det. H_2Asc	A obtida	A teórica
0,25	0,10	0,18	0,30	0,28
	0,09	0,19	0,30	0,28
0,50	0,18	0,36	0,58	0,54
	0,17	0,36	0,58	0,53
0,75	0,26	0,57	0,88	0,83
	0,26	0,56	0,86	0,82
1,00	0,36	0,74	1,15	1,10
	0,36	0,76	1,15	1,12

Tabela 06 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão acetato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 6,00. $[\text{H}_2\text{Asc}]$ e $[\text{Fe}^{2+}] = 2,27 \times 10^{-4}$ M; V total = 5,00 mL.

Amostra (mL)	Valores de absorvância (545 nm)			
	det. Fe^{2+}	det. H_2Asc	A obtida	A teórica
0,25	0,08	0,17	0,33	0,25
	0,08	0,18	0,33	0,26
0,50	0,17	0,36	0,53	0,53
	0,17	0,36	0,53	0,53
0,75	0,26	0,56	0,67	0,82
	0,26	0,56	0,68	0,82
1,00	0,35	0,74	0,97	1,09
	0,35	0,74	0,93	1,09

Tabela 07 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão citrato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 2,65. $[\text{H}_2\text{Asc}]$ e $[\text{Fe}^{2+}] = 2,27 \times 10^{-4}$ M; V total = 5,00 mL.

Amostra (mL)	Valores de absorvância (545 nm)			
	det. Fe^{2+}	det. H_2Asc	A obtida	A teórica
0,25	0,10	0,20	0,25	0,30
	0,10	0,18	0,24	0,28
0,50	0,19	0,38	0,48	0,57
	0,20	0,37	0,47	0,57
0,75	0,30	0,58	0,70	0,88
	0,30	0,56	0,69	0,86
1,00	0,41	0,75	0,95	1,16
	0,41	0,76	0,93	1,17

Tabela 08 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão citrato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 4,65. $[\text{H}_2\text{Asc}]$ e $[\text{Fe}^{2+}] = 2,27 \times 10^{-4}$ M; V total = 5,00 mL.

Amostra (mL)	Valores de absorvância (545 nm)			
	det. Fe^{2+}	det. H_2Asc	A obtida	A teórica
0,25	0,05	0,16	0,20	0,21
	0,06	0,16	0,20	0,22
0,50	0,08	0,33	0,39	0,41
	0,09	0,34	0,39	0,43
0,75	0,13	0,50	0,56	0,63
	0,12	0,52	0,56	0,64
1,00	0,18	0,66	0,77	0,84
	0,18	0,67	0,76	0,85

Tabela 09 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão citrato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 6,00. $[\text{H}_2\text{Asc}]$ e $[\text{Fe}^{2+}] = 2,27 \times 10^{-4}$ M; V total = 5,00 mL.

Amostra (mL)	Valores de absorvância (545 nm)			
	det. Fe^{+2}	det. H_2Asc	A obtida	A teórica
0,25	0,02	0,17	0,16	0,19
	0,02	0,16	0,17	0,18
0,50	0,04	0,32	0,34	0,36
	0,04	0,33	0,30	0,37
0,75	0,08	0,48	0,48	0,56
	0,06	0,47	0,48	0,53
1,00	0,10	0,63	0,66	0,73
	0,09	0,64	0,64	0,73

Tabela 10 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão metafosfato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 2,65. $[\text{H}_2\text{Asc}]$ e $[\text{Fe}^{2+}] = 2,27 \times 10^{-4}$ M; V total = 5,00 mL.

Amostra (mL)	Valores de absorvância (545 nm)			
	det. Fe^{+2}	det. H_2Asc	A obtida	A teórica
0,25	0,08	0,14	0,22	0,22
	0,08	0,15	0,22	0,23
0,50	0,16	0,30	0,48	0,46
	0,16	0,29	0,48	0,45
0,75	0,25	0,46	0,74	0,71
	0,25	0,47	0,74	0,72
1,00	0,33	0,58	0,96	0,91
	0,32	0,58	0,94	0,90

Tabela 11 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão metafosfato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 4,65. $[\text{H}_2\text{Asc}]$ e $[\text{Fe}^{2+}] = 2,27 \times 10^{-4}$ M; V total = 5,00 mL.

Amostra (mL)	Valores de absorvância (545 nm)			
	det. Fe^{2+}	det. H_2Asc	A obtida	A teórica
0,25	0,07	0,12	0,18	0,19
	0,08	0,10	0,18	0,18
0,50	0,16	0,22	0,38	0,38
	0,16	0,20	0,38	0,36
0,75	0,24	0,30	0,56	0,54
	0,24	0,33	0,56	0,57
1,00	0,32	0,42	0,80	0,74
	0,32	0,42	0,78	0,74

Tabela 12 - Determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (no sistema de uma fase) em tampão metafosfato $2,50 \times 10^{-2}$ M, pH 6,00. $[\text{H}_2\text{Asc}]$ e $[\text{Fe}^{2+}] = 2,27 \times 10^{-4}$ M; V total = 5,00 mL.

Amostra (mL)	Valores de absorvância (545 nm)			
	det. Fe^{2+}	det. H_2Asc	A obtida	A teórica
0,25	0,08	0,01	0,12	0,09
	0,08	0,01	0,12	0,09
0,50	0,16	0,02	0,25	0,18
	0,16	0,02	0,26	0,18
0,75	0,25	0,04	0,36	0,29
	0,24	0,04	0,38	0,28
1,00	0,33	0,06	0,50	0,39
	0,33	0,05	0,50	0,41

A Figura 16 apresenta o estudo da influência da concentração dos tampões acetato e citrato nas determinações de ácido ascórbico e de Fe^{2+} pela reação de redução de íons cúpricos.

A Figura 17 mostra o efeito da adição de NaCl ao tampão misto acetato/citrato ($2,50 \times 10^{-2}$ M / $3,125 \times 10^{-3}$ M) na determinação de ácido ascórbico e de Fe^{2+} pela reação de redução de íons cúpricos, em pH 2,65, 4,00, 4,65 e 6,00.

A Figura 18 apresenta o estudo do tempo de desenvolvimento da cor do complexo $\text{Cu}(\text{cuproína})_2^+$ durante as determinações de ácido ascórbico e de Fe^{2+} em tampões de pH 4,65: a) acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M; b) acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M / NaCl $6,0 \times 10^{-2}$ M; c) acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M / citrato $3,125 \times 10^{-3}$ M; d) acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M / NaCl $2,0 \times 10^{-2}$ M / citrato $3,125 \times 10^{-3}$ M.

A Figura 19 apresenta a curva padrão da determinação de Cu^{2+} com cuproína usando hidroxilamina como redutor, em meios de tampão acetato ou citrato, na faixa de pH de 2,65 a 6,00. Os dados utilizados para a construção dessa figura encontram-se nas Tabelas A.16 e A.17.

As Figuras 20 a 22 apresentam as curvas padrão da determinação de Fe^{2+} com o-fenantrolina em tampão acetato (ou citrato) pH 4,65; em HCl 2,0% e em H_2SO_4 0,10 M. Os dados utilizados para a construção dessas curvas encontram-se nas Tabelas A. 18 a A.22.

As Tabelas 13 e 14 apresentam os resultados do estudo da influência da concentração de etanol nas determinações de ácido ascórbico e de Fe^{2+} pela reação de redução de íons cúpricos, em tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M, em pH 2,65, 4,65 e 6,00.

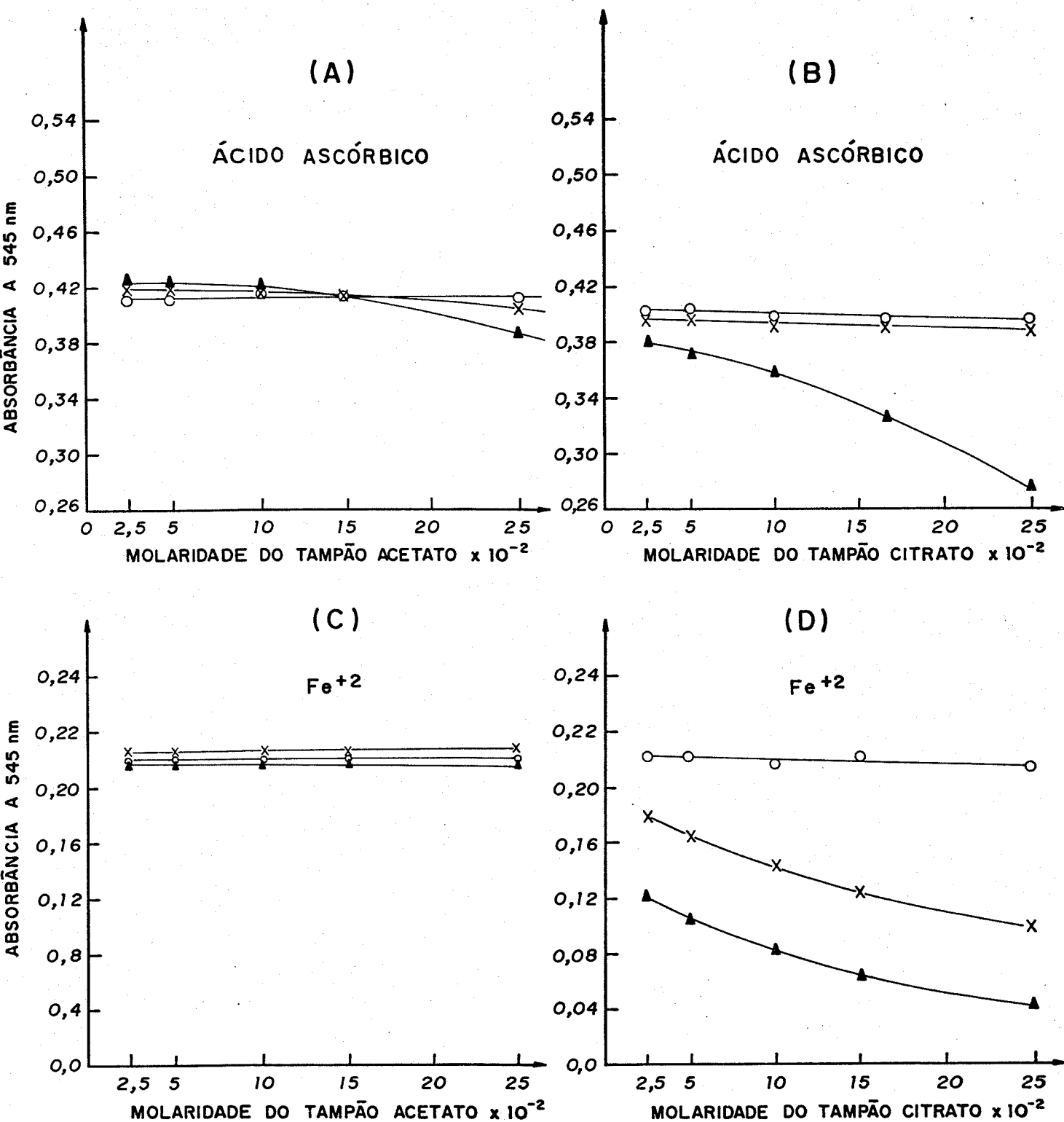
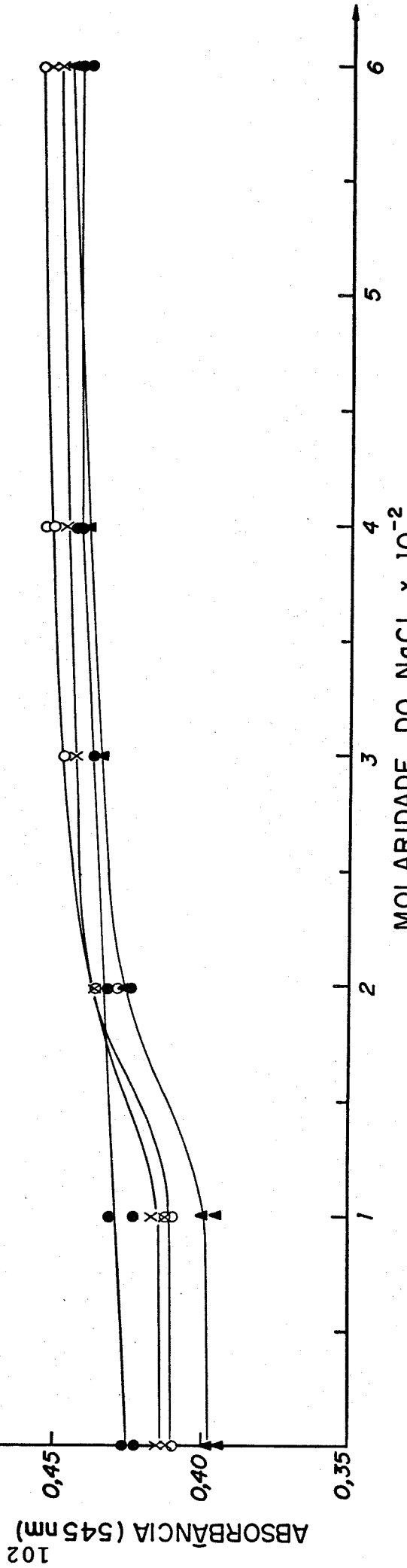


Figura 16

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO MOLAR DOS TAMPÕES ACETATO E CITRATO EM pH 2,65 (○), pH 4,65 (×) E pH 6,0 (▲) NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DE Fe²⁺ PELA REAÇÃO DE REDUÇÃO DE ÍONS CÚPRICOS. [H₂Asc] = [Fe²⁺] = 2,5 x 10⁻⁵ M.

Ácido ascórbico



Fe²⁺

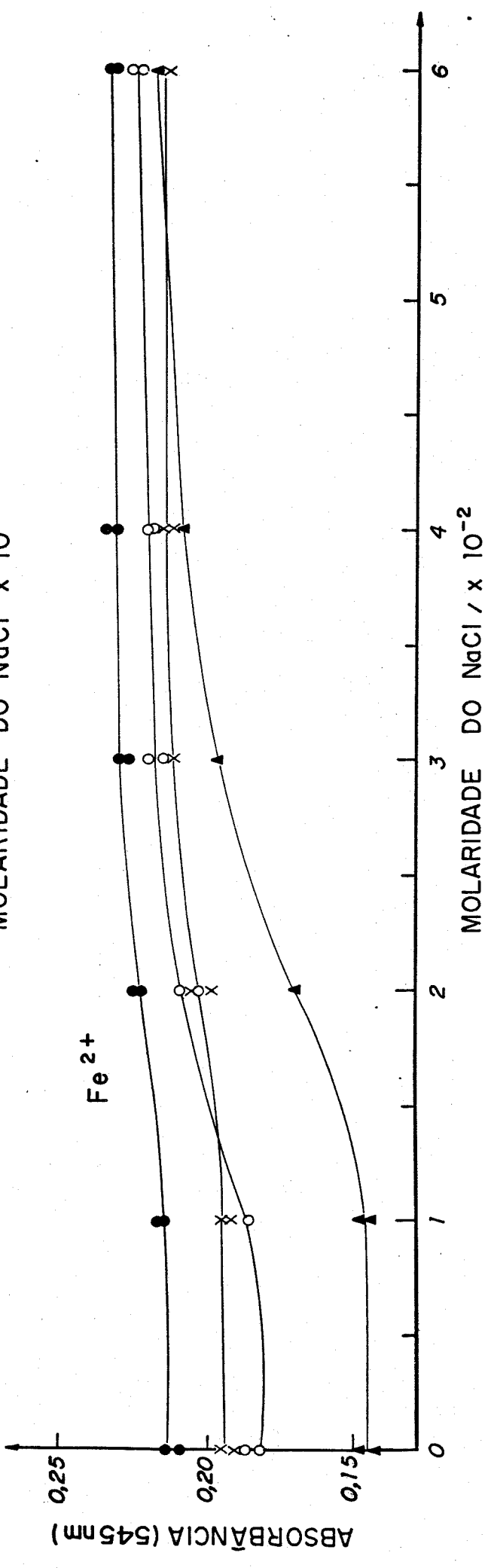


Figura 17

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE NaCl AO TAMPÃO MISTO ACETATO / CITRATO ($2,50 \times 10^{-2} \text{ M} / 3,125 \times 10^{-3} \text{ M}$) NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO E Fe^{2+} PELA REAÇÃO DE REDUÇÃO DE ÍONS CÚPRICOS EM PH 2,65 (●), 4,0 (*), 4,65 (○) E 6,0 (▲).

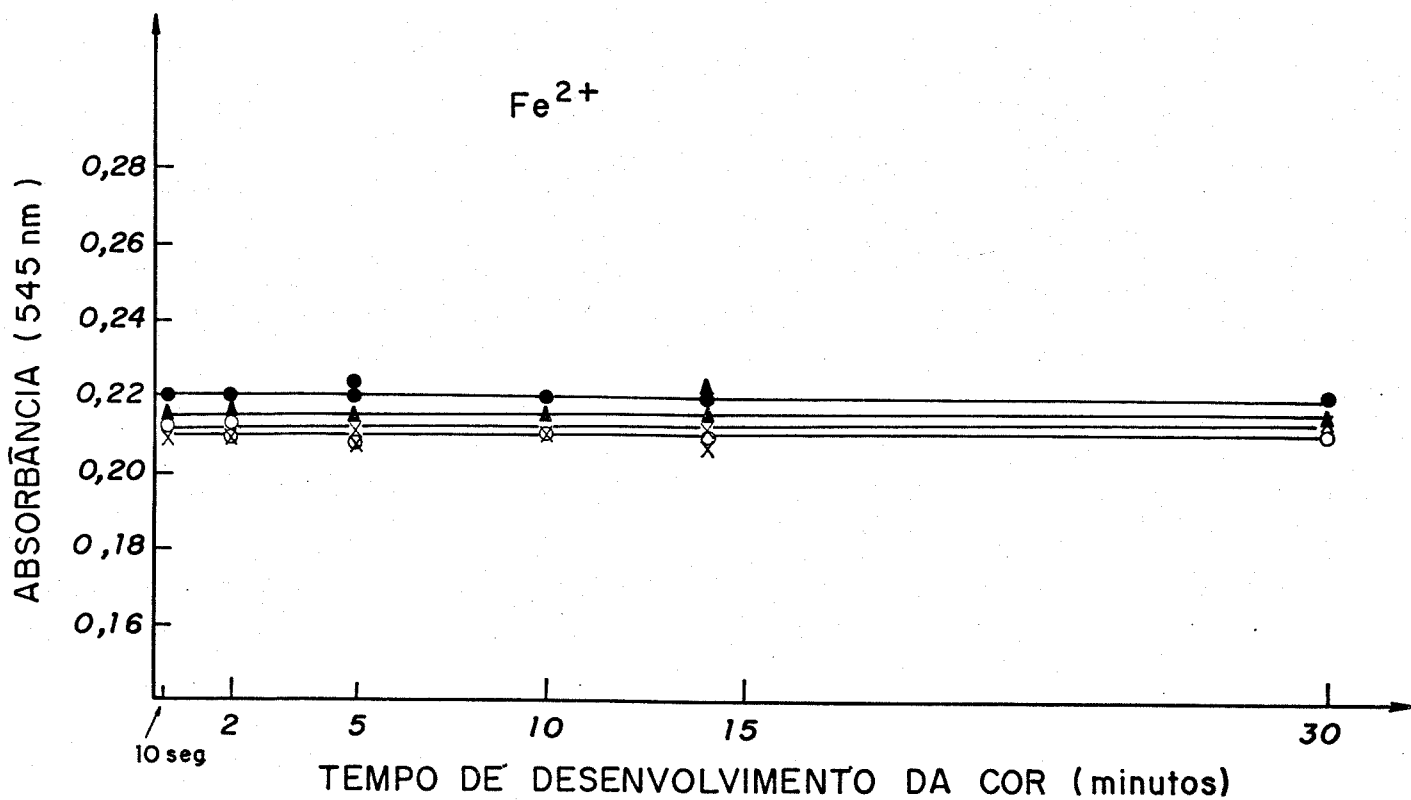
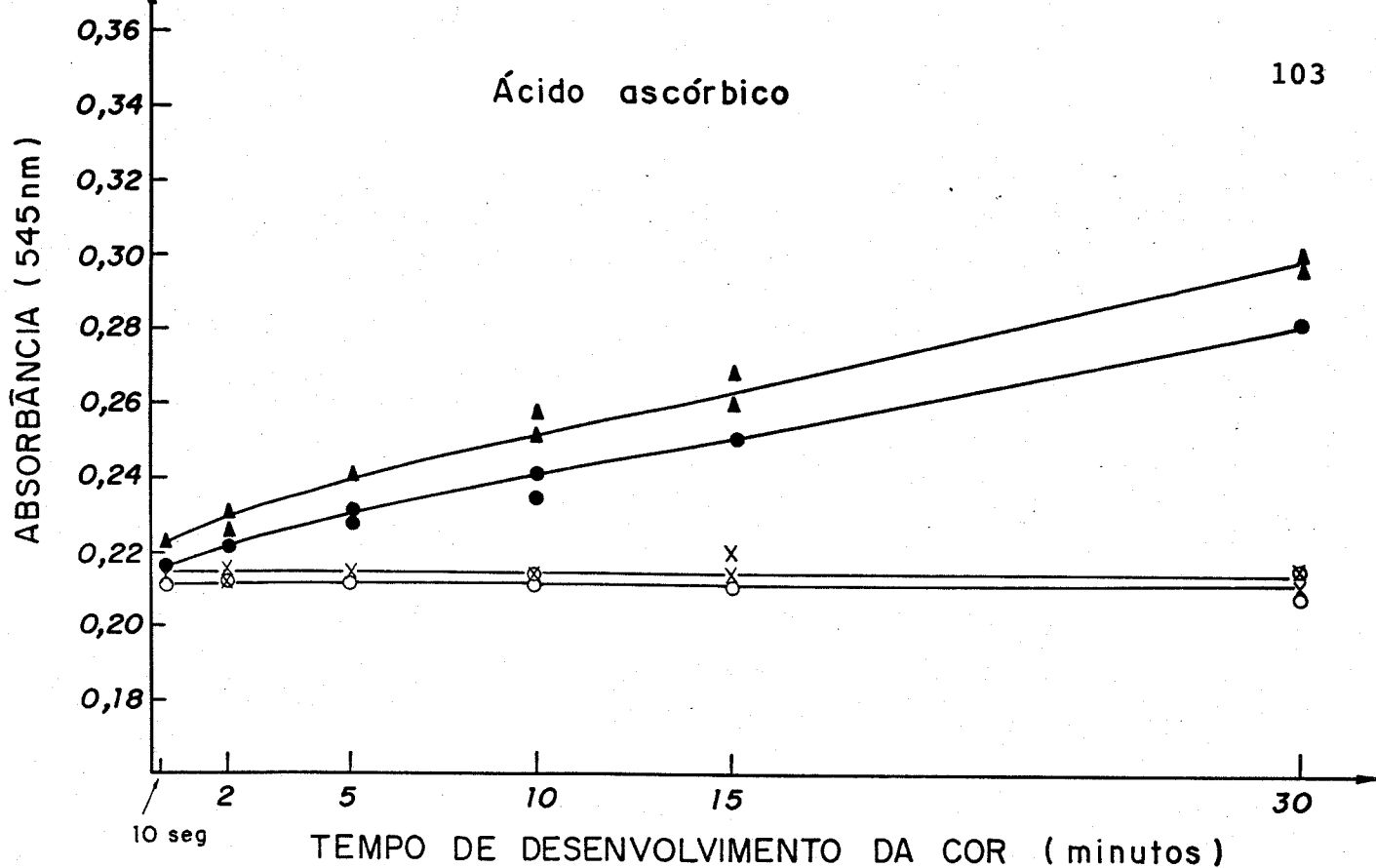


Figura 18

TEMPO DE DESENVOLVIMENTO DA COR DO COMPLEXO $[Cu(CUPROÍNA)_2]^+$ NA REAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO COM Cu^{2+} E DE Fe^{2+} COM Cu^{2+} EM TAMPÕES DE pH 4,65 : ACETATO $2,5 \times 10^{-2} M$ (—▲—); ACETATO $2,5 \times 10^{-2} M$ / NaCl $6,0 \times 10^{-2} M$ (—●—); ACETATO $2,5 \times 10^{-2} M$ / CITRATO $3,125 \times 10^{-3} M$ (—x—) E ACETATO $2,5 \times 10^{-2} M$ / NaCl $6,0 \times 10^{-2} M$ / CITRATO $3,125 \times 10^{-3} M$ (—o—). $[ÁCIDO ASCÓRBICO] = 1,25 \times 10^{-5} M$; $[Fe^{2+}] = 2,5 \times 10^{-5} M$.

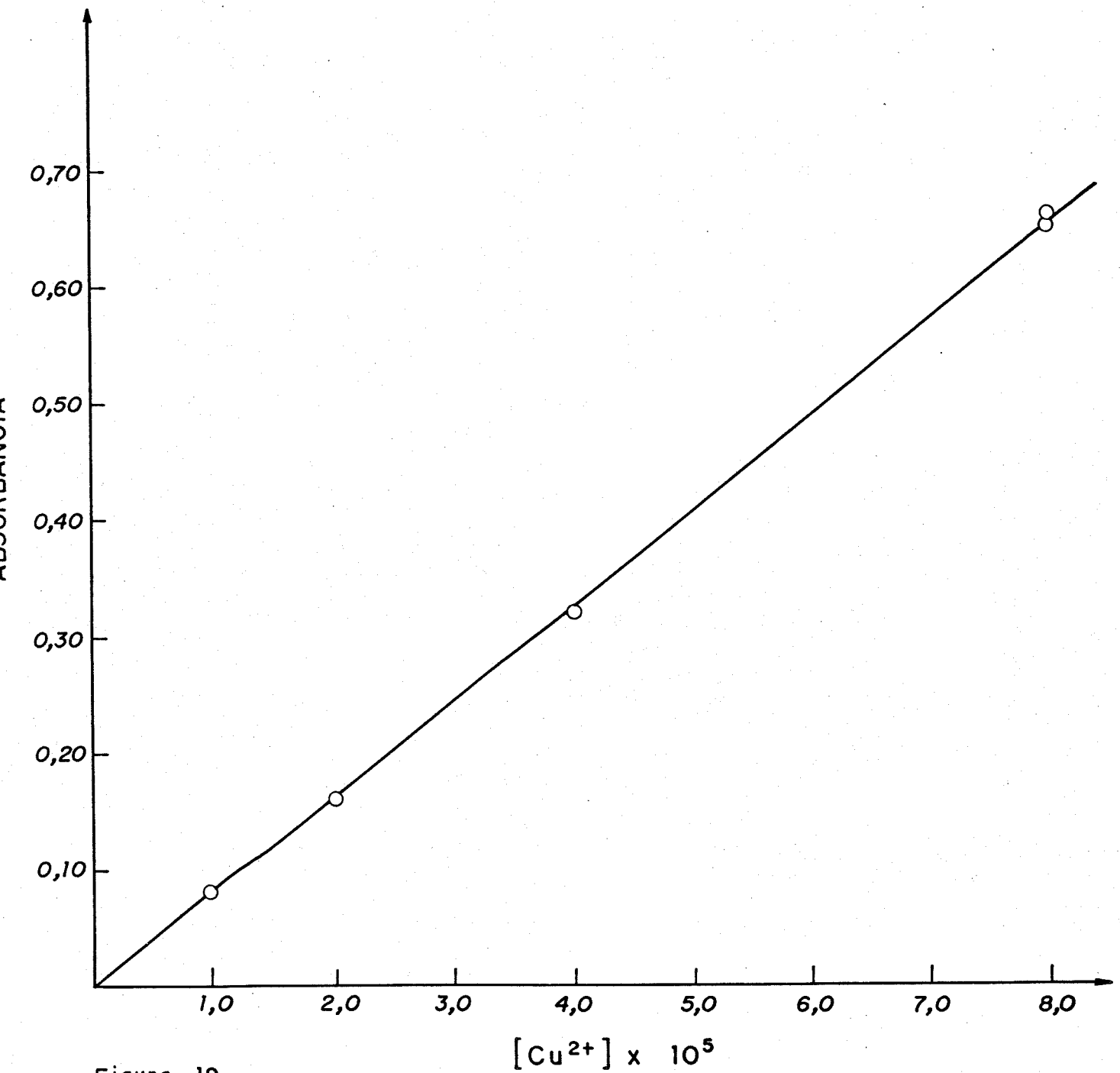


Figura 19

CURVA DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO $[\text{Cu}(\text{CUPROÍNA})_2]^+$ DETERMINAÇÃO DE Cu^{2+} POR REDUÇÃO COM HIDROXILAMINA EM MEIO DE TAMPÃO ACETATO (OU CITRATO) $2,5 \times 10^{-2} \text{M}$ EM pH DE 2,65 A 6,00.

($\epsilon = 6,67 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ PARA $b = 1,20 \text{ cm}$; EQUAÇÃO DA RETA \longrightarrow
 $y = 0,08x + 0,00$; $r = 1,00$)

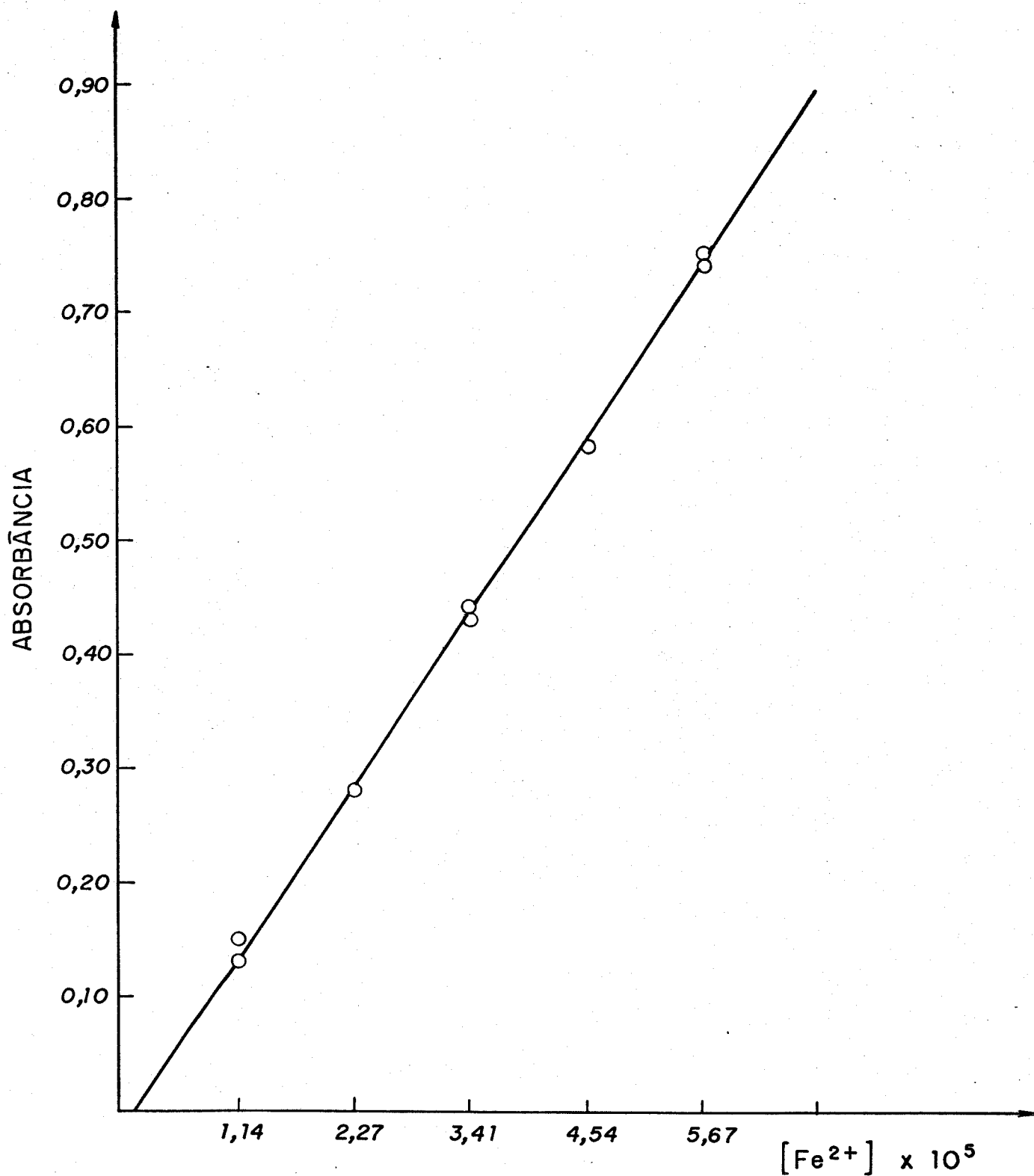


Figura 20

DETERMINAÇÃO DE Fe²⁺ COM ORTO-FENANTROLINA (COM HIDROXILAMINA).
CURVA PADRÃO EM TAMPÃO ACETATO (OU CITRATO) 0,50 M pH 4,65
($\epsilon = 1,04 \times 10^4 \text{ L. mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; EQUAÇÃO DA RETA $\rightarrow y = 0,13x - 0,02$; $r = 1,00$).

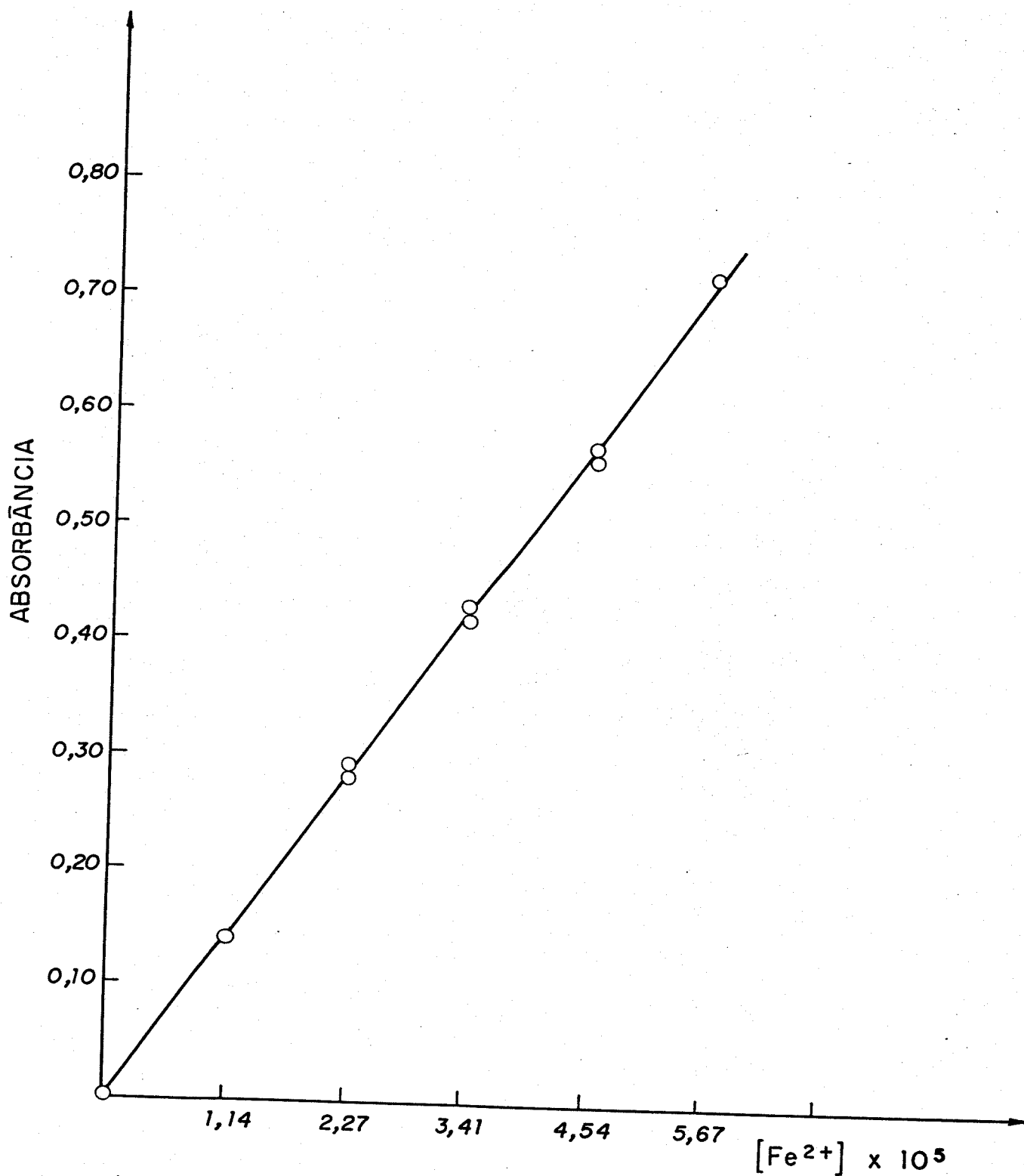


Figura 21

DETERMINAÇÃO DE Fe²⁺ COM ORTO-FENANTROLINA (COM HIDROXILAMINA).
CURVA PADRÃO EM HCL 2,01%. ($\epsilon = 1,04 \times 10^4 \text{ L. mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; EQUAÇÃO
DA RETA $\rightarrow y = 0,13x + 0,00$; $r = 1,00$).

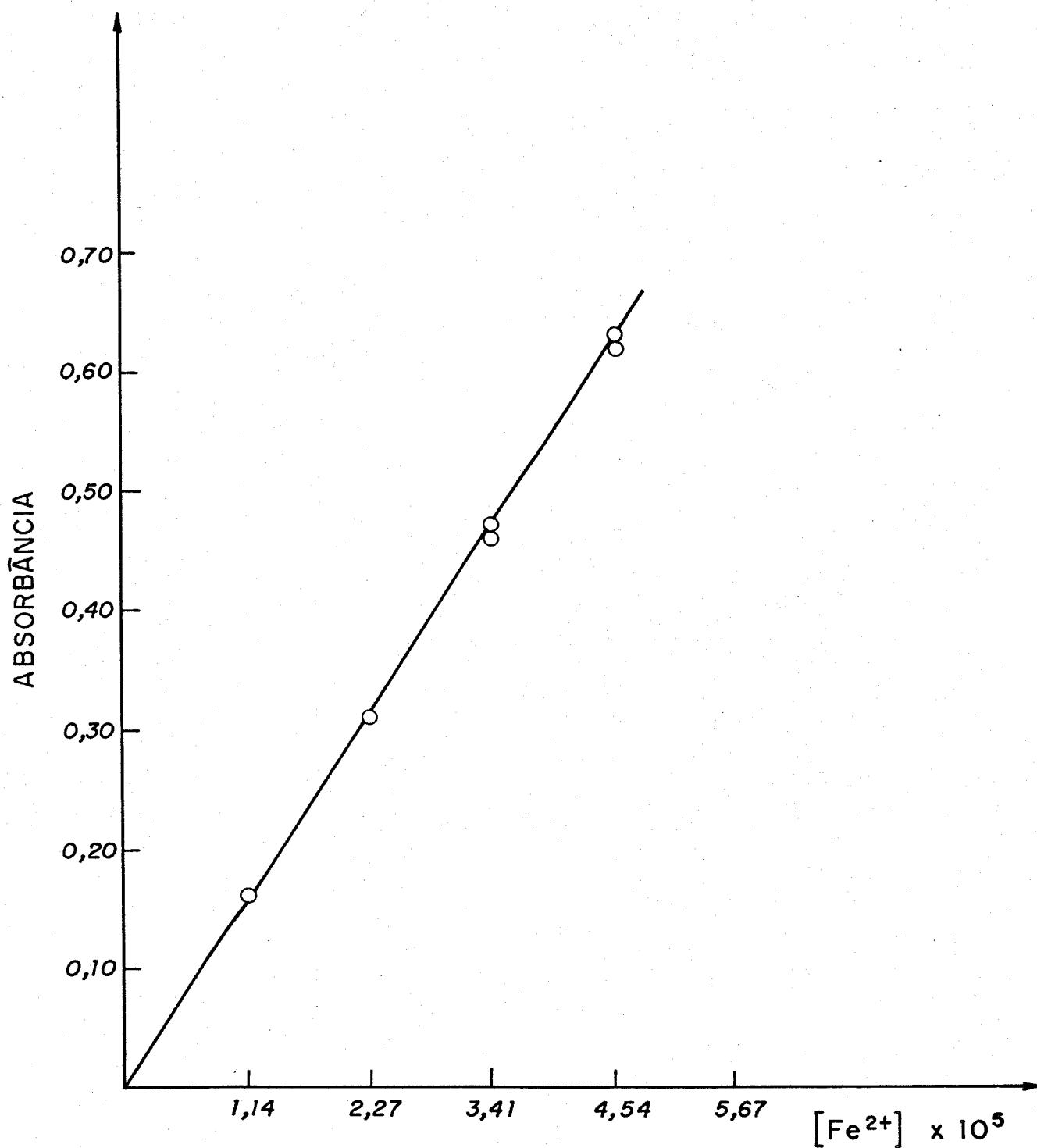


Figura 22

DETERMINAÇÃO DE Fe^{2+} COM ORTO-FENANTROLINA (COM HIDROXILAMINA).
CURVA PADRÃO EM H_2SO_4 0,10 M ($\epsilon = 1,12 \times 10^4 \text{ L. mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; EQUAÇÃO
DA RETA $\rightarrow y = 0,14x + 0,00$; $r = 1,00$).

Tabela 13 - Influência da concentração de etanol na absorbância da reação entre ácido ascórbico ($2,50 \times 10^{-3}$ M) e Cu^{2+} em tampão acetato $2,50 \times 10^{-2}$ M.

Etanol (mL)	(%)	Absorbância (média \pm d.p.)			Coeficiente de variação		
		pH 2,65	pH 4,65	pH 6,00	pH 2,65	pH 4,65	pH 6,00
2,5	50,0	$0,820 \pm 0,010$	$0,833 \pm 0,012$	$0,842 \pm 0,015$	1,23	1,44	1,78
4,0	80,0	$0,830 \pm 0,010$	$0,830 \pm 0,010$	$0,840 \pm 0,013$	1,20	1,20	1,54

Tabela 14 - Influência da concentração de etanol na absorbância da reação entre Fe^{2+} ($2,50 \times 10^{-3}$ M) e Cu^{2+} em tampão acetato $2,50 \times 10^{-2}$ M.

Etanol (mL)	Etanol (%)	Absorbância (média \pm d.p.)			Coeficiente de variação		
		pH 2,65	pH 4,65	pH 6,00	pH 2,65	pH 4,65	pH 6,00
2,5	50,0	0,421 \pm 0,005	0,418 \pm 0,006	0,410 \pm 0,007	1,18	1,43	1,70
4,0	80,0	0,420 \pm 0,005	0,420 \pm 0,006	0,406 \pm 0,006	1,19	1,43	1,48

As Tabelas 15 e 16 apresentam os resultados do estudo da influência da concentração de etanol nas determinações de ácido ascórbico e de Fe^{2+} pela reação de redução de íons cúpricos, em tampão citrato $2,50 \times 10^{-2}$ M, em pH 2,65, 4,65 e 6,00.

IV.3. Estudos de Formação de Complexo entre Ácido Ascórbico e Fe^{2+} no Sistema de Uma Fase

A Figura 23 mostra a evolução da absorvância de misturas equimolares de ácido ascórbico e Fe^{2+} ($2,27 \times 10^{-4}$ M em cada um), quando determinados simultaneamente pela reação de redução de íons cúpricos. Os dados utilizados para a elaboração dessa figura encontram-se nas Tabelas A.23 e A.24.

A Tabela 17 apresenta os dados do estudo de formação de complexo entre ácido ascórbico e Fe^{2+} em meio de tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M nos pH 2,65, 4,00 e 4,65. Esses dados mostram a evolução das absorvâncias em função do tempo de reação de soluções individuais de ácido ascórbico e de Fe^{2+} e da mistura equimolar de ambos, em cada pH. Esses resultados estão graficados nas Figuras 24 a 26.

Nota: As determinações foram feitas pela reação de redução de íons cúpricos e os valores de absorvância são referentes ao complexo $\text{Cu}(\text{cuproína})_2^+$ a 545 nm.

Da diferença entre a soma (S) das absorvâncias de solu

Tabela 15 - Influência da concentração de etanol na absorbância da reação entre ácido ascórbico ($2,50 \times 10^{-3}$ M) e Cu^{2+} em tampão citrato $2,50 \times 10^{-2}$ M.

Etanol (mL) (%)	Absorbância (média \pm d.p.)			Coeficiente de variação		
	pH 2,65	pH 4,65	pH 6,00	pH 2,65	pH 4,65	pH 6,00
2,5	$0,825 \pm 0,010$	$0,792 \pm 0,016$	$0,772 \pm 0,014$	1,21	2,02	1,81
4,0	$0,830 \pm 0,009$	$0,785 \pm 0,015$	$0,766 \pm 0,016$	1,08	1,90	2,09

Tabela 16 - Influência da concentração de etanol na absorvância da reação entre Fe^{2+} ($2,50 \times 10^{-3}$ M) e Cu^{2+} em tampão citrato $2,50 \times 10^{-2}$ M.

Etanol (mL) (%)	Absorvância (média \pm d.p.)			Coeficiente de variação		
	pH 2,65	pH 4,65	pH 6,00	pH 2,65	pH 4,65	pH 6,00
2,5 50,0	$0,410 \pm 0,005$	$0,360 \pm 0,007$	$0,152 \pm 0,010$	1,22	1,94	6,58
4,0 80,0	$0,400 \pm 0,006$	$0,350 \pm 0,005$	$0,158 \pm 0,010$	1,50	1,42	6,33

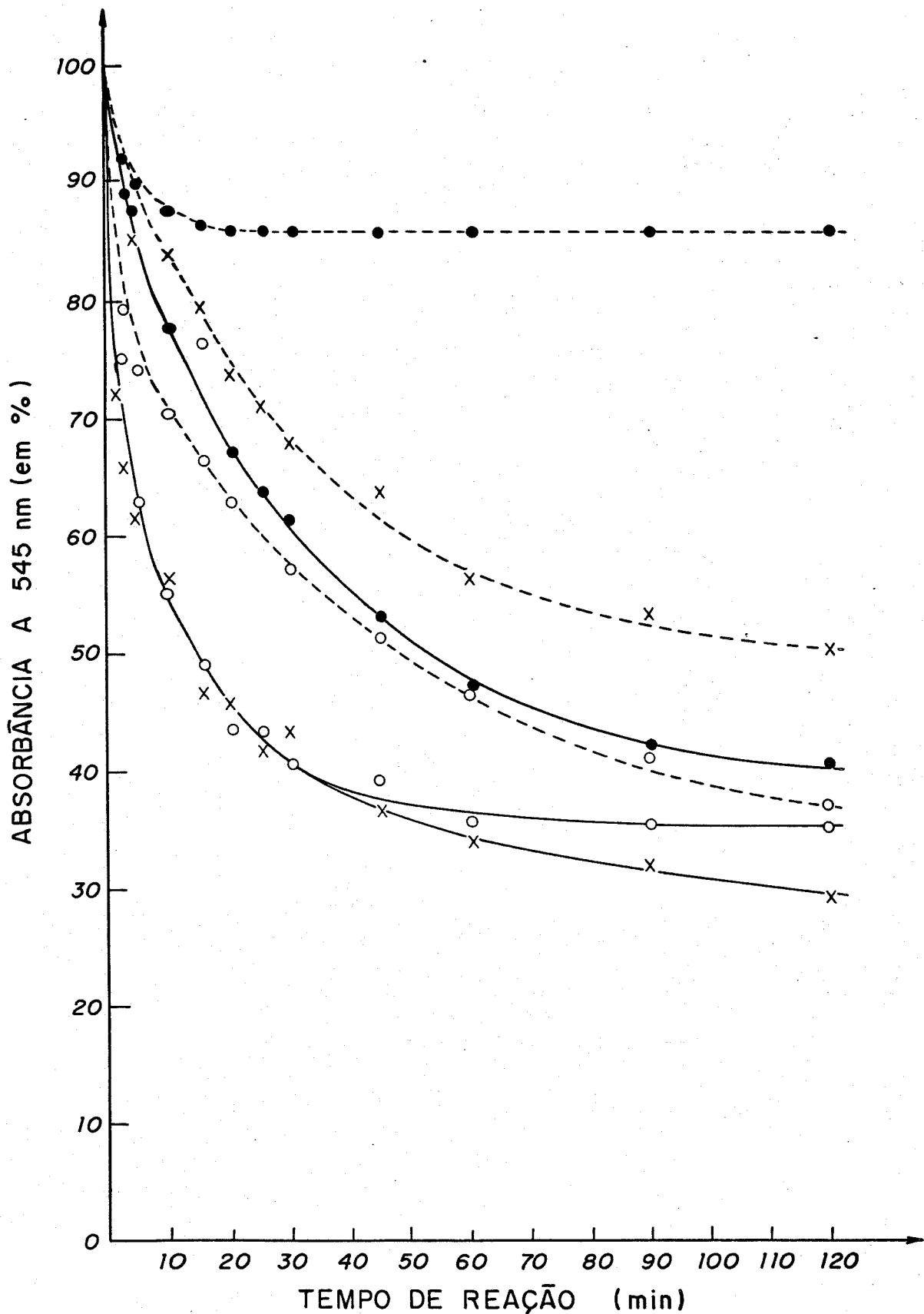


Figura 23

EVOLUÇÃO DA ABSORBÂNCIA (RELATIVA AO COMPLEXO $[\text{Cu}(\text{CUPROÍNA})_2]^+$ DA MISTURA EQUIMOLAR DE ÁCIDO ASCÓRBICO E Fe^{2+} ($2,27 \times 10^{-4} \text{ M}$) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO EM TAMPÕES ACETATO E CITRATO DE SÓDIO $2,5 \times 10^{-2} \text{ M}$.

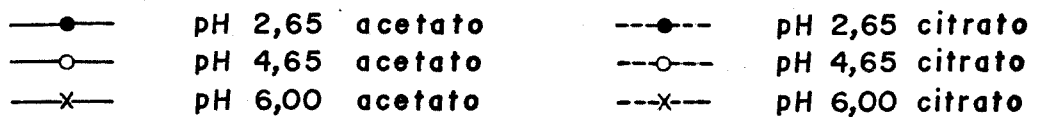


Tabela 17 - Estimativa da porcentagem de complexo entre H_2Asc e Fe^{2+} através da diminuição da absorvância (relativa ao complexo $Cu(cuproína)_2^+$) em função do tempo de reação, de soluções individuais de H_2Asc , de Fe^{2+} e de misturas equimolares ($2,50 \times 10^{-4} M$) de ambos. Valores de absorvância a 545 nm. Em tampão acetato ($2,50 \times 10^{-2} M$).

pH 2,65						
Tempo (min)	Valores de absorvância			Cálculos		
	H_2Asc (H)	Fe^{2+} (F)	Mistura (M)	Soma (S)	S - M	% complexo
0	0,425	0,220	0,640	0,645 (S_0)	0,005	0,78
1	0,425	0,220	0,560	0,645	0,085	13,17
3	0,420	0,220	0,540	0,640	0,100	15,50
6	0,405	0,220	0,520	0,625	0,105	16,28
12	0,375	0,215	0,480	0,590	0,110	17,05
25	0,305	0,215	0,400	0,520	0,120	18,60
pH 4,00						
0	0,415	0,210	0,630	0,625 (S_0)	-0,005	-0,80
1	0,410	0,210	0,550	0,620	0,070	11,18
3	0,400	0,210	0,475	0,610	0,135	21,57
6	0,380	0,205	0,405	0,585	0,180	28,75
12	0,320	0,205	0,320	0,525	0,205	32,74
25	0,185	0,205	0,210	0,390	0,175	28,00
pH 4,65						
0	0,415	0,215	0,635	0,630 (S_0)	-0,005	-0,79
1	0,405	0,215	0,525	0,620	0,095	15,08
3	0,370	0,215	0,385	0,585	0,200	31,75
6	0,285	0,215	0,280	0,500	0,220	34,92
12	0,194	0,215	0,220	0,409	0,189	30,00
25	0,065	0,215	0,158	0,280	0,122	19,37

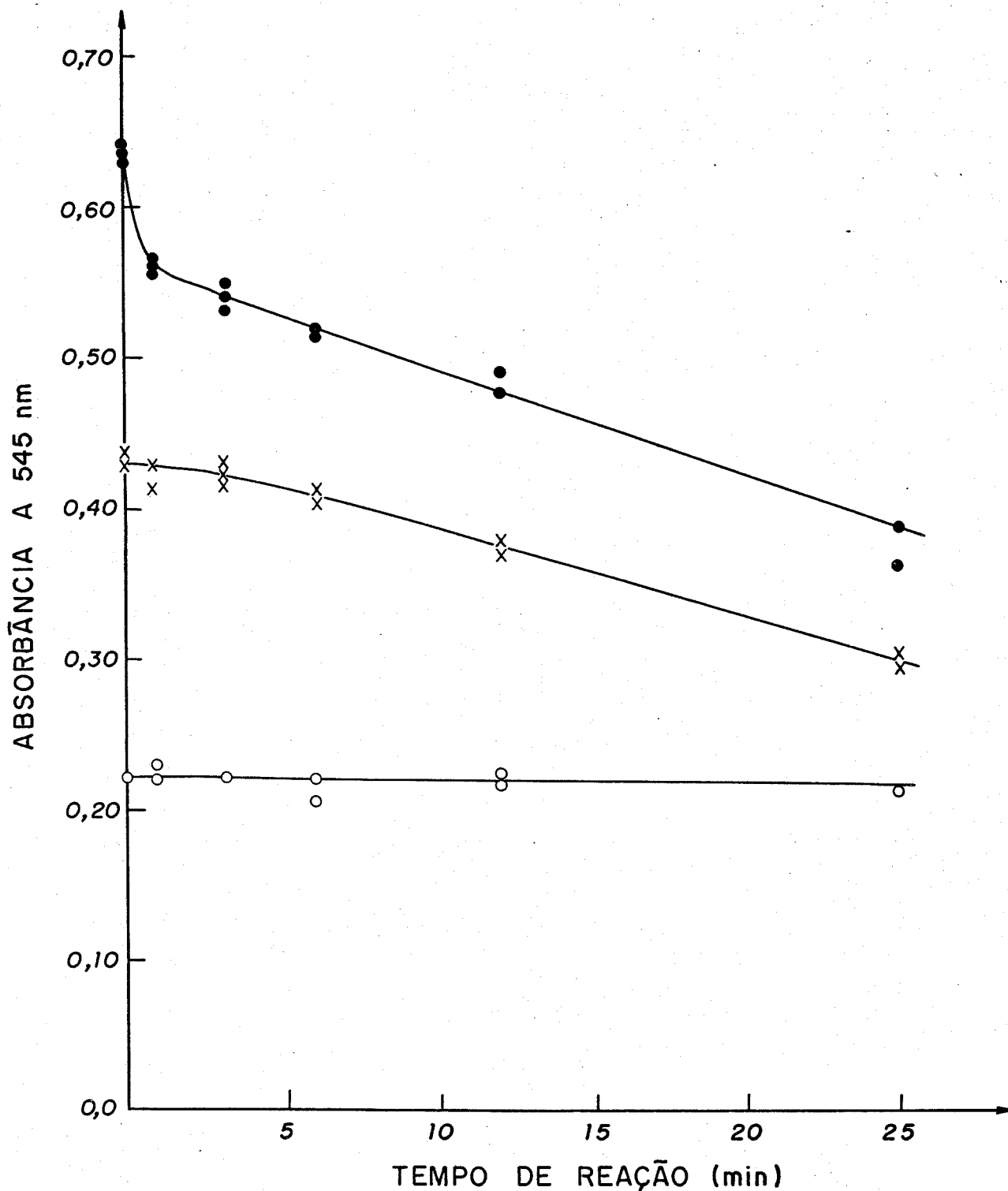


Figura 24

EVOLUÇÃO DA ABSORBÂNCIA (RELATIVA AO COMPLEXO $[Cu(CUPROÍNA)_2]^+$) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE SOLUÇÕES INDIVIDUAIS DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DE Fe^{2+} E DA MISTURA EQUIMOLAR ($2,5 \times 10^{-4} M$) DE AMBOS, EM TAMPÃO ACETATO $2,5 \times 10^{-2} M$, pH 2,65.

- Fe^{2+}
- x— Ácido Ascórbico
- Mistura Equimolar

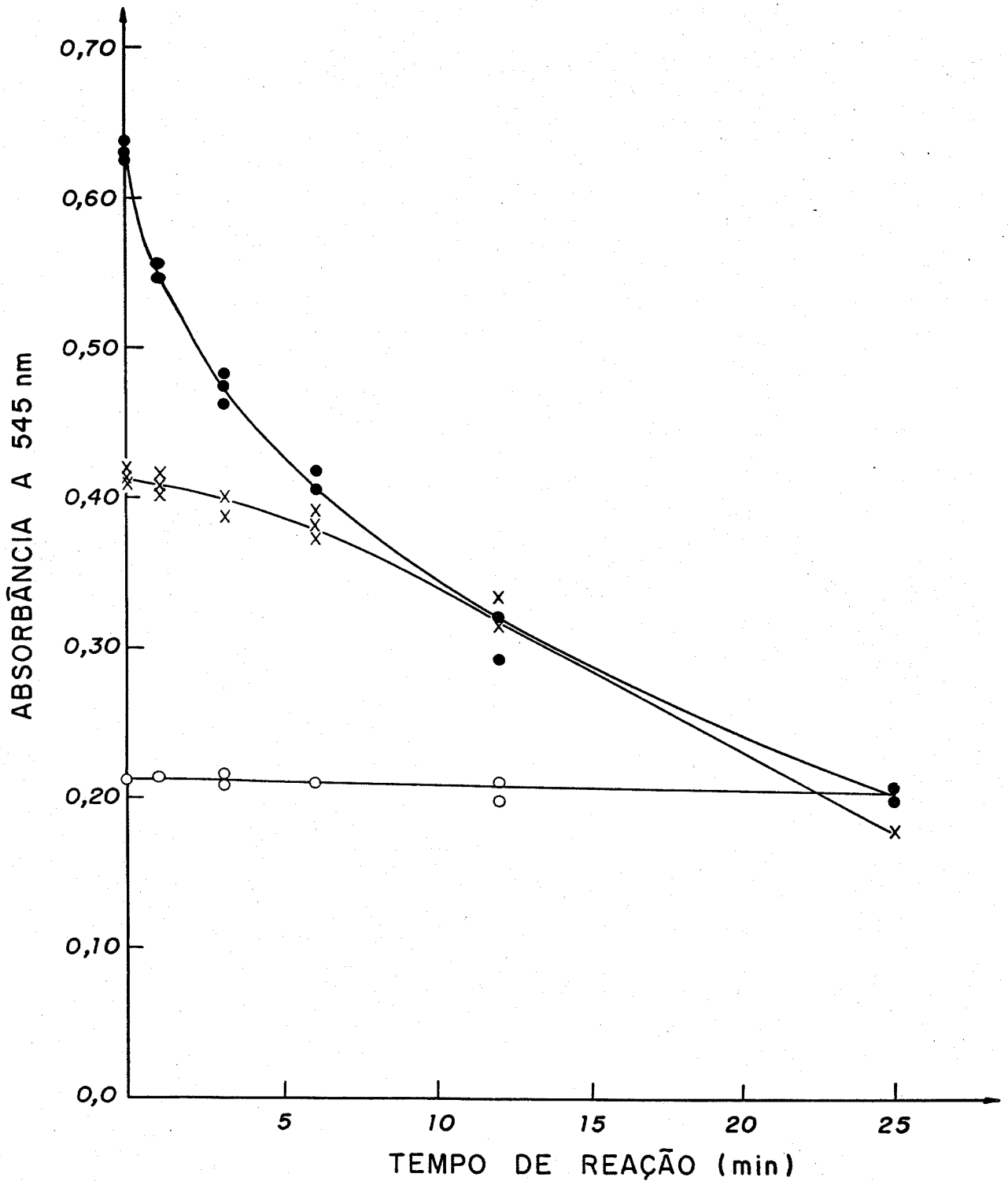


Figura 25

EVOLUÇÃO DA ABSORBÂNCIA (RELATIVA AO COMPLEXO $[\text{Cu}(\text{CUPROÍNA})_2]^+$ EM FUNÇÃO DO TEMPO DE SOLUÇÕES INDIVIDUAIS DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DE Fe^{2+} E DA MISTURA EQUIMOLAR ($2,5 \times 10^{-4}\text{M}$) DE AMBOS, EM TAMPÃO ACETATO $2,5 \times 10^{-2}\text{M}$, pH 4,00.

- Fe^{2+}
- x— Ácido Ascórbico
- Mistura Equimolar

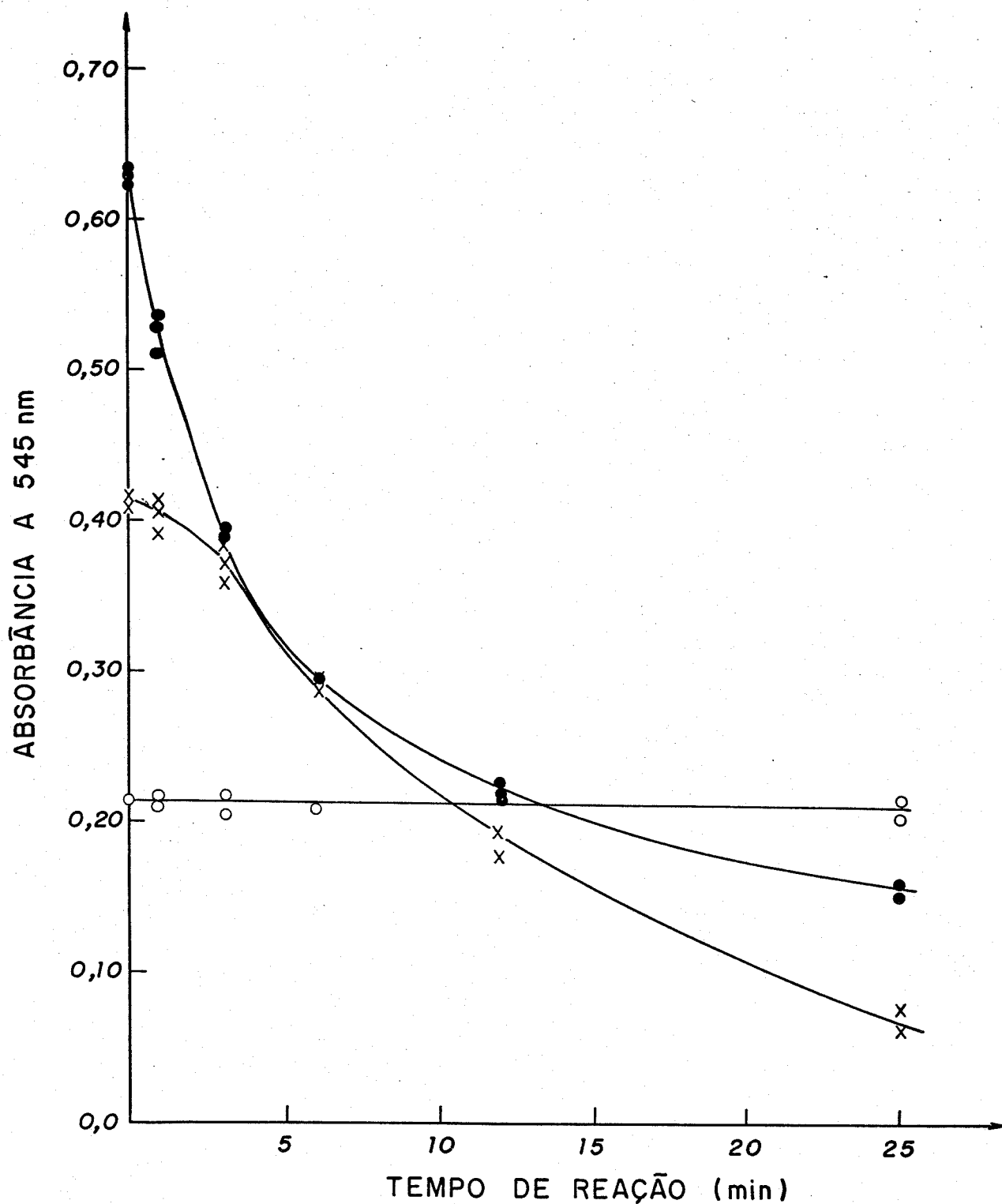


Figura 26

EVOLUÇÃO DA ABSORBÂNCIA (RELATIVA AO COMPLEXO $[Cu(CUPROÍNA)_2]^+$ EM FUNÇÃO DO TEMPO DE SOLUÇÕES INDIVIDUAIS DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DE Fe^{2+} DE MISTURA EQUIMOLAR ($2,5 \times 10^{-4}M$) DE AMBOS, EM TAMPÃO ACETATO $2,5 \times 10^{-2}M$, pH 4,65.

- — Fe^{2+}
- × — Ácido Ascórbico
- — Mistura Equimolar

ções individuais de H_2Asc (H) e Fe^{2+} (F) e a absorvância da mistura equimolar (M) calculou-se a porcentagem de complexo formado, em cada pH. Esses resultados estão graficados na Figura 27.

A Tabela 18 apresenta os dados do estudo de formação de complexo entre ácido ascórbico e Fe^{2+} em meio de tampão misto (acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M/citrato $3,125 \times 10^{-3}$ M/NaCl $6,0 \times 10^{-2}$ M) nos pH 2,65, 4,00 e 4,65. Esses dados mostram a evolução das absorvâncias em função do tempo de soluções individuais de ácido ascórbico e de Fe^{2+} e da mistura equimolar de ambos, em cada pH. Esses resultados estão graficados nas Figuras 28 a 30.

Observação: os valores de absorvância são relativos ao complexo $Cu(\text{cuproína})_2^+$, como já foi mencionado para a Tabela 17.

A porcentagem de formação do complexo, calculada como já descrito para o tampão acetato, encontra-se graficada na Figura 31.

IV.4. Estudos em um Sistema Natural: Suco de Laranja Concentrado

Análise de alguns parâmetros do suco de laranja

1 - Teor de ácido cítrico do suco

O volume gasto de solução de NaOH padronizada (0,0493 N) para titular a alíquota de 5,00 mL (solução 5% de suco) foi 3,20 mL.

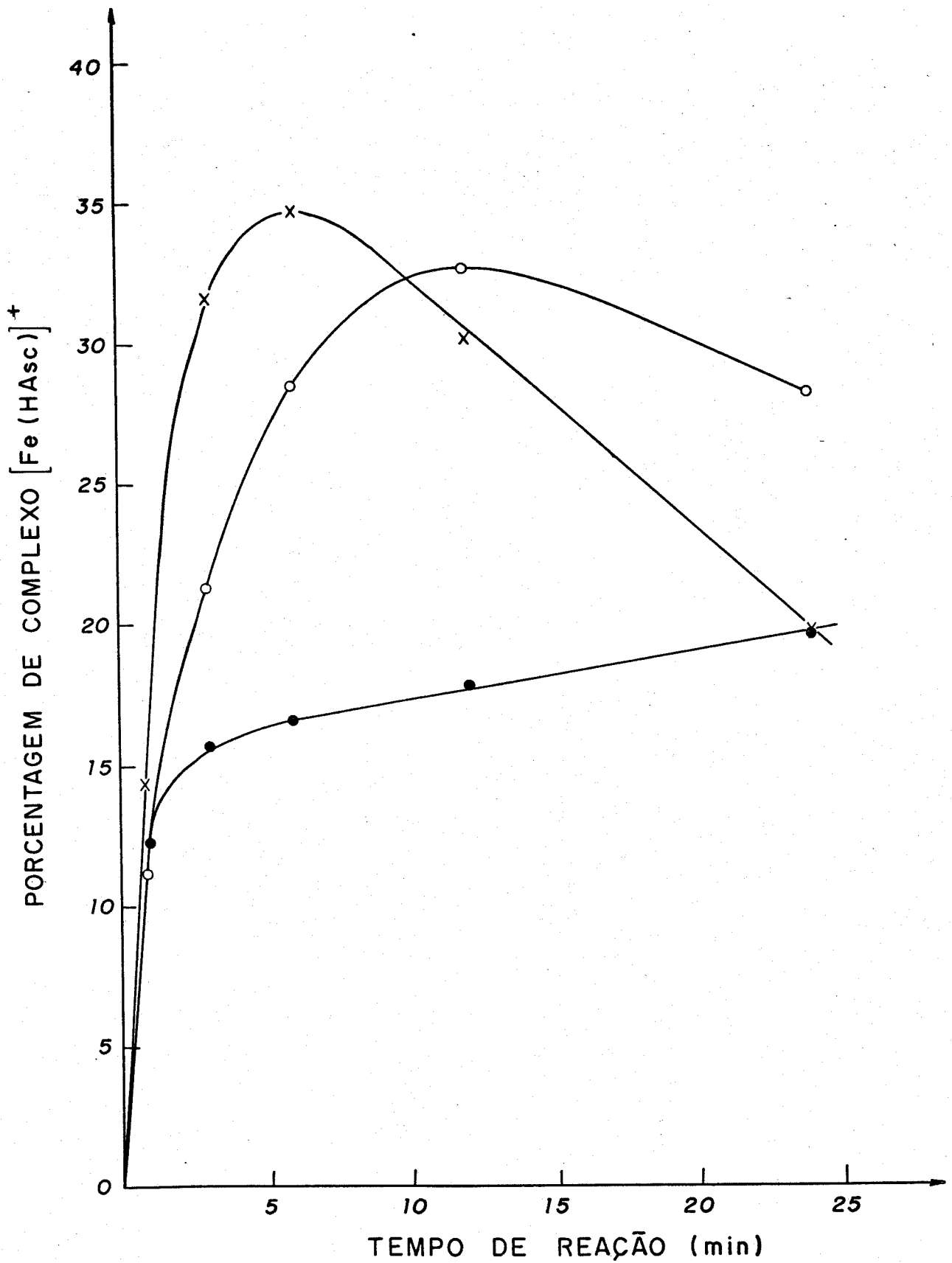


Figura 27

FORMAÇÃO DO COMPLEXO $[Fe(HAsc)]^+$ EM TAMPÃO ACETATO $2,5 \times 10^{-2} M$ DE pH 2,65, 4,00 E 4,65.

- pH 2,65
- pH 4,00
- ×— pH 4,65

Tabela 18 - Estimativa da porcentagem de complexo entre H_2Asc e Fe^{2+} através da diminuição da absorbância (relativa ao complexo $Cu(cuproína)_2^+$) em função do tempo de reação, de soluções individuais de H_2Asc , de Fe^{2+} e de misturas equimolares de ambos. Valores de absorbância a 545 nm. Em tampão misto (acetato $2,50 \times 10^{-2}$ M/ citrato $3,125 \times 10^{-3}$ M/NaCl $6,0 \times 10^{-2}$ M).

pH 2,65						
Tempo (min)	Valores de absorbância			Cálculos		
	H_2Asc (H)	Fe^{2+} (F)	Mistura (M)	Soma (S)	S - M	% complexo
0	0,425	0,230	0,665	0,655 (S_0)	-0,010	1,53
1	0,425	0,230	0,580	0,655	0,075	11,45
3	0,420	0,230	0,545	0,650	0,105	16,03
6	0,415	0,230	0,525	0,645	0,120	18,32
12	0,410	0,230	0,520	0,640	0,120	18,32
25	0,405	0,230	0,520	0,635	0,115	17,56
pH 4,00						
0	0,435	0,220	0,650	0,655 (S_0)	0,005	0,76
1	0,430	0,220	0,600	0,650	0,050	7,63
3	0,430	0,210	0,550	0,640	0,090	13,74
6	0,420	0,210	0,480	0,630	0,150	22,90
12	0,405	0,185	0,435	0,590	0,155	23,66
25	0,380	0,170	0,390	0,550	0,160	24,43
pH 4,65						
0	0,435	0,220	0,660	0,655 (S_0)	-0,005	-0,76
1	0,435	0,215	0,630	0,650	0,020	3,05
3	0,425	0,210	0,560	0,635	0,075	11,45
6	0,420	0,200	0,480	0,620	0,140	21,37
12	0,410	0,185	0,390	0,595	0,205	31,30
25	0,385	0,150	0,360	0,535	0,175	26,72

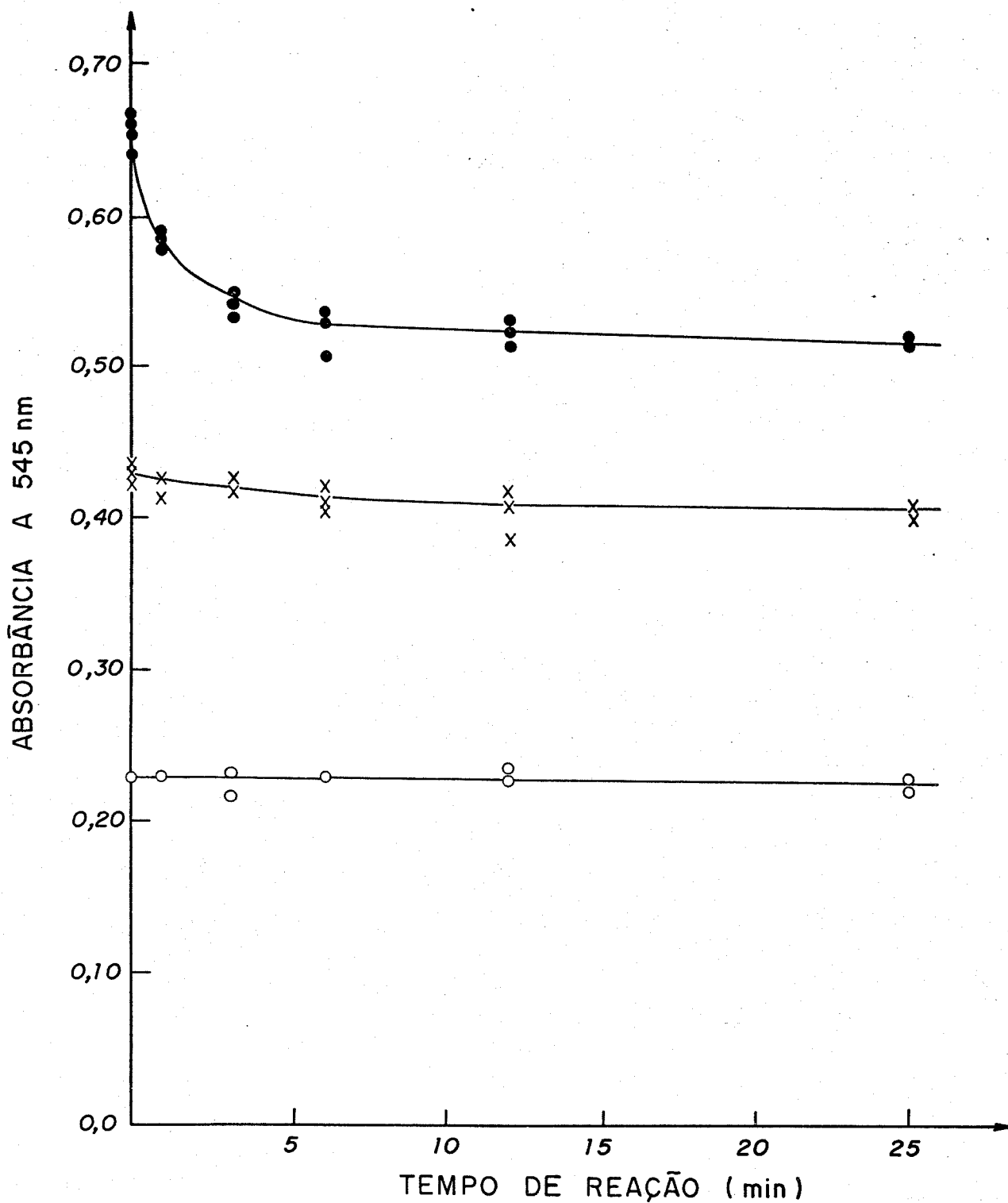


Figura 28

EVOLUÇÃO DA ABSORBÂNCIA (RELATIVA AO COMPLEXO $[Cu(CUPROÍNA)_2]^+$ EM FUNÇÃO DO TEMPO DE SOLUÇÕES INDIVIDUAIS DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DE Fe^{2+} E DA MISTURA EQUIMOLAR ($2,5 \times 10^{-4} M$ DE AMBOS, EM TAMPÃO MISTO (ACETATO $2,5 \times 10^{-2} M$ / CITRATO $3,125 \times 10^{-3} M$ / NaCl $6,0 \times 10^{-2} M$), pH 2,65.

- Fe^{2+}
- × Ácido Ascórbico
- Mistura Equimolar

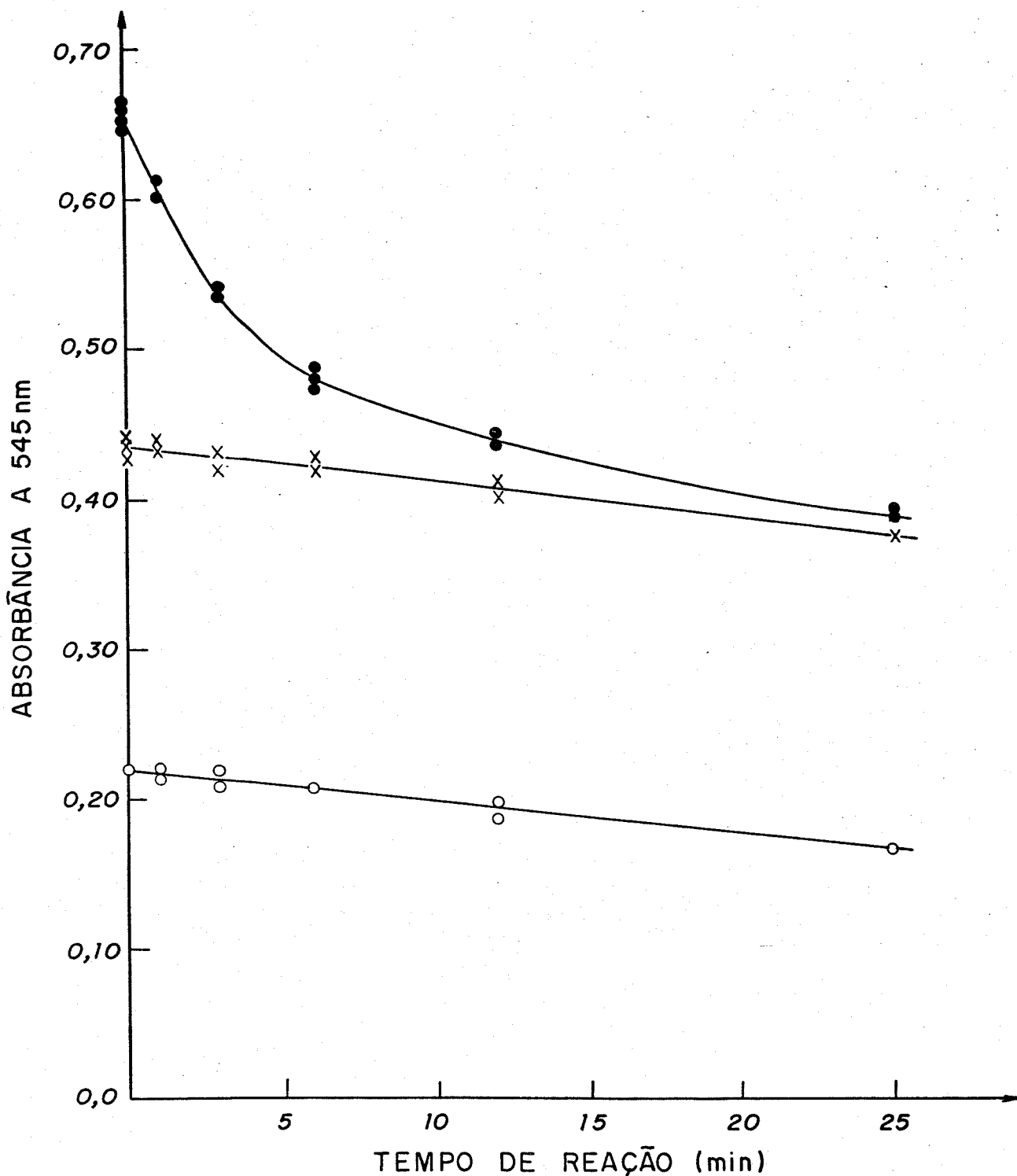


Figura 29

EVOLUÇÃO DA ABSORBÂNCIA (RELATIVA AO COMPLEXO $[\text{Cu}(\text{CUPROÍNA})_2]^+$ EM FUNÇÃO DO TEMPO DE SOLUÇÕES INDIVIDUAIS DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DE Fe^{2+} E DA MISTURA EQUIMOLAR ($2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$) DE AMBOS, EM TAMPÃO MISTO (ACETATO $2,5 \times 10^{-2} \text{ M}$ / CITRATO $3,125 \times 10^{-3} \text{ M}$ / NaCl $6,0 \times 10^{-2} \text{ M}$), pH 4,00.

- — Fe^{2+}
- x — Ácido Ascórbico
- — Mistura equimolar

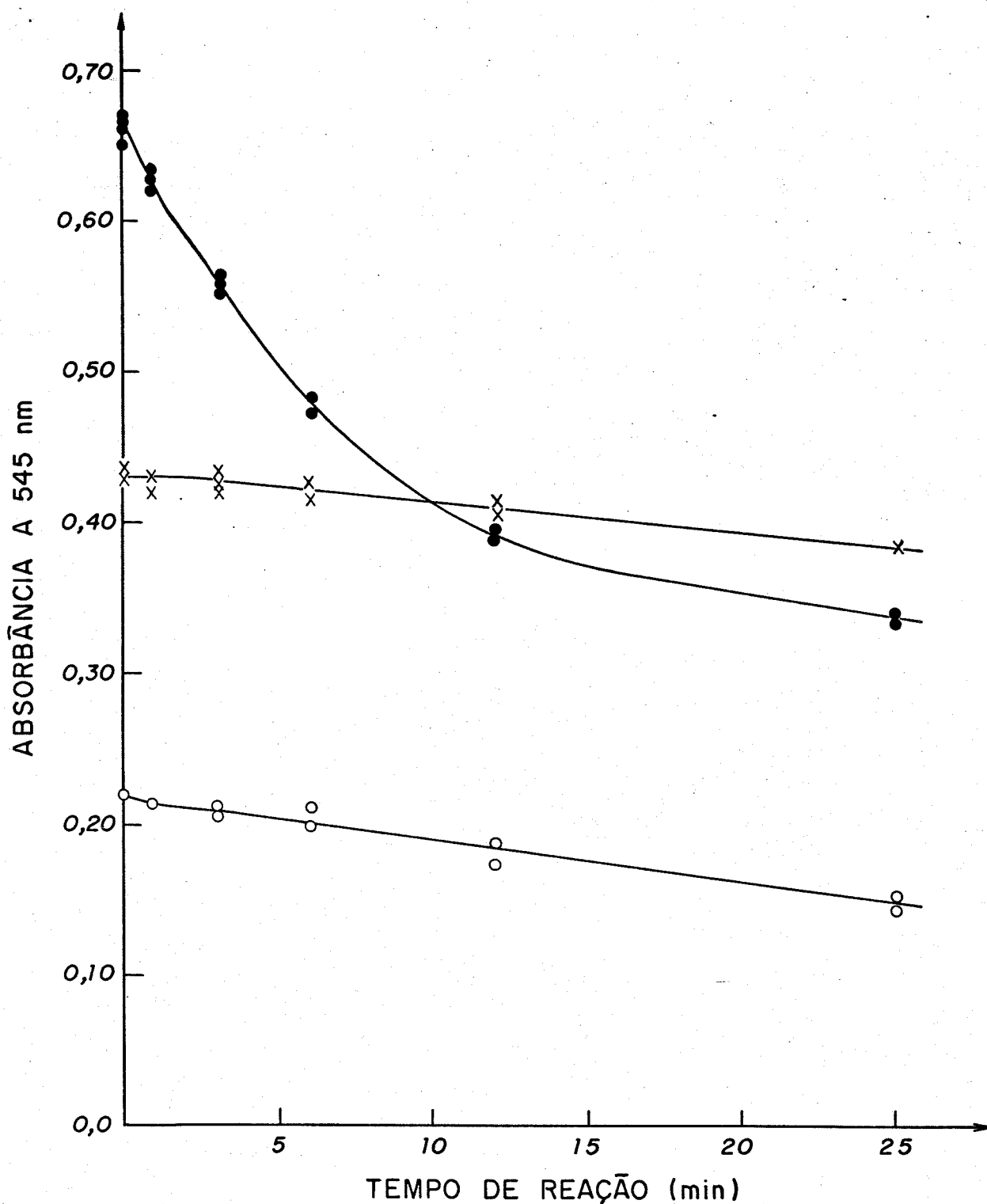


Figura 30

EVOLUÇÃO DA ABSORBÂNCIA (RELATIVA AO COMPLEXO $[\text{Cu}(\text{CURROÍNA})_2]^+$ EM FUNÇÃO DO TEMPO DE SOLUÇÕES INDIVIDUAIS DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DE Fe^{2+} E DA MISTURA EQUIMOLAR ($2,5 \times 10^{-4} \text{M}$) DE AMBOS, EM TAMPÃO MISTO (ACETATO $2,5 \times 10^{-2} \text{M}$ / CITRATO $3,125 \times 10^{-3} \text{M}$ / NaCl $6,0 \times 10^{-2} \text{M}$), pH 4,65.

- Fe^{2+}
- x— Ácido Ascórbico
- Mistura Equimolar

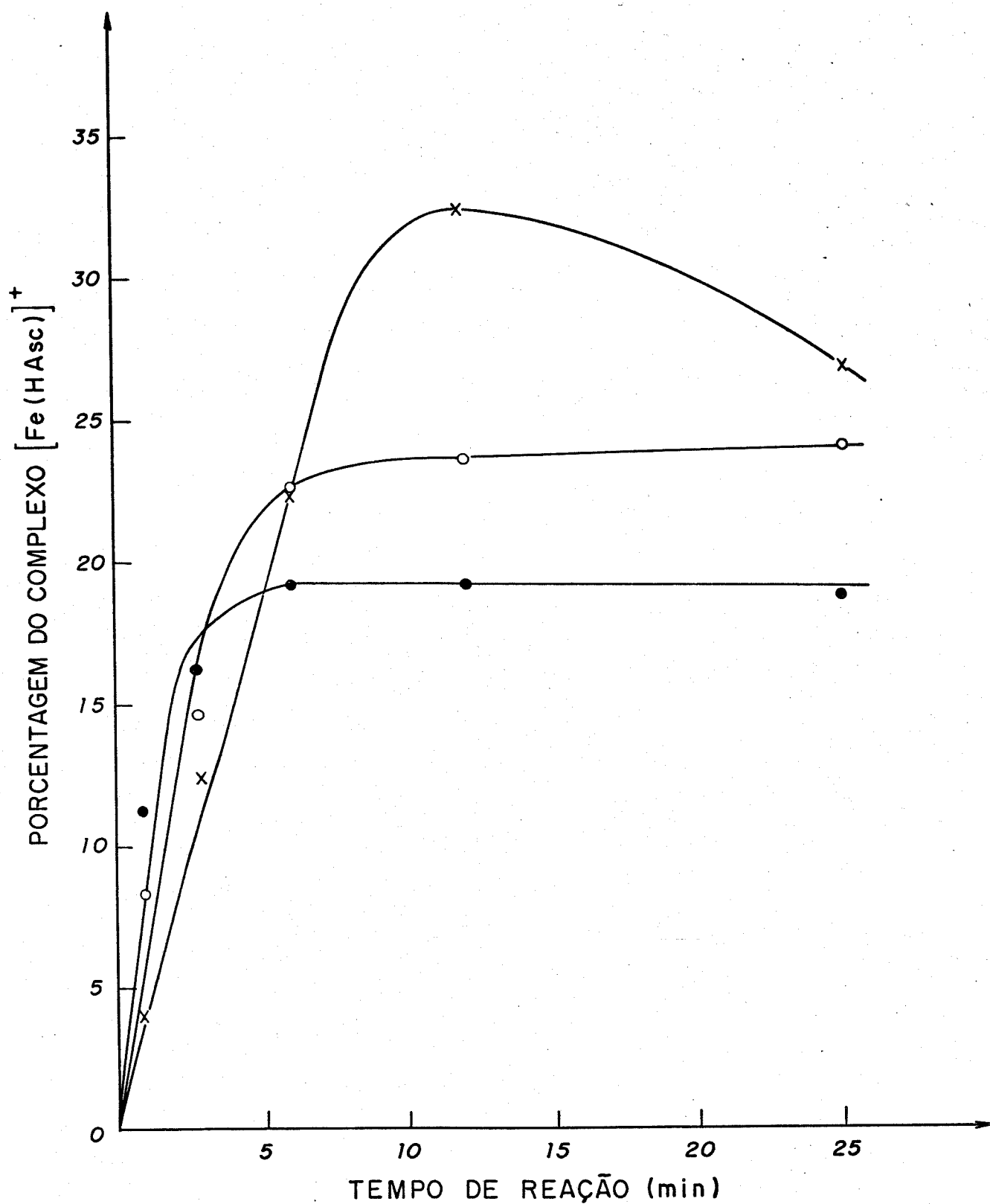


Figura 31

FORMAÇÃO DO COMPLEXO $[\text{Fe}(\text{HAsc})]^+$ EM TAMPÃO MISTO (ACETATO $2,5 \times 10^{-2} \text{M}$ / CITRATO $3,125 \times 10^{-3} \text{M}$ / NaCl $6,0 \times 10^{-2} \text{M}$) DE pH 2,65 , 4,00 E 4,65 .

- pH 2,65
- pH 4,00
- x— pH 4,65

Através da fórmula apresentada no item III.2.4.1. obteve-se que o suco de laranja concentrado é 0,2% em ácido cítrico, ou seja, em 5,00 g de amostra há 0,010 g de ácido cítrico. A solução utilizada na titulação (5,00 g/100 mL) é $1,56 \times 10^{-3} N$ em ácido cítrico.

2 - Concentração de ácido ascórbico (vitamina C) e de ferro do suco de laranja concentrado e liofilizado

A concentração de ácido ascórbico no suco de laranja, determinada pela reação de redução de íons cúpricos, segundo o método já detalhado no item III.2.4.2. foi: em 100 g do suco concentrado existem 291,70 mg de ácido ascórbico, ou seja, 1.656 μ moles de ácido ascórbico em cada 100 g de suco concentrado.

O teor de ferro no suco concentrado, determinado pelo método da orto-fenantrolina era muito baixo, praticamente desprezível, ou seja, $4,27 \times 10^{-6}$ moles de ferro em 100 g de suco concentrado.

As concentrações de ácido ascórbico e de ferro no suco liofilizado foram de 3.300 μ moles/100 g e $8,55 \times 10^{-6}$ moles/100 g, respectivamente.

A Tabela 19 apresenta os resultados do Experimento de Estocagem 1. A tabela registra os dados periódicos da absorvância (545 nm) de amostras de suco de laranja concentrado adicionado de ferro, que foram estocadas por um período de 55 dias. O valor da absorvância das amostras II, III e IV em cada ponto corresponde à soma das quantidades de vitamina C e Fe^{2+} . A absorvân-

Tabela 19 - Experimento de Estocagem 1. Efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre a $[H_2Asc]$ e a $[Fe^{2+}]$ do suco de laranja concentrado adicionado de ferro. Valores de absorvância a 545 nm. Amostras Ia a IVa: temperatura ambiente; amostras Ib a IVb: $T = +5,0^{\circ}C$; amostras Ic a IVc: $T = -18,0^{\circ}C$.

Dias de estocagem Amostra	Absorvância							
	0	02	06	10	17	25	35	55
Ia	0,49	0,50	0,47	0,46	0,44	0,21	-	-
	0,50	0,50	0,48	0,46	0,44	0,20	-	-
IIa	0,52	0,52	0,48	0,46	0,40	0,32	-	-
	0,52	0,52	0,47	0,46	0,40	0,32	-	-
IIIa	0,55	0,55	0,52	0,48	0,42	0,35	-	-
	0,55	0,55	0,51	0,48	0,42	0,35	-	-
IVa	0,66	0,66	0,63	0,54	0,46	0,37	-	-
	0,66	0,65	0,63	0,54	0,46	0,37	-	-
Ib	0,51	0,51	0,50	0,50	0,48	0,46	0,44	0,36
	0,51	0,51	0,51	0,50	0,48	0,46	0,44	0,36
IIb	0,52	0,51	0,50	0,50	0,48	0,46	0,43	0,34
	0,52	0,51	0,53	0,50	0,47	0,45	0,43	0,34
IIIb	0,57	0,56	0,55	0,53	0,47	0,46	0,41	0,34
	0,57	0,56	0,54	0,53	0,47	0,46	0,40	0,34
IVb	0,66	0,66	0,64	0,57	0,53	0,50	0,43	0,34
	0,66	0,66	0,65	0,58	0,53	0,50	0,43	0,34
Ic	0,51	0,50	0,50	0,47	0,45	0,44	0,44	0,41
	0,50	0,50	0,50	0,47	0,45	0,44	0,43	0,41
IIc	0,52	0,52	0,51	0,49	0,45	0,42	0,42	0,37
	0,52	0,52	0,51	0,48	0,44	0,42	0,42	0,37
IIIc	0,56	0,55	0,55	0,52	0,47	0,44	0,43	0,40
	0,56	0,55	0,54	0,52	0,47	0,44	0,43	0,41
IVc	0,68	0,68	0,66	0,64	0,56	0,52	0,48	0,43
	0,68	0,67	0,66	0,64	0,57	0,52	0,48	0,44

cia das amostras sem adição de ferro (amostras I) corresponde à quantidade de vitamina C. As amostras Ia a IVa foram estocadas à temperatura ambiente, as amostras Ib a IVb foram estocadas sob refrigeração (+ 5,0°C) e as amostras Ic a IVc foram estocadas sob congelamento (- 18,0°C). Esses dados estão representados graficamente nas Figuras 32 a 34.

A Tabela 20 apresenta os resultados do Experimento de Estocagem 2. A tabela registra dados periódicos da absorvência a 545 nm das amostras de suco de laranja com Fe^{2+} (amostras II, III e IV) e das amostras sem Fe^{2+} (I) que foram estocadas à temperatura ambiente, sob refrigeração (+ 5,0°C) e sob congelamento (- 18,0°C) por 49 dias.

A Tabela 21 apresenta resultados do Experimento de Estocagem 2 em relação ao teor de Fe^{2+} nas amostras II, III e IV. O Fe^{2+} foi avaliado pelo método da orto-fenantrolina nas amostras de suco de laranja estocadas à temperatura ambiente, sob refrigeração e sob congelamento, por 49 dias.

As Tabelas 22, 23 e 24 apresentam os resultados da porcentagem de perda de vitamina C, da soma de vitamina C e Fe^{2+} e do Fe^{2+} durante o Experimento de Estocagem 2.

A Tabela 25 apresenta os dados de conversão dos valores de absorvência do Fe^{2+} obtidos com o-fenantrolina para os valores correspondentes ao Fe^{2+} determinados com 2,2'-biquinolina.

Com os dados das Tabelas 20 e 21 construiu-se as Figuras 35 a 37 que apresentam a evolução da absorvência das amostras de suco de laranja com e sem ferro, nas três temperaturas de estocagem, por 49 dias. Esses valores se referem à concentração de vitamina C, do Fe^{2+} e da soma de vitamina C e Fe^{2+} no de-

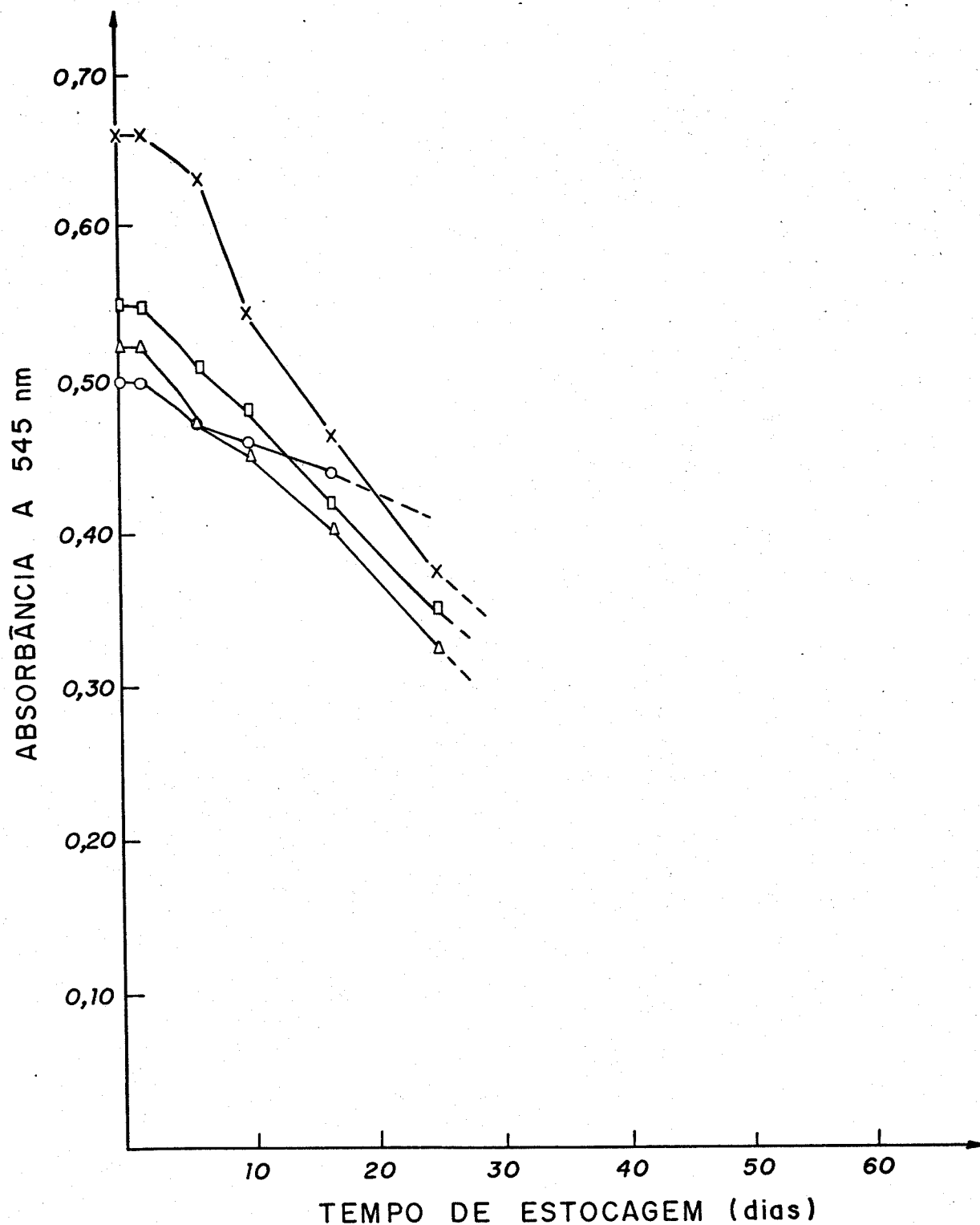


Figura 32

EXPERIMENTO DE ESTOCAGEM 1

EVOLUÇÃO DA ABSORBÂNCIA (545nm) DE SUCO DE LARANJA COM E SEM ADIÇÃO DE Fe^{2+} ATRAVÉS DA ESTOCAGEM A TEMPERATURA AMBIENTE POR 55 DIAS.

- x— Suco com Fe^{2+} na relação molar 1:1
- Suco com Fe^{2+} na relação molar 1:2
- △— Suco com Fe^{2+} na relação molar 1:5
- Suco sem Fe^{2+} (absorbância da vit. C)

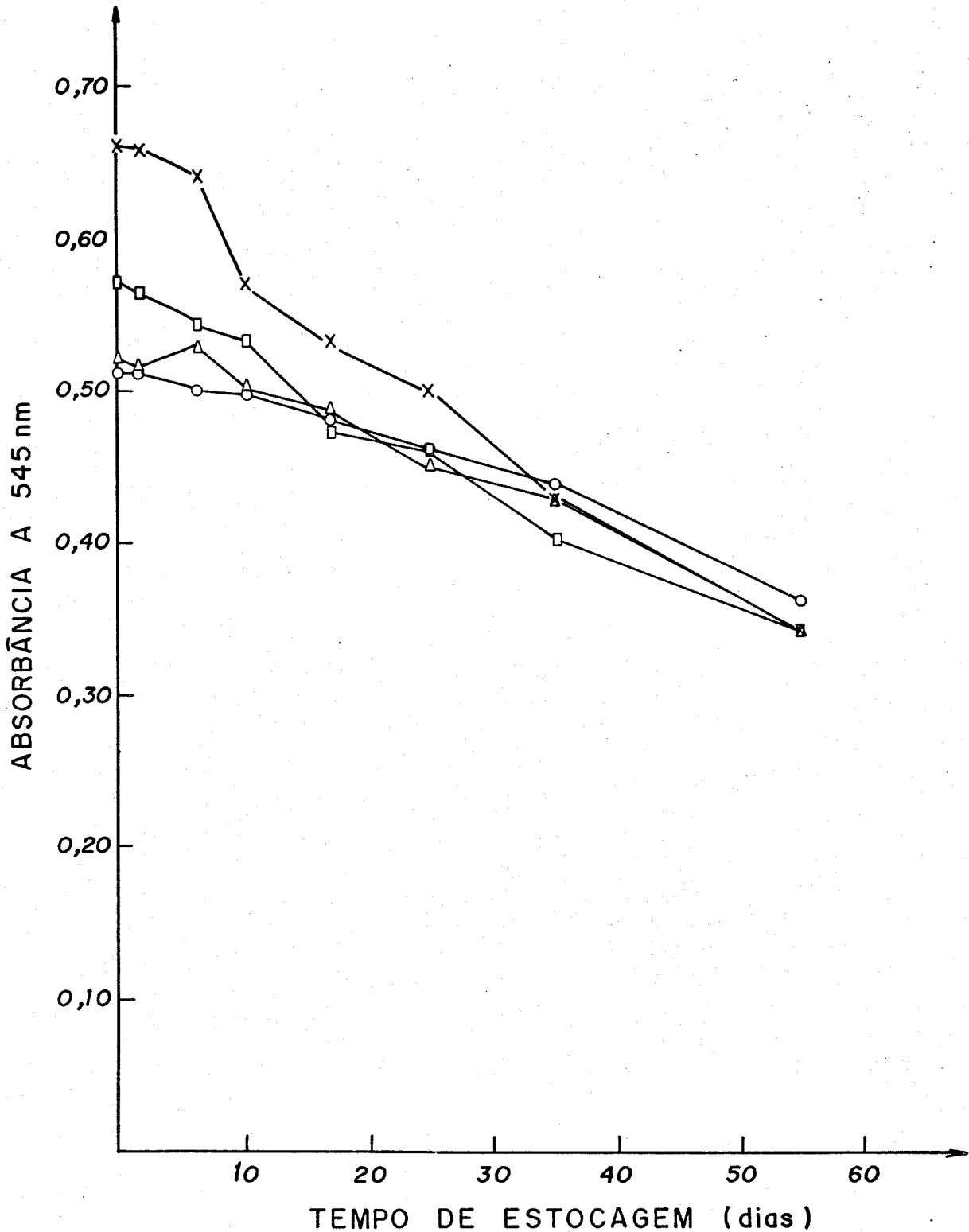


Figura 33

EXPERIMENTO DE ESTOCAGEM 1

EVOLUÇÃO DA ABSORBÂNCIA (545nm) DE SUCO DE LARANJA COM E SEM ADIÇÃO DE Fe²⁺ ATRAVÉS DA ESTOCAGEM SOB REFRIGERAÇÃO A +5,0°C POR 55 DIAS

- x— Suco com Fe²⁺ na relação molar 1:1
- Suco com Fe²⁺ na relação molar 1:2
- △— Suco com Fe²⁺ na relação molar 1:5
- Suco sem Fe²⁺ (absorbância da vit. C)

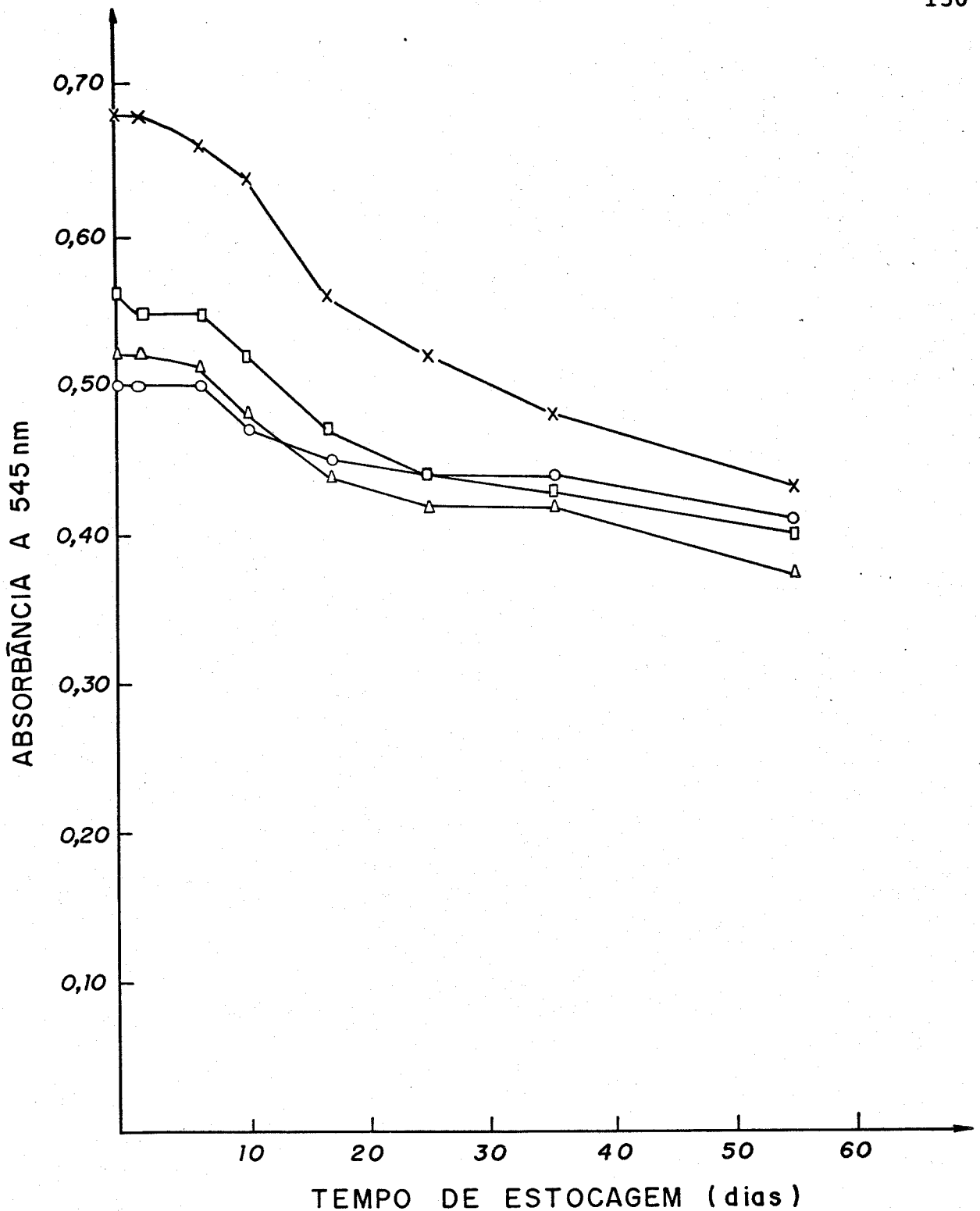


Figura 34

EXPERIMENTO DE ESTOCAGEM I

EVOLUÇÃO DA ABSORBÂNCIA (545nm) DE SUCO DE LARANJA COM E SEM ADIÇÃO DE Fe²⁺ ATRAVÉS DA ESTOCAGEM SOB CONGELAÇÃO A -18,0°C POR 55 DIAS.

- x— Suco com Fe²⁺ na relação molar 1:1
- Suco com Fe²⁺ na relação molar 1:2
- △— Suco com Fe²⁺ na relação molar 1:5
- Suco sem Fe²⁺ (absorbância da vit. C)

Tabela 20 - Experimento de Estocagem 2. Efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre a $[H_2Asc]$ e a $[Fe^{2+}]$ de suco de laranja concentrado adicionado de ferro. Valores de absorbância a 545 nm. Amostras Ia a IVa: temperatura ambiente; amostras Ib a IVb: $T = +5,0^{\circ}C$; amostras Ic a IVc: $T = - 18,0^{\circ}C$.

Dias de estocagem Amostras	Dias de estocagem							
	0	07	14	21	28	35	42	49
Ia	0,48	0,47	0,43	0,43	0,40	0,36	0,24	0,21
	0,48	0,47	0,44	0,42	0,39	0,36	0,25	0,21
IIa	0,52	0,52	0,47	0,43	0,40	0,36	0,25	0,21
	0,52	0,52	0,46	0,43	0,40	0,35	0,24	0,21
IIIa	0,56	0,55	0,49	0,47	0,43	0,38	0,26	0,23
	0,56	0,56	0,49	0,46	0,43	0,37	0,26	0,22
IVa	0,62	0,60	0,54	0,50	0,47	0,41	0,28	0,25
	0,62	0,62	0,56	0,50	0,47	0,41	0,27	0,25
Ib	0,48	0,48	0,47	0,49	0,47	0,35	0,34	0,32
	0,48	0,48	0,46	0,47	0,46	0,34	0,33	0,32
IIb	0,52	0,50	0,48	0,49	0,46	0,32	0,31	0,30
	0,52	0,51	0,49	0,50	0,46	0,32	0,31	0,30
IIIb	0,56	0,55	0,52	0,54	0,50	0,34	0,33	0,32
	0,56	0,56	0,52	0,54	0,50	0,33	0,33	0,32
IVb	0,62	0,62	0,61	0,61	0,56	0,39	0,38	0,36
	0,62	0,62	0,60	0,61	0,56	0,39	0,37	0,35
Ic	0,48	0,48	0,47	0,49	0,49	0,39	0,37	0,35
	0,48	0,47	0,48	0,49	0,48	0,40	0,37	0,35
IIc	0,52	0,50	0,51	0,51	0,50	0,38	0,35	0,33
	0,52	0,51	0,50	0,50	0,50	0,37	0,35	0,34
IIIc	0,56	0,54	0,56	0,56	0,53	0,42	0,40	0,38
	0,56	0,54	0,55	0,54	0,54	0,42	0,39	0,37
IVc	0,62	0,62	0,62	0,62	0,61	0,52	0,46	0,42
	0,62	0,62	0,62	0,61	0,61	0,52	0,46	0,42

Tabela 21 - Experimento de Estocagem 2. Efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre a $[Fe^{2+}]$ do suco de laranja concentrado adicionado de ferro. Valores de absorvância a 510 nm. Amostras Ia a IVa: temperatura ambiente; amostras Ib a IVb: $T = + 5,0^{\circ}C$; amostras Ic a IVc: $T = - 18,0^{\circ}C$.

Amostra \ Dias de estocagem	Dias de estocagem								
	0	07	14	21	28	35	42	49	
Ia	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	
	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	
IIa	0,17	0,17	0,16	0,15	0,15	0,15	0,14	0,14	
	0,17	0,16	0,16	0,15	0,15	0,15	0,14	0,14	
IIIa	0,39	0,39	0,34	0,32	0,31	0,27	0,25	0,25	
	0,40	0,40	0,33	0,32	0,32	0,26	0,25	0,25	
IVa	0,71	0,69	0,62	0,55	0,54	0,45	0,43	0,42	
	0,70	0,68	0,60	0,55	0,53	0,46	0,44	0,43	
Ib	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	
	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	
IIb	0,17	0,17	0,16	0,16	0,15	0,15	0,15	0,14	
	0,17	0,17	0,16	0,16	0,15	0,15	0,14	0,14	
IIIb	0,39	0,39	0,36	0,34	0,31	0,28	0,27	0,26	
	0,40	0,38	0,35	0,34	0,32	0,28	0,27	0,26	
IVb	0,71	0,68	0,68	0,67	0,62	0,48	0,48	0,48	
	0,70	0,67	0,67	0,67	0,62	0,49	0,48	0,47	
Ic	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	
	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	
IIc	0,17	0,17	0,17	0,16	0,15	0,15	0,14	0,14	
	0,17	0,17	0,17	0,16	0,15	0,14	0,14	0,14	
IIIc	0,39	0,39	0,38	0,36	0,34	0,33	0,32	0,30	
	0,40	0,38	0,38	0,37	0,34	0,33	0,31	0,30	
IVc	0,71	0,70	0,70	0,69	0,67	0,65	0,62	0,60	
	0,70	0,71	0,71	0,70	0,68	0,66	0,64	0,60	

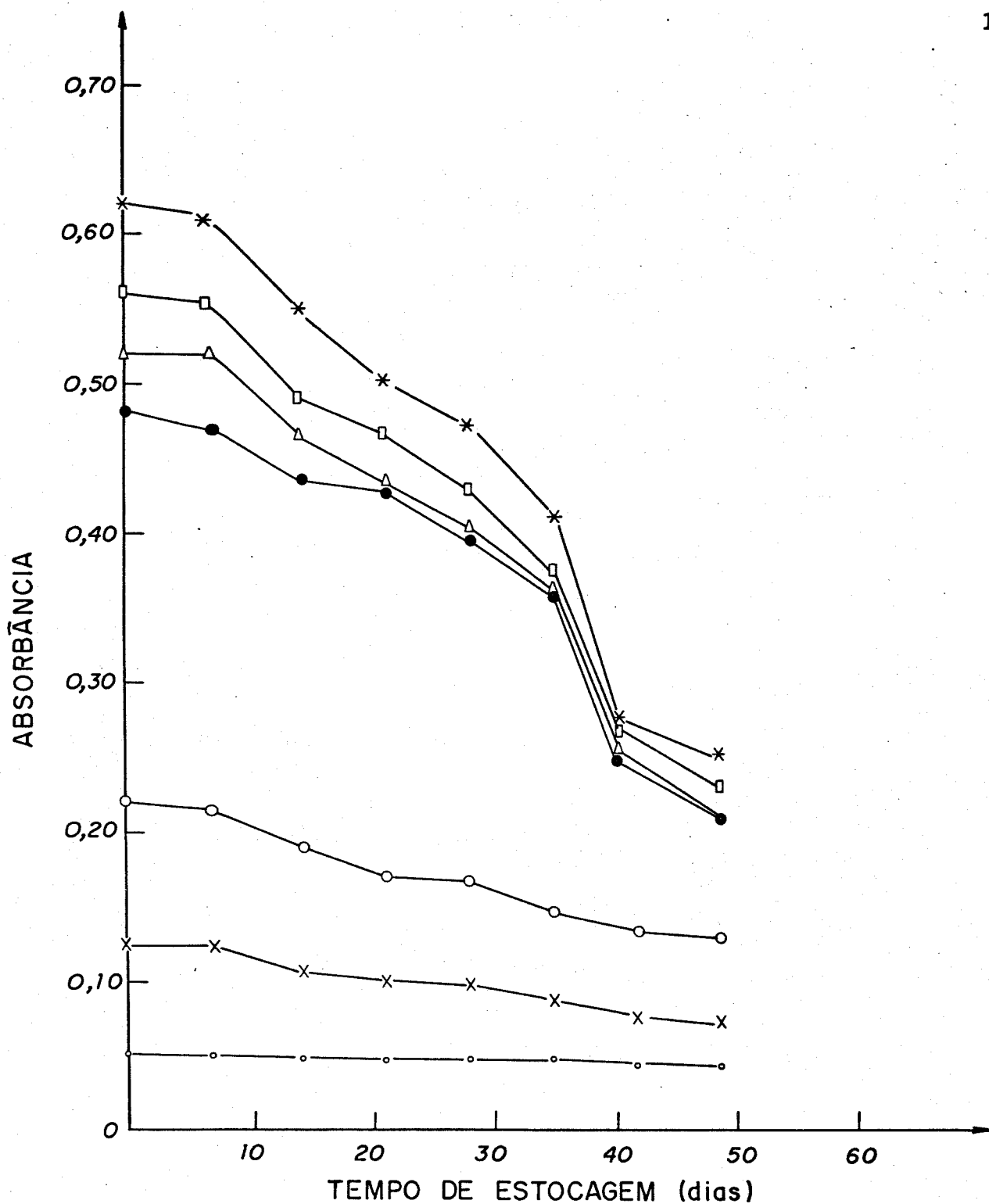


Figura 35

EXPERIMENTO DE ESTOCAGEM 2

EVOLUÇÃO DA ABSORBÂNCIA A 545 nm DE SUCO DE LARANJA COM E SEM ADIÇÃO DE Fe^{2+} ATRAVÉS DA ESTOCAGEM A TEMPERATURA AMBIENTE POR 49 DIAS .

- | | | |
|-----|--------------------------------------------------|------------------------------|
| —x— | Suco com Fe^{2+} na relação molar 1:1 |] $\lambda = 545 \text{ nm}$ |
| —□— | Suco com Fe^{2+} na relação molar 1:2 | |
| —△— | Suco com Fe^{2+} na relação molar 1:5 | |
| —●— | Suco sem Fe^{2+} (absorbância da vit C) | |
| —○— | Absorbância do Fe^{2+} no suco 1:1 |] $\lambda = 510 \text{ nm}$ |
| —x— | Absorbância do Fe^{2+} no suco 1:2 | |
| —○— | Absorbância do Fe^{2+} no suco 1:5 | |

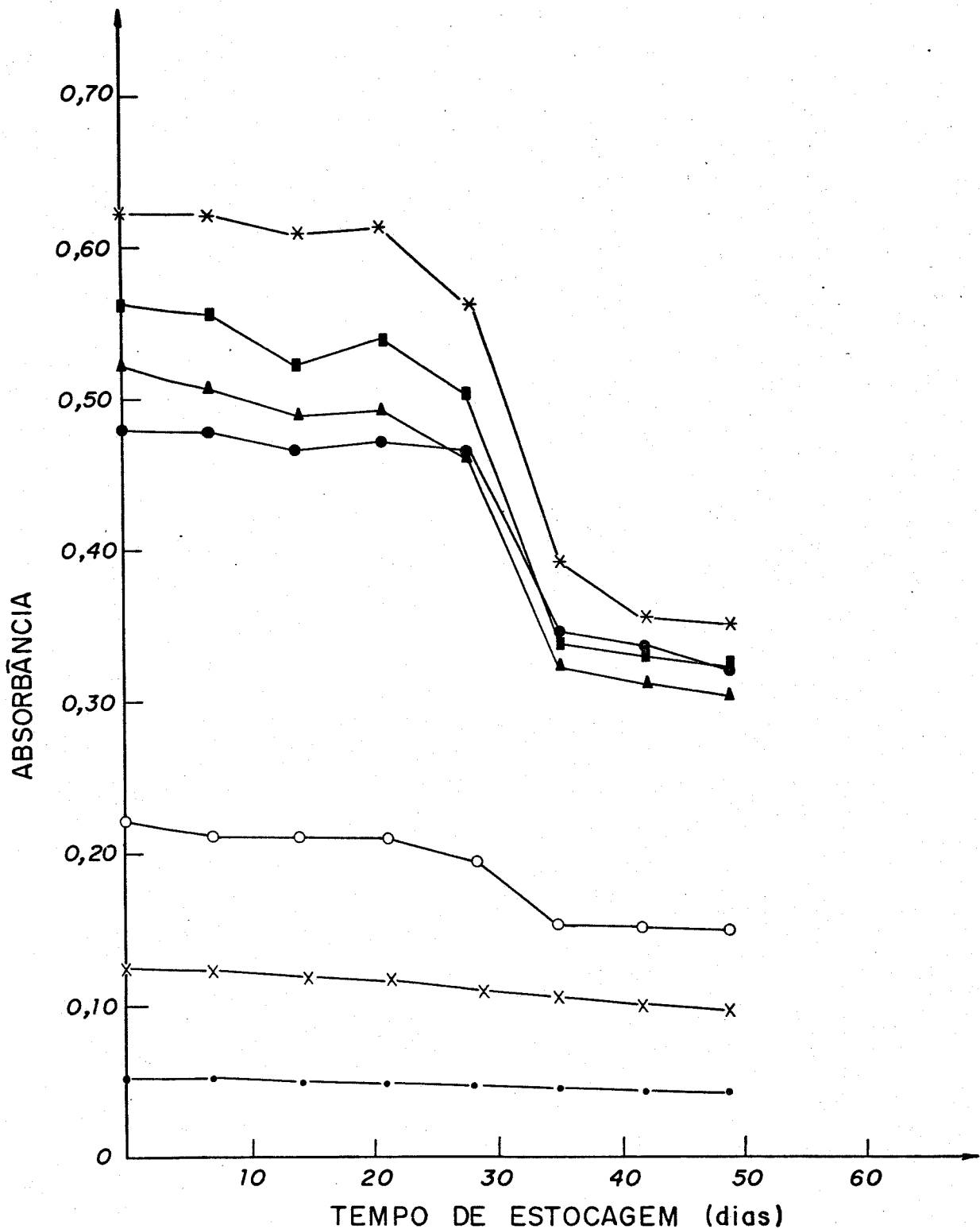


Figura 36

EXPERIMENTO DE ESTOCAGEM 2

EVOLUÇÃO DA ABSORBÂNCIA A 545 nm DE SUCO DE LARANJA COM E SEM ADIÇÃO DE Fe²⁺ ATRAVÉS DA ESTOCAGEM SOB REFRIGERAÇÃO A +5,0°C POR 49 DIAS.

- | | | |
|-----|---------------------------------------------------|------------|
| —*— | Suco com Fe ²⁺ na relação molar 1:1 | λ = 545 nm |
| —■— | Suco com Fe ²⁺ na relação molar 1:2 | |
| —▲— | Suco com Fe ²⁺ na relação molar 1:5 | |
| —●— | Suco sem Fe ²⁺ (absorbância de vit. C) | |
| —○— | Absorbância do Fe ²⁺ no suco 1:1 | λ = 510 nm |
| —×— | Absorbância do Fe ²⁺ no suco 1:2 | |
| —·— | Absorbância do Fe ²⁺ no suco 1:5 | |

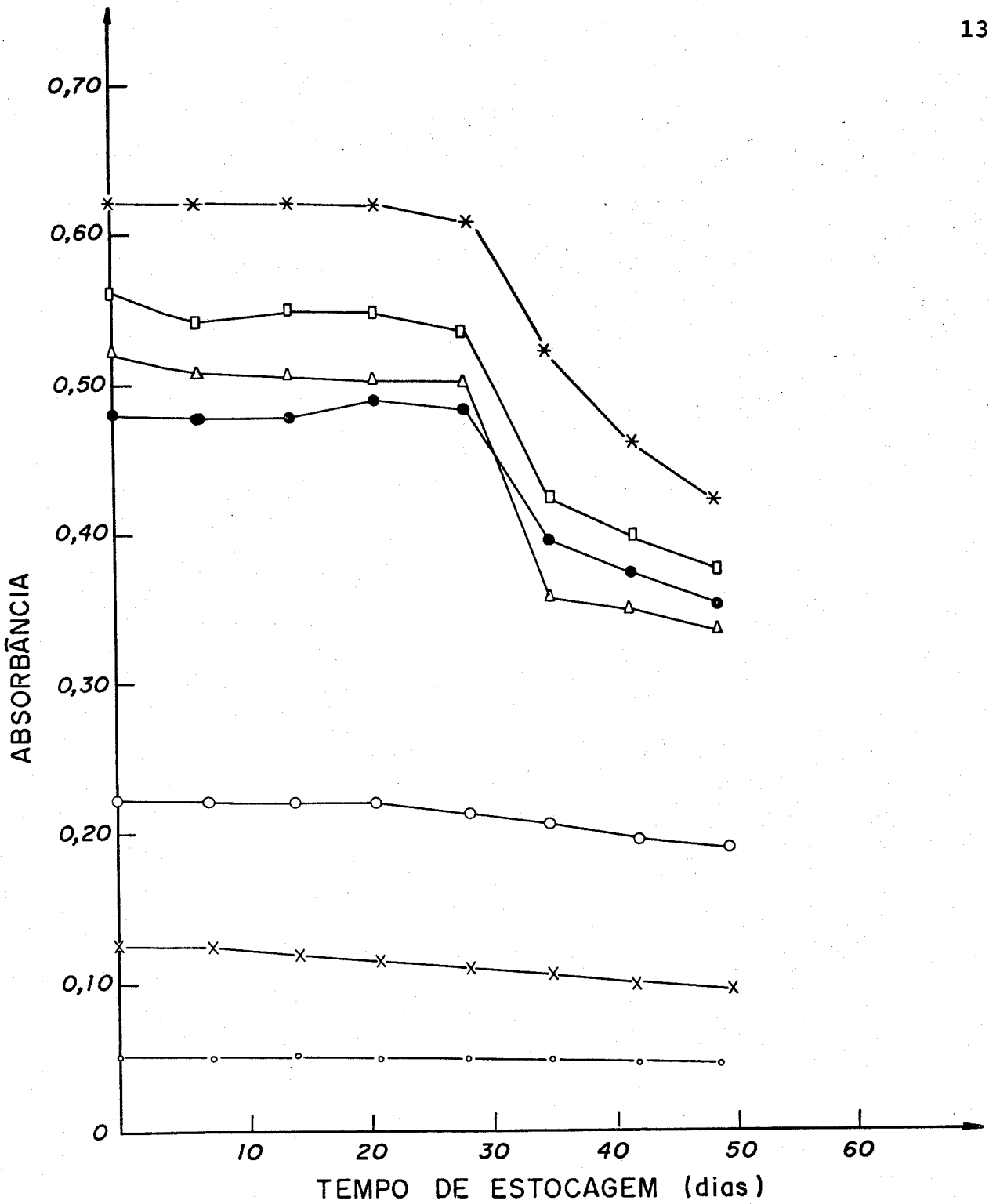


Figura 37

EXPERIMENTO DE ESTOCAGEM 2

EVOLUÇÃO DA ABSORBÂNCIA A 545 nm DO SUCO DE LARANJA COM E SEM ADIÇÃO DE Fe²⁺ ATRAVÉS DE ESTOCAGEM SOB CONGELAÇÃO A -18,0°C POR 49 DIAS.

- *— Suco com Fe²⁺ na relação molar 1:1
 - Suco com Fe²⁺ na relação molar 1:2
 - △— Suco com Fe²⁺ na relação molar 1:5
 - Suco sem Fe²⁺ (absorbância da vit C)
 - Absorbância do Fe²⁺ no suco 1:1
 - x— Absorbância do Fe²⁺ no suco 1:2
 - Absorbância do Fe²⁺ no suco 1:5
- λ = 545 nm
λ = 510 nm

correr da estocagem.

Com os dados das Tabelas 22, 23 e 24 construiu-se as Figuras 38 e 39 que representam a porcentagem de perda do Fe^{2+} e da vitamina C separadamente, em cada temperatura, durante o período de estocagem.

A Figura 40 mostra o espectro de absorção dos carotenóides (pigmentos amarelos) do suco de laranja do Experimento de Estocagem 2. Os espectros foram obtidos após um dia e após 49 dias de estocagem a $-18,0^{\circ}C$.

A Figura 41 mostra os espectros de absorção dos carotenóides do suco de laranja do Experimento de Estocagem 2, no primeiro e no último dia de estocagem. As amostras foram estocadas à temperatura ambiente por 49 dias.

A Figura 42 mostra os espectros de absorção dos pigmentos solúveis em água das amostras de suco de laranja do Experimento de Estocagem 2. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 49 dias.

As Tabelas 26 e 27 apresentam dados da variação da absorbância dos carotenóides (% perda) do suco de laranja armazenado a $-18,0^{\circ}C$ e à temperatura ambiente, respectivamente, por 49 dias.

A Tabela 28 apresenta dados da variação dos pigmentos solúveis em água (% aumento) do suco de laranja armazenado à temperatura ambiente por 49 dias.

Tabela 22 - Perdas de vitamina C e Fe^{2+} (expressas em absorvância e em porcentagem) do suco de laranja sem e com ferro em várias relações molares estocado à temperatura ambiente por 49 dias. As perdas correspondem às diferenças de absorvância entre o primeiro dia e o dia considerado.

Amostra	Tempo de estocagem (dias)							
	07	14	21	28	35	42	49	
A	(a) Suco com Fe^{2+} na relação 5:1 % diminuição	0,001 0,20	0,055 10,6	0,090 17,3	0,120 23,1	0,165 31,7	0,270 51,9	0,310 59,6
	(b) Suco sem Fe^{2+} % diminuição	0,01 2,10	0,045 9,40	0,06 12,5	0,085 17,7	0,120 25,0	0,235 48,9	0,270 56,3
	(c) Fe^{2+} no suco 5:1 % diminuição	0,002 3,80	0,003 5,70	0,006 11,3	0,006 11,3	0,006 11,3	0,009 17,0	0,009 17,0
	(d) Soma b + c % diminuição	0,012 2,30	0,048 9,0	0,066 12,4	0,091 17,1	0,126 23,6	0,244 45,8	0,279 52,3
B	(a) Suco com Fe^{2+} 2:1 % diminuição	0,050 8,90	0,070 12,5	0,095 17,0	0,130 23,2	0,185 33,0	0,300 53,6	0,340 60,7
	(b) Suco sem Fe^{2+} % diminuição	0,010 2,10	0,045 9,40	0,055 11,5	0,085 17,7	0,120 25,0	0,235 49,0	0,270 56,3
	(c) Fe^{2+} no suco 2:1 % diminuição	0,00 0,00	0,020 16,1	0,024 19,4	0,025 20,2	0,041 33,1	0,046 37,1	0,046 37,1
	(d) Soma b + c % diminuição	0,010 1,60	0,065 10,4	0,079 12,7	0,110 17,6	0,161 25,8	0,281 45,0	0,316 50,6
C	(a) Suco com Fe^{2+} 1:1 % diminuição	0,010 1,60	0,070 11,3	0,120 19,4	0,150 24,2	0,210 33,9	0,345 55,6	0,370 59,7
	(b) Suco sem Fe^{2+} % diminuição	0,010 2,10	0,045 9,40	0,055 12,5	0,085 17,7	0,120 25,0	0,235 48,9	0,270 56,3
	(c) Fe^{2+} no suco 1:1 % diminuição	0,005 2,30	0,029 13,1	0,047 21,3	0,052 23,5	0,077 34,8	0,084 38,0	0,087 39,4
	(d) Soma b + c % diminuição	0,015 2,10	0,074 10,6	0,102 14,6	0,137 19,5	0,197 28,1	0,319 45,5	0,357 50,9

- (a) As leituras de absorvância correspondem às perdas de vitamina C e Fe^{2+} medidas no período considerado.
- (b) A absorvância representa a perda de vitamina C no período considerado, pois essa amostra não tem Fe^{2+} .
- (c) A absorvância correspondente ao Fe^{2+} isoladamente foi obtida por determinação com o-fenantrolina e conversão desse valor correspondente à sua determinação com 2,2'-biquinolina.
- (d) A soma b+c representa as perdas de vitamina C e Fe^{2+} calculadas de maneira indireta, ao contrário da medida direta obtida em a.

Tabela 23 - Perdas de vitamina C e Fe^{2+} (expressas em absorbância e em porcentagem) do suco de laranja sem e com ferro em várias relações molares estocado sob refrigeração a + 5,0°C por 49 dias. As perdas correspondem às diferenças de absorbância entre o 1º dia e o dia considerado.

Amostra	Tempo de estocagem (dias)							
	07	14	21	28	35	42	49	
A	(a) Suco com Fe^{2+} na relação 5:1 % diminuição	0,015 2,90	0,035 6,70	0,004 7,70	0,060 11,5	0,200 38,5	0,210 40,4	0,220 42,3
	(b) Suco sem Fe^{2+} % diminuição	0,00 0,00	0,015 3,10	0,00 0,00	0,015 3,10	0,135 28,1	0,145 30,2	0,160 33,4
	(c) Fe^{2+} no suco 5:1 % diminuição	0,00 0,00	0,003 5,70	0,003 5,70	0,006 11,4	0,006 11,4	0,007 13,2	0,009 17,0
	(d) Soma b + c % diminuição	0,00 0,00	0,018 3,40	0,003 0,60	0,021 3,90	0,141 26,5	0,152 28,5	0,169 31,7
B	(a) Suco com Fe^{2+} 2:1 % diminuição	0,005 0,90	0,040 7,10	0,020 3,60	0,060 10,7	0,225 40,2	0,230 41,1	0,240 42,9
	(b) Suco sem Fe^{2+} % diminuição	0,00 0,00	0,015 3,10	0,00 0,00	0,015 3,10	0,135 28,1	0,145 30,2	0,160 33,4
	(c) Fe^{2+} no suco 2:1 % diminuição	0,003 2,40	0,013 10,5	0,017 13,7	0,025 20,2	0,036 29,0	0,039 31,5	0,042 33,9
	(d) Soma b + c % diminuição	0,003 4,80	0,028 4,50	0,017 2,70	0,040 6,40	0,171 27,4	0,184 29,5	0,202 32,4
C	(a) Suco com Fe^{2+} 1:1 % diminuição	0,00 0,00	0,015 2,40	0,010 1,60	0,060 9,70	0,230 37,1	0,245 39,5	0,265 42,7
	(b) Suco sem Fe^{2+} % diminuição	0,00 0,00	0,015 3,10	0,00 0,00	0,015 3,10	0,135 28,1	0,145 30,2	0,160 33,4
	(c) Fe^{2+} no suco 1:1 % diminuição	0,008 3,60	0,008 3,60	0,010 4,50	0,025 11,31	0,070 31,7	0,070 31,7	0,071 32,1
	(d) Soma b + c % diminuição	0,008 1,10	0,023 3,30	0,010 1,40	0,040 5,70	0,205 29,2	0,215 30,7	0,231 33,0

Obs.: São válidas as mesmas explicações dos itens a a d, já descritas para a Tabela 22.

O Quadro A apresenta os dados do estudo à temperatura ambiente, o Quadro B sob refrigeração e o Quadro C sob congelação, para as Tabelas 22 a 24.

Tabela 24 - Perdas de vitamina C e Fe^{2+} (expressas em absorvância e em porcentagem) do suco de laranja sem e com ferro em várias relações molares estocado sob congelação a $-18,0^{\circ}C$ por 49 dias. As perdas correspondem às diferenças de absorvância entre o 1º dia e o dia considerado.

Amostra	Tempo de estocagem (dias)							
	07	14	21	28	35	42	49	
A	(a) Suco com Fe^{2+} na relação 5:1 % diminuição	0,015 2,90	0,015 2,90	0,015 2,90	0,020 3,80	0,145 27,9	0,170 32,7	0,185 35,6
	(b) Suco sem Fe^{2+} % diminuição	0,005 1,00	0,005 1,00	0,00 0,00	0,00 0,00	0,085 17,7	0,110 22,9	0,130 25,0
	(c) Fe^{2+} no suco 5:1 % diminuição	0,00 0,00	0,00 0,00	0,003 5,70	0,006 11,4	0,008 15,1	0,009 17,0	0,009 17,0
	(d) Soma b + c % diminuição	0,005 0,90	0,005 0,90	0,003 0,60	0,006 1,20	0,093 17,4	0,119 22,3	0,139 26,10
B	(a) Suco com Fe^{2+} 2:1 % diminuição	0,020 3,80	0,005 1,00	0,010 1,90	0,025 4,80	0,140 26,9	0,165 31,7	0,185 35,6
	(b) Suco sem Fe^{2+} % diminuição	0,005 1,00	0,005 1,00	0,00 0,00	0,00 0,00	0,085 17,7	0,110 22,9	0,130 25,0
	(c) Fe^{2+} no suco 2:1 % diminuição	0,003 2,40	0,006 4,80	0,009 7,20	0,017 13,7	0,020 16,1	0,025 20,2	0,030 24,20
	(d) Soma b + c % diminuição	0,008 1,30	0,011 1,80	0,009 1,40	0,017 2,70	0,105 16,8	0,135 21,6	0,160 25,6
C	(a) Suco com Fe^{2+} 1:1 % diminuição	0,00 0,00	0,00 0,00	0,005 1,00	0,010 2,00	0,100 20,0	0,160 30,8	0,200 38,5
	(b) Suco sem Fe^{2+} % diminuição	0,005 1,00	0,005 1,00	0,00 0,00	0,00 0,00	0,085 17,7	0,110 22,9	0,130 25,0
	(c) Fe^{2+} no suco 1:1 % diminuição	0,00 0,00	0,00 0,00	0,002 0,90	0,002 0,90	0,015 6,80	0,022 10,0	0,032 14,1
	(d) Soma b + c % diminuição	0,005 0,70	0,005 0,70	0,002 0,30	0,002 0,30	0,100 14,3	0,132 18,8	0,162 23,1

Obs.: São válidas as mesmas explicações dos itens a a d, já descritas para a Tabela 22.

Tabela 25 - Conversão das leituras de Fe²⁺ feitas por o-fenantrolina (510 nm) para 2,2'-biquinolina (545 nm).

Amostra	Tempo de estocagem (dias)									
	0	7	14	21	28	35	42	49		
IIa	A - B 0,170-0,053	A - B 0,165-0,052	A - B 0,160-0,050	A - B 0,150-0,047	A - B 0,150-0,047	A - B 0,150-0,047	A - B 0,140-0,044	A - B 0,140-0,044	A - B 0,140-0,044	A - B 0,140-0,044
IIIa	A - B 0,395-0,124	A - B 0,395-0,124	A - B 0,335-0,105	A - B 0,320-0,100	A - B 0,315-0,099	A - B 0,265-0,083	A - B 0,250-0,079	A - B 0,250-0,079	A - B 0,250-0,079	A - B 0,250-0,079
IVa	A - B 0,705-0,221	A - B 0,685-0,215	A - B 0,610-0,192	A - B 0,550-0,173	A - B 0,535-0,168	A - B 0,455-0,143	A - B 0,435-0,137	A - B 0,435-0,137	A - B 0,435-0,137	A - B 0,425-0,133
IIb	A - B 0,170-0,053	A - B 0,170-0,053	A - B 0,160-0,050	A - B 0,160-0,050	A - B 0,150-0,047	A - B 0,150-0,047	A - B 0,145-0,045	A - B 0,145-0,045	A - B 0,145-0,045	A - B 0,140-0,044
IIIb	A - B 0,395-0,124	A - B 0,385-0,121	A - B 0,355-0,111	A - B 0,340-0,107	A - B 0,315-0,099	A - B 0,280-0,088	A - B 0,270-0,085	A - B 0,270-0,085	A - B 0,270-0,085	A - B 0,260-0,082
IVb	A - B 0,705-0,221	A - B 0,675-0,212	A - B 0,675-0,212	A - B 0,670-0,210	A - B 0,620-0,195	A - B 0,485-0,152	A - B 0,480-0,151	A - B 0,480-0,151	A - B 0,480-0,151	A - B 0,475-0,149
IIc	A - B 0,170-0,053	A - B 0,170-0,053	A - B 0,170-0,053	A - B 0,160-0,050	A - B 0,150-0,047	A - B 0,145-0,045	A - B 0,140-0,044	A - B 0,140-0,044	A - B 0,140-0,044	A - B 0,140-0,044
IIIc	A - B 0,395-0,124	A - B 0,385-0,121	A - B 0,380-0,119	A - B 0,365-0,115	A - B 0,340-0,107	A - B 0,330-0,104	A - B 0,315-0,099	A - B 0,315-0,099	A - B 0,315-0,099	A - B 0,300-0,094
IVc	A - B 0,705-0,221	A - B 0,705-0,221	A - B 0,705-0,221	A - B 0,695-0,218	A - B 0,675-0,212	A - B 0,655-0,206	A - B 0,630-0,198	A - B 0,630-0,198	A - B 0,630-0,198	A - B 0,600-0,188

Fórmula usada para cálculo:

$$\text{Abs. da 2,2'-biquinolina} = \text{Abs. da o-fen} \times \frac{5,0}{10,0} \times \frac{6,530}{10,400} = \text{Abs. da o-fen} \times 0,314$$

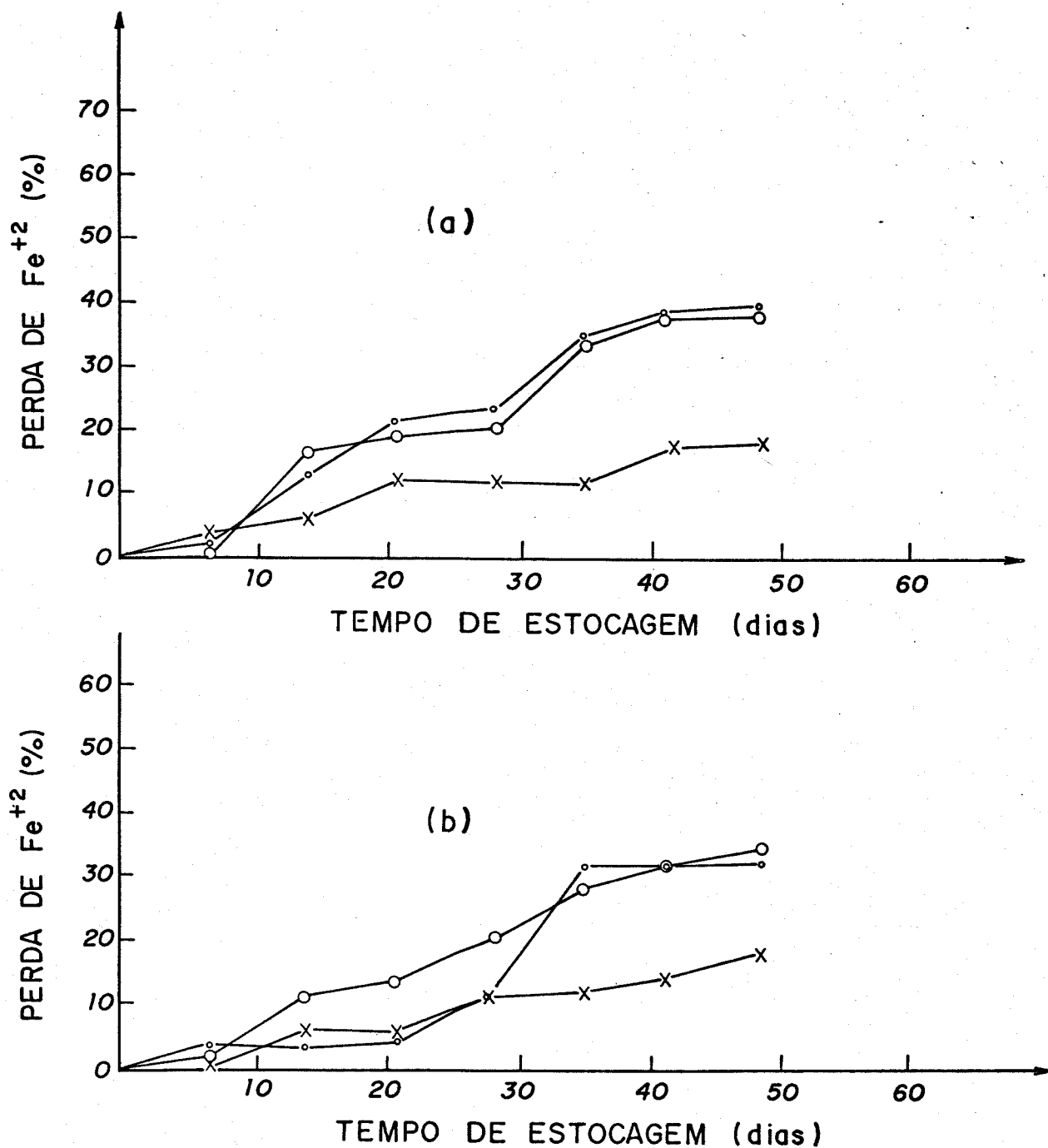


Figura 38

PERDA DE Fe²⁺(%) EM SUCO DE LARANJA ADICIONADO DE SULFATO FERROSO DURANTE A ESTOCAGEM POR 49 DIAS.

a) Estocagem à temperatura ambiente

b) Estocagem a +5,0 °C

- x— Relação Fe²⁺: Vit. C 1:5
- o— Relação Fe²⁺: Vit. C 1:2
- o— Relação Fe²⁺: Vit. C 1:1

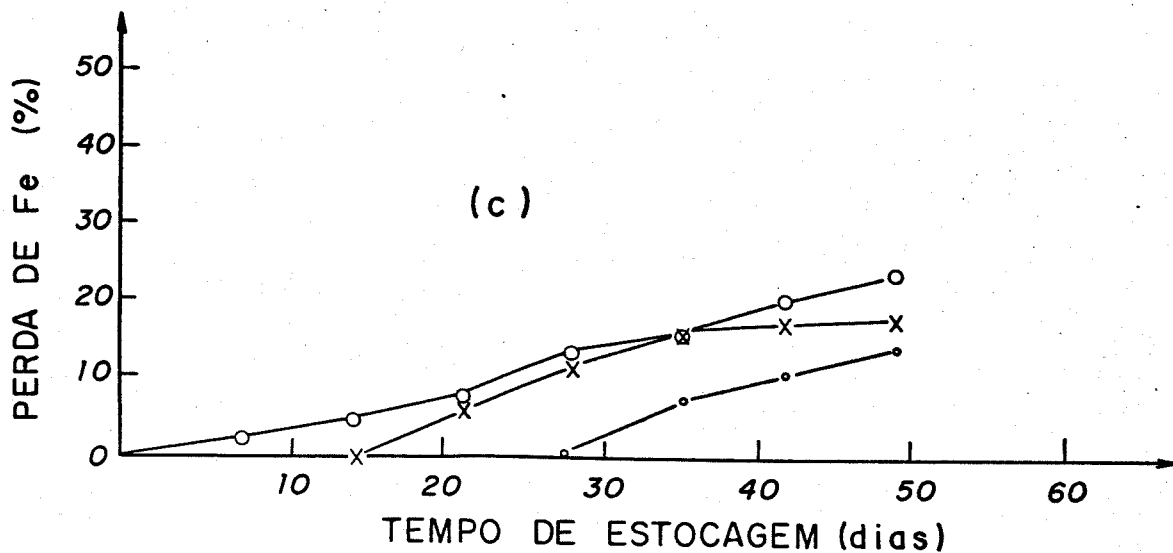


Figura 38

c) Estocagem a $-18,0^{\circ}\text{C}$

- x— Relação de Fe^{2+} : Vit. C 1:5
- o— Relação de Fe^{2+} : Vit. C 1:2
- o— Relação de Fe^{2+} : Vit. C 1:1

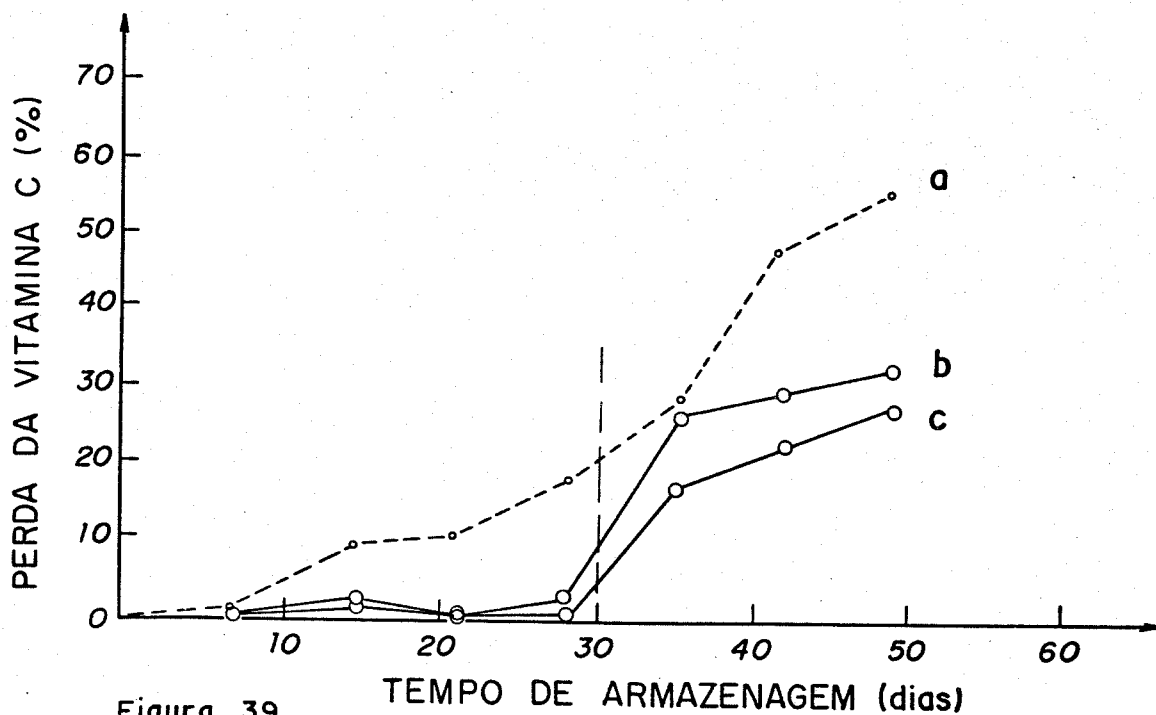


Figura 39

PERDA DE VITAMINA C DO SUCO DE LARANJA ESTOCADO À TEMPERATURA AMBIENTE, A $+5,0^{\circ}\text{C}$ E A $-18,0^{\circ}\text{C}$ DURANTE 49 DIAS.

EXPERIMENTO DE ESTOCAGEM 2

- a) Temperatura ambiente (Ia)
- b) Refrigerado $+5,0^{\circ}\text{C}$ (Ib)
- c) Congelado $-18,0^{\circ}\text{C}$ (Ic)

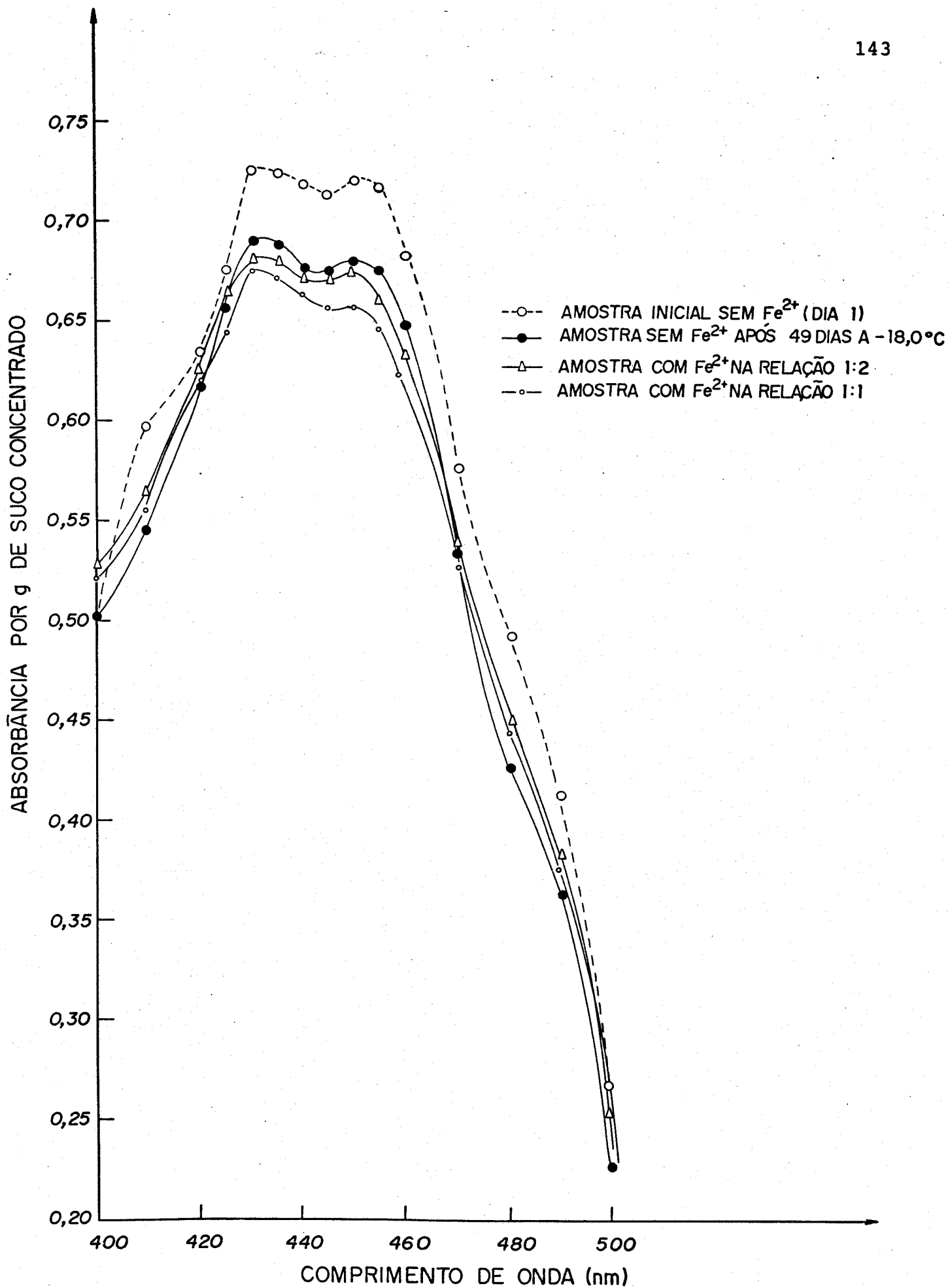


Figura 40

ESPECTRO DE ABSORÇÃO DOS CAROTENÓIDES DE SUCO DE LARANJA COM E SEM Fe^{2+} ARMAZENADO A $-18,0^{\circ}C$ POR 49 DIAS

* O ESPECTRO INICIAL FOI IGUAL PARA AS AMOSTRAS COM OU SEM ADIÇÃO DE Fe^{2+} .

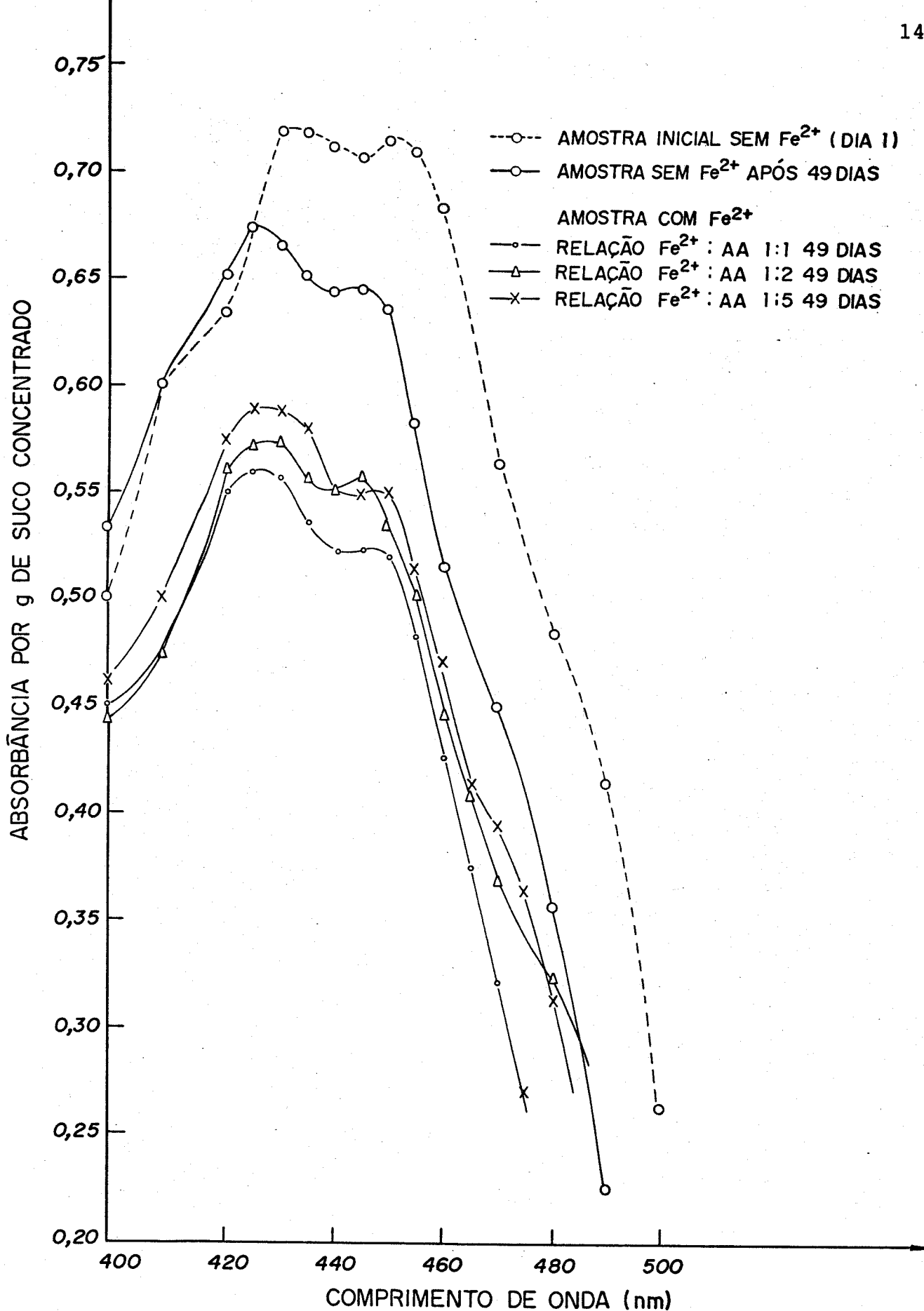


Figura 41

ESPECTROS DE ABSORÇÃO DOS CAROTENÓIDES DE SUCO DE LARANJA COM E SEM Fe²⁺ ARMAZENADO À TEMPERATURA AMBIENTE POR 49 DIAS.

* O ESPECTRO INICIAL FOI SEMELHANTE PARA AMOSTRAS COM OU SEM ADIÇÃO DE Fe²⁺.

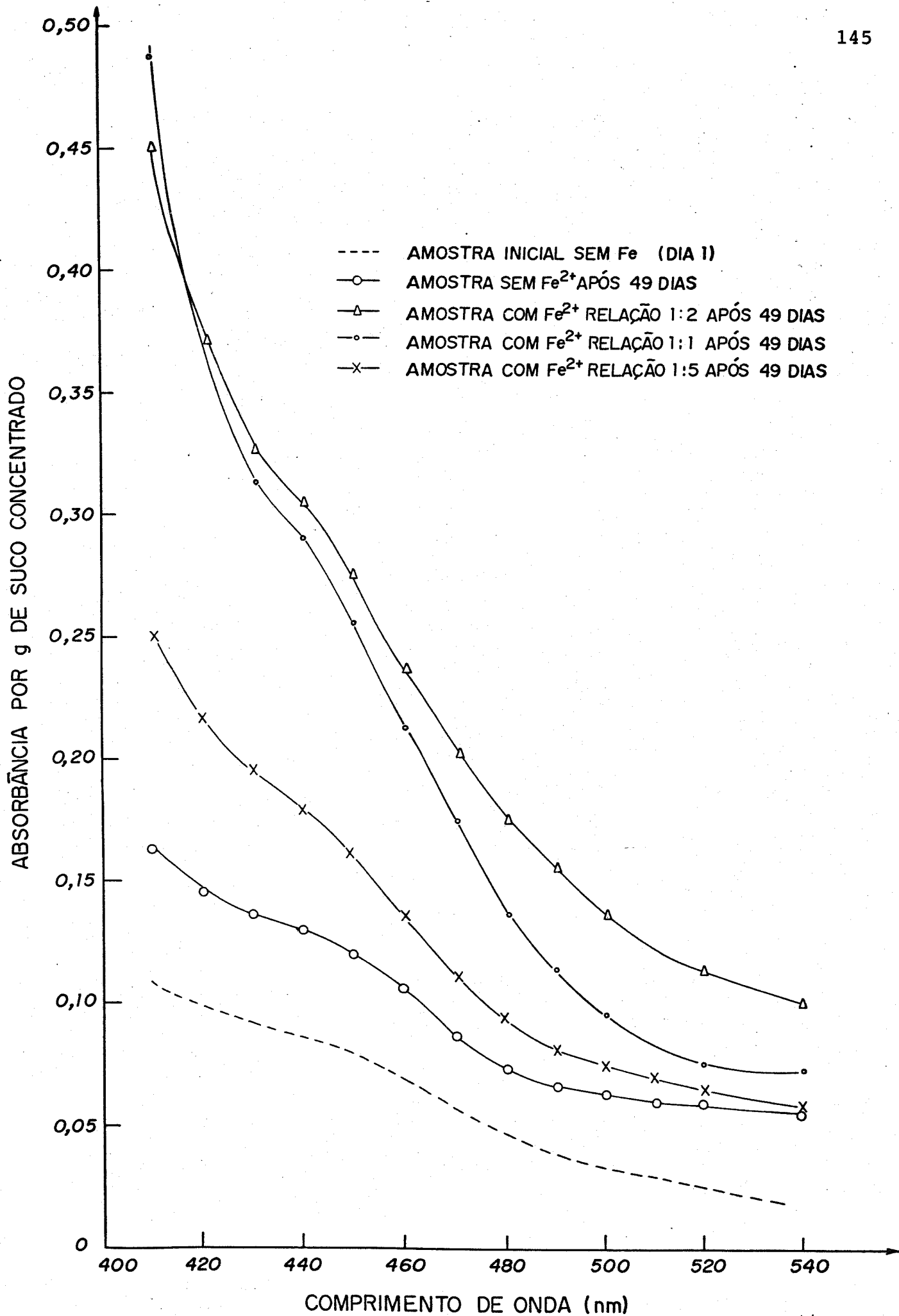


Figura 42

ESPECTROS DE ABSORÇÃO DOS PIGMENTOS SOLÚVEIS EM ÁGUA DE SUCO DE LARANJA COM E SEM Fe²⁺ ARMAZENADO À TEMPERATURA AMBIENTE POR 49 DIAS.

Tabela 26 - Variação da absorbância dos carotenóides do suco de laranja com e sem adição de Fe^{2+} armazenado congelado a $-18,00^{\circ}C$, por 49 dias.

Tempo de estocagem (dias)	Absorbância a 450 nm por g de suco concentrado			
	Amostra sem Fe^{2+}	com Fe^{2+} relação 1:5	com Fe^{2+} relação 1:2	com Fe^{2+} relação 1:1
01	0,715	0,720	0,725	0,720
30	0,705 (1,4)	0,700 (2,8)	0,705 (2,8)	0,695 (3,5)
49	0,675 (5,6)	0,680 (5,6)	0,675 (6,9)	0,655 (9,0)

Tabela 27 - Variação da absorvância dos carotenóides do suco de laranja com e sem adição de Fe^{2+} armazenado à temperatura ambiente, por 49 dias.

Tempo de estocagem (dias)	Absorvância a 450 nm por g de suco concentrado			
	Amostra sem Fe^{2+}	com Fe^{2+} relação 1:5	com Fe^{2+} relação 1:2	com Fe^{2+} relação 1:1
01	0,710	0,715	0,710	0,720
30	0,695	0,660	0,660	0,645
49	0,645	0,550	0,535	0,520
	Perda (%)	Perda (%)	Perda (%)	Perda (%)
	-	-	-	-
	(2,1)	(7,7)	(7,0)	(10,4)
	(9,2)	(23,1)	(24,6)	(27,8)

Tabela 28 - Variação da absorbância dos pigmentos da fração aquosa do suco de laranja armazenado à temperatura ambiente por 49 dias.

Tempo de estocagem (dias)	Absorbância a 450 nm por g de suco concentrado			
	Amostra sem Fe ²⁺	com Fe ²⁺ relação 1:5	com Fe ²⁺ relação 1:2	com Fe ²⁺ relação 1:1
01	0,080 -	0,090 -	0,135 -	0,145 -
30	(38)	(61)	(63)	(52)
49	(50)	(78)	(103)	(76)

IV.5. Ensaio Biológico

A Tabela 29 mostra a classificação dos ratos em grupos de acordo com o peso.

Tabela 29 - Divisão dos ratos em grupos de acordo com o peso.

<u>Grupo 1</u>		<u>Grupo 2</u>		<u>Grupo 3</u>	
Rato	Peso (g)	Rato	Peso (g)	Rato	Peso (g)
15	54	34	52	28	51
18	56	21	54	26	57
09	59	29	58	35	61
33	69	13	64	06	70
36	80	05	80	22	75
07	81	25	80	27	89
Média	66,5	Média	64,7	Média	67,2
<u>Grupo 4</u>		<u>Grupo 5</u>		<u>Grupo 6</u>	
Rato	Peso (g)	Rato	Peso (g)	Rato	Peso (g)
20	46	23	53	14	51
11	55	31	54	12	56
02	61	01	63	24	61
16	68	04	68	19	64
30	75	17	70	32	71
10	66	03	81	08	81
Média	61,8	Média	64,8	Média	64,0

A Tabela 30 mostra os valores da dosagem inicial da hemoglobina do sangue dos ratos.

Tabela 30 - Dosagem de hemoglobina dos ratos (g/100 mL) a 540 nm
(início do experimento)

Rato	% T	Hgb (g/100 mL)	Rato	% T	Hgb (g/100 mL)
01	38,0	13,4	19	42,0	12,0
02	44,0	11,4	20	34,0	14,9
03	35,0	14,5	21	29,0	17,1
04	22,0	21,0	22	35,0	14,5
05	26,0	18,6	23	41,0	12,3
06	40,0	12,6	24	37,0	13,7
07	36,0	14,1	25	36,0	14,1
08	36,0	14,1	26	44,0	11,4
09	36,0	14,1	27	31,0	16,1
10	41,0	12,3	28	34,0	14,9
11	37,0	13,7	29	34,0	14,9
12	28,0	17,6	30	30,0	16,6
13	32,0	15,7	31	23,0	20,3
14	30,0	16,6	32	23,0	20,3
15	40,0	12,6	33	22,0	21,0
16	36,0	14,1	34	27,0	18,0
17	34,0	14,9	35	20,0	22,3
18	32,0	15,7	36	27,0	18,0

A Tabela 31 mostra a taxa de hemoglobina dos ratos no final da fase de depleção. Obs.: Ratos adultos com taxa de hemoglobina 12,0 - 14,0 g/100 mL podem ser considerados anêmicos.

Tabela 31 - Dosagem da hemoglobina dos ratos (g/100 mL) a 540nm no final da fase de depleção.

Rato	% T	Hemoglobina (g/100 mL)	Rato	% T	Hemoglobina (g/100 mL)
01	34,0	14,9	19	87,0	9,0
02	57,0	7,7	20	42,0	12,0
03	56,0	8,0	21	87,0	9,0
04	36,0	14,1	22	50,0	9,5
05	35,0	14,5	23	43,0	11,6
06	47,0	10,4	24	52,0	9,0
07	48,0	10,1	25	32,0	15,7
08	47,0	10,4	26	80,0	9,0
09	51,0	9,3	27	65,0	8,0
10	47,0	10,4	28	52,0	9,0
11	47,0	10,4	29	50,0	9,5
12	45,0	11,0	30	29,0	17,1
13	52,0	9,0	31	44,0	11,4
14	55,0	8,2	32	56,0	8,0
15	50,0	9,5	33	40,0	12,6
16	40,0	12,6	34	72,0	8,0
17	40,0	12,6	35	55,0	8,2
18	43,0	11,6	36	37,0	13,7

A Tabela 32 fornece os dados de consumo de ração durante o período de repleção.

Tabela 32 - Consumo de ração (g). Período de repleção (14 dias).

Dieta	Rato	Período (dias)					
		02	03	02	02	03	02
A	27	23,46	37,15	25,61	24,95	35,98	32,42
	13	29,26	38,96	30,02	28,50	43,99	33,22
	15	21,96	41,13	39,50	37,27	40,84	37,61
	10	24,96	35,81	24,75	35,53	40,42	39,18
	17	30,24	37,29	32,45	29,38	46,61	32,58
	36	30,12	36,53	38,32	33,83	38,56	35,28
	Média	26,67	37,81	31,77	31,57	41,07	35,05
B	34	22,69	37,84	40,39	39,89	41,57	38,86
	35	32,73	37,70	42,24	43,09	47,03	40,68
	29	27,70	39,03	37,83	38,71	39,23	39,82
	06	30,60	37,23	38,62	41,50	45,83	40,42
	20	27,51	41,12	32,23	30,35	43,58	32,56
	05	33,85	37,37	38,97	34,13	45,54	32,66
	Média	29,18	38,38	38,38	37,95	43,80	37,33
C	32	33,94	40,65	44,09	30,76	43,93	37,75
	19	29,32	36,85	44,47	29,04	41,55	40,82
	07	32,99	40,81	42,32	26,70	43,39	42,19
	11	36,01	35,50	43,03	29,44	40,71	38,40
	18	31,76	39,13	41,78	28,03	41,83	39,75
	25	33,72	39,39	38,77	31,85	42,51	40,09
	Média	32,96	38,72	42,41	29,30	42,32	39,83

Tabela 32 - Consumo de ração (g). Período de repleção (14 dias).
(Continuação).

Dieta	Rato	Período (dias)					
		02	03	02	02	03	02
D	03	30,72	39,68	40,37	24,18	41,93	39,42
	26	29,12	41,47	33,44	29,63	39,28	39,13
	28	31,84	39,13	36,78	31,36	40,81	40,34
	31	33,56	36,65	40,04	33,05	40,41	39,38
	23	29,14	41,20	33,77	30,57	42,24	29,80
	04	33,54	39,50	40,62	31,57	42,35	42,53
	Média	31,32	39,61	37,50	30,06	41,17	38,43
E	02	32,09	39,29	37,76	26,56	41,84	42,08
	24	32,19	39,89	36,13	24,16	38,76	40,46
	09	36,59	37,17	38,45	29,66	39,29	40,81
	08	29,57	42,09	37,34	24,92	41,25	40,54
	33	29,50	42,09	29,75	26,96	41,66	35,09
	30	31,58	40,99	38,84	26,57	41,78	42,94
	Média	31,75	40,25	36,38	26,47	40,76	40,32
F	14	36,41	47,43	41,21	28,59	44,53	37,33
	21	38,84	42,99	38,31	28,87	48,10	39,87
	22	33,93	42,66	27,13	28,72	46,62	37,40
	12	34,96	48,65	38,84	29,47	48,15	35,17
	16	24,22	37,22	29,67	29,70	46,41	40,89
	01	36,44	47,65	39,16	28,98	47,44	45,29
	Média	34,13	44,43	35,72	29,06	46,87	39,33

A Tabela 33 fornece o consumo de ferro durante esse mesmo período. Obs.: Não consta o consumo de ferro do Grupo A porque a dieta era isenta de ferro.

Tabela 33 - Consumo de ferro (mg). Período de repleção (14 dias).

Dieta	Rato	Período (dias)					
		02	03	02	02	03	02
B	34	0,635	1,06	1,13	1,12	1,16	1,09
	35	0,916	1,06	1,18	1,21	1,32	1,14
	29	0,776	1,09	1,06	1,08	1,10	1,12
	06	0,857	1,04	1,08	1,16	1,28	1,13
	20	0,770	1,15	0,902	0,849	1,22	0,884
	05	0,948	1,05	1,09	0,956	1,27	0,915
	Média	0,817	1,08	1,07	1,06	1,23	1,05
C	32	0,950	1,14	1,23	0,861	1,23	1,06
	19	0,821	1,03	1,25	0,813	1,16	1,14
	07	0,924	1,14	1,18	0,747	1,21	1,18
	11	1,01	0,994	1,20	0,824	1,14	1,07
	18	0,889	1,10	1,17	0,785	1,17	1,11
	25	0,944	1,10	1,08	0,892	1,19	1,12
	Média	0,92	1,08	1,20	0,82	1,18	1,11

Tabela 33 - Consumo de ferro (mg). Período de repleção (14 dias)
(Continuação).

Dieta	Rato	Período (dias)					
		02	03	02	02	03	02
D	03	0,860	1,11	1,13	0,677	1,17	1,10
	26	0,815	1,16	0,936	0,829	1,10	1,10
	28	0,892	1,09	1,03	0,878	1,14	1,13
	31	0,940	1,03	1,12	0,925	1,13	1,10
	23	0,816	1,15	0,945	0,856	1,18	0,834
	04	0,939	1,11	1,14	0,884	1,18	1,19
	Média	0,88	1,11	1,05	0,84	1,15	1,08
E	02	0,898	1,30	1,06	0,744	1,17	1,18
	24	0,901	1,12	1,01	0,676	1,08	1,13
	09	1,02	1,04	1,07	0,830	1,10	1,14
	08	0,799	1,18	1,05	0,698	1,16	1,14
	33	0,826	1,18	0,833	0,755	1,17	0,983
	30	0,884	1,15	1,09	0,744	1,17	1,20
	Média	0,89	1,13	1,02	0,74	1,14	1,13
F	14	1,02	1,33	1,15	0,800	1,25	1,05
	21	1,09	1,20	1,07	0,808	1,35	1,12
	22	0,950	1,19	0,760	0,804	1,31	1,05
	12	0,980	1,36	1,09	0,825	1,35	0,985
	16	0,678	1,04	0,831	1,832	1,30	1,15
	01	1,02	1,33	1,10	0,811	1,33	1,27
	Média	0,96	1,24	1,00	0,81	1,32	1,10

A Tabela 34 apresenta a variação da taxa de hemoglobi na durante o período de repleção.

Tabela 34 - Repleção da hemoglobina. Período: 14 dias.

DIETAS	RATO	Período (dias)			
		0	07	12	14
A	27	8,0	7,0	10,4	5,3
	13	9,0	12,0	9,8	8,2
	15	9,5	8,2	9,8	8,5
	10	10,4	8,2	8,0	8,7
	17	12,6	5,9	8,5	8,0
	36	13,7	9,8	6,5	9,5
	Média	10,5	8,5	8,8	8,0
B	34	8,0	7,7	19,2	12,3
	35	8,2	9,5	16,6	14,5
	29	9,5	11,0	17,1	21,6
	06	10,4	12,0	17,6	16,6
	20	12,0	12,6	14,5	18,6
	05	14,5	16,6	16,6	22,3
	Média	10,4	11,6	16,9	17,7
C	32	8,0	14,9	19,7	16,6
	19	9,0	11,0	22,3	16,6
	07	10,1	13,0	22,3	19,2
	11	10,4	13,7	18,6	17,6
	18	11,6	11,0	22,3	16,6
	25	15,7	13,0	22,3	22,3
	Média	10,8	12,8	21,3	18,2

Tabela 34 - Repleção da hemoglobina. Período: 14 dias (Continuação).

DIETAS	RATO	Período (dias)			
		0	07	12	14
D	03	8,0	13,7	22,3	18,0
	26	9,0	13,0	19,2	18,6
	28	9,0	13,0	22,3	16,6
	31	11,4	13,0	15,7	14,5
	23	11,6	19,2	22,3	14,9
	04	14,1	13,7	19,2	20,3
	Média	10,5	14,3	20,2	17,2
E	02	7,7	17,6	20,3	19,2
	24	9,0	13,4	18,6	14,9
	09	9,3	13,0	15,7	13,0
	08	10,4	14,9	22,3	15,7
	33	12,6	14,5	22,3	17,1
	30	17,1	15,7	22,3	18,6
	Média	11,0	14,9	20,3	16,4
F	14	8,2	13,0	18,0	18,0
	21	9,0	19,7	20,3	18,6
	22	9,5	14,5	19,7	14,5
	12	11,0	12,6	19,7	13,4
	16	12,6	16,6	22,3	14,9
	01	14,9	19,2	22,3	19,2
	Média	10,9	15,9	20,4	16,4

A Tabela 35 apresenta os dados da quantidade de ferro ingerido durante o período de repleção (média de cada grupo) e a variação da taxa de hemoglobina (média) em função do tempo.

Tabela 35 - Repleção da hemoglobina.

DIETAS	NÚMERO DE DIAS	FERRO INGERIDO (mg)	DOSAGEM DE HEMOGLOBINA (g/100 mL)
A	0	-	10,5
	7	-	8,5
	12	-	8,8
	14	-	8,0
B	0	-	10,4
	7	3,00	11,6
	12	5,26	16,9
	14	6,31	17,7
C	0	-	10,8
	7	3,20	12,8
	12	5,20	21,3
	14	6,31	18,2
D	0	-	10,5
	7	3,04	14,3
	12	5,03	20,2
	14	6,11	17,2
E	0	-	11,0
	7	3,04	14,9
	12	4,92	20,3
	14	6,05	16,4
F	0	-	10,9
	7	3,20	15,9
	12	5,33	20,4
	14	6,43	16,4

A Figura 43 apresenta as curvas da repleção da hemoglobina dos ratos em função da quantidade de ferro ingerido, dados da Tabela 35.

A Figura 44 mostra as curvas da repleção da hemoglobina dos ratos em função do tempo, durante o período de repleção.

A Tabela 36 apresenta os dados do balanço metabólico e da biodisponibilidade do ferro.

Cálculo da Biodisponibilidade Absoluta e Relativa

De posse dos dados da Tabela 35 construiu-se as Figuras 43 e 44 que apresentam as curvas da variação das taxas de hemoglobina em função da quantidade de ferro ingerido e em função do tempo, respectivamente.

De acordo com a literatura /83/, o ferro hemoglobínico pode ser calculado a partir da hemoglobina total, representando 0,34% da hemoglobina.

Com os dados de ferro hemoglobínico inicial e final e de ferro ingerido, calculou-se a % de retenção de ferro, ou seja, a Biodisponibilidade absoluta para cada grupo. Para esses cálculos foram utilizados os dados relativos ao 12º dia da fase de repleção (pico da taxa de hemoglobina).

$$\% \text{ Retenção} = \frac{\text{Fe(H}_g\text{b)} \text{ final} - \text{Fe(H}_g\text{b)} \text{ inicial}}{\text{Fe ingerido}} \times 100$$

ou Biodisponibilidade Absoluta

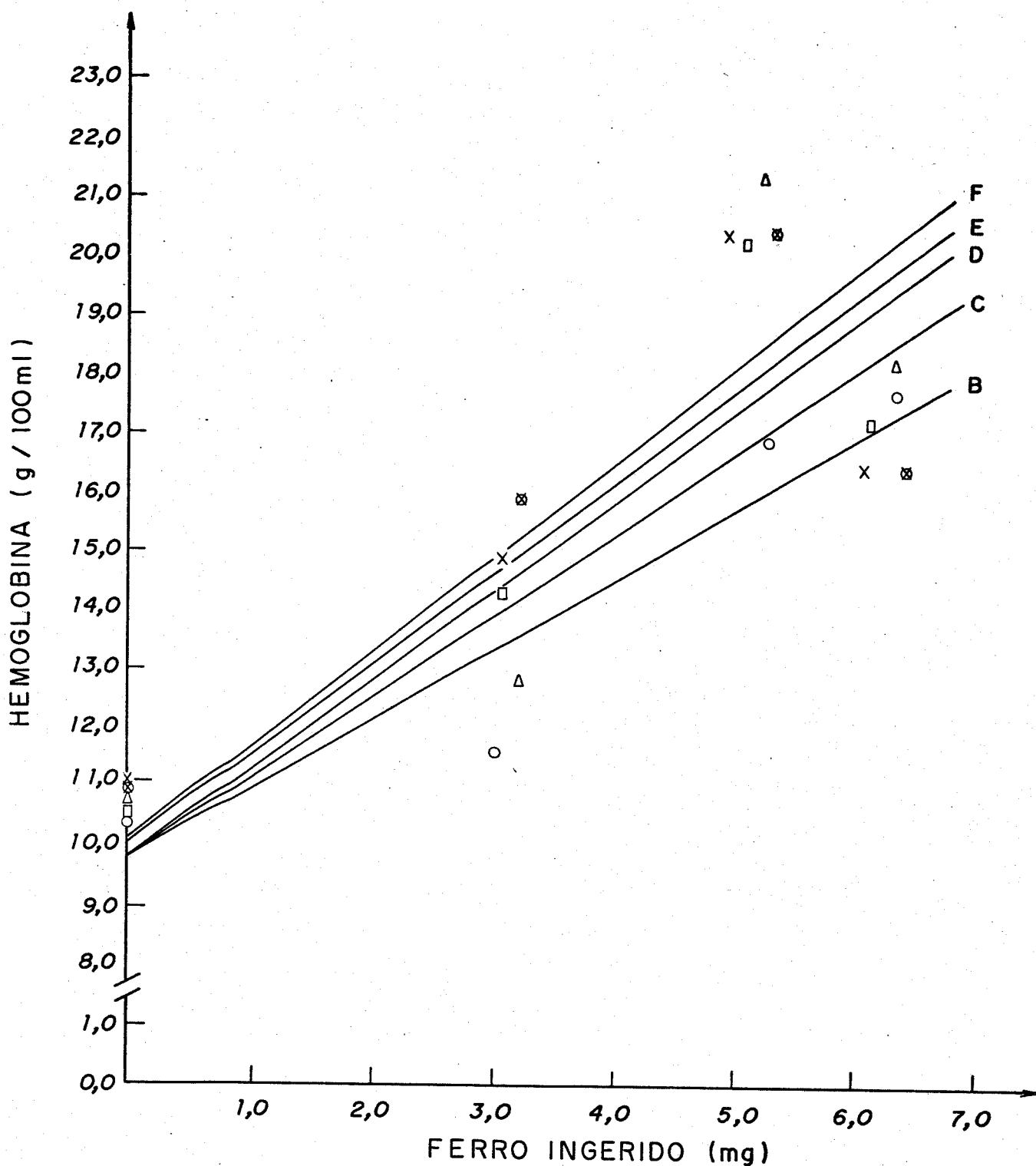


Figura 43

REPLEÇÃO DA HEMOGLOBINA x FERRO INGERIDO

- DIETA A : ISENTA DE FERRO
 DIETA B : CONTEM SULFATO FERROSO
 DIETA C : SULFATO FERROSO E ÁC. ASCÓRBICO 1:2
 DIETA D : SULFATO FERROSO E VITAMINA C 1:5
 DIETA E : SULFATO FERROSO E VITAMINA C 1:2
 DIETA F : SULFATO FERROSO E VITAMINA C 1:2

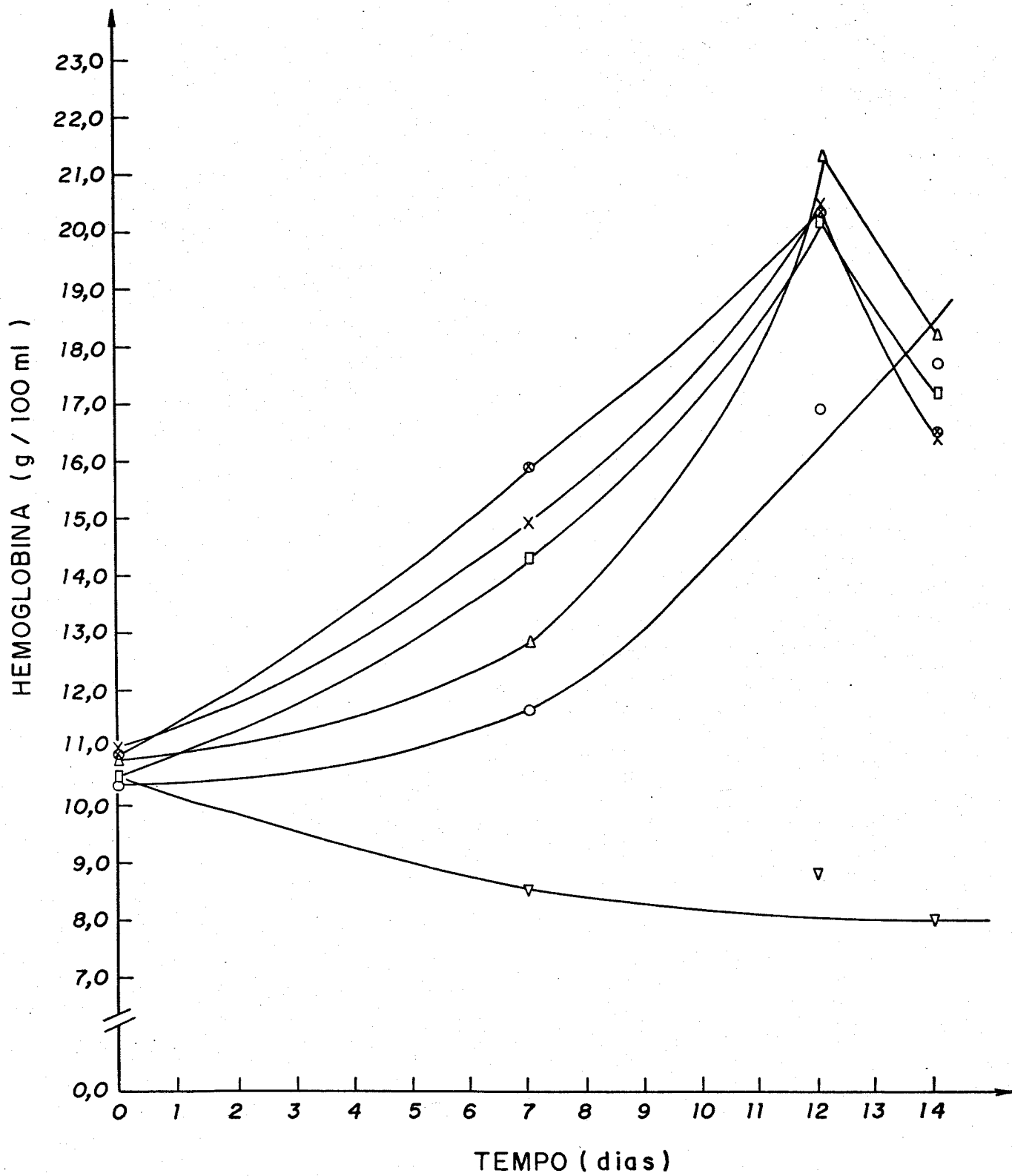


Figura 44

REPLEÇÃO DA HEMOGLOBINA x TEMPO

—▽—	A	—△—	C	—X—	E
—○—	B	—□—	D	—⊙—	F

Tabela 36 - Biodisponibilidade de ferro de várias dietas. Período de repleção: 14 dias.

DIETAS		A	B	C	D	E	F	
RETEÇÃO DE FERRO HEMATÍNICO	Nível de ferro Inicial	3,57	3,54	3,67	3,57	3,74	3,71	
	hematínico (mg) Final	2,99	5,75	7,24	6,87	6,90	6,94	
	Consumo de ferro na dieta (mg)	-	5,26	5,20	5,03	4,92	5,33	
	Retenção de ferro	-	0,42	0,69	0,66	0,64	0,61	
	Biodisponibilidade absoluta	-	42%	69%	66%	64%	61%	
	Biodisponibilidade relativa	-	-	120%	129%	133%	136%	
RETEÇÃO DE FERRO PELO BALANÇO METABÓLICO	Consumo de ferro na dieta	-	5,26	5,20	5,03	4,92	5,33	
	mg de ferro	Urina	0,27	0,27	0,29	0,31	0,30	0,27
		Fezes	0,65	0,55	0,66	0,42	0,47	0,51
	Balanço de ferro	-	0,84	0,82	0,86	0,84	0,85	
	Biodisponibilidade absoluta	-	84%	82%	86%	84%	85%	
Biodisponibilidade relativa	-	-	97%	102%	100%	101%		

Obs.: Os níveis de ferro encontrados na urina dos ratos foram muito superiores aos esperados em vista de o sistema de coleta de urina permitir que porções de dieta caiam no frasco coletor, contaminando a urina com o ferro presente na dieta.

Grupo B	% Retenção = 42,0%
Grupo C	% Retenção = 68,6%
Grupo D	% Retenção = 65,6%
Grupo E	% Retenção = 64,2%
Grupo F	% Retenção = 60,6%

Com os dados da inclinação das curvas da Figura 43 calculou-se a Biodisponibilidade Relativa.

Curvas	B	$\alpha = 1,19$
	C	$\alpha = 1,43$
	D	$\alpha = 1,53$
	E	$\alpha = 1,58$
	F	$\alpha = 1,62$

19) Biodisponibilidade Relativa (B.D.R.), em relação à dieta de caseína e sulfato ferroso (curva B).

$$\text{B.D.R. C/B} = \frac{1,43}{1,19} \times 100 = 120\%$$

$$\text{B.D.R. D/B} = \frac{1,53}{1,19} \times 100 = 129\%$$

$$\text{B.D.R. E/B} = \frac{1,58}{1,19} \times 100 = 133\%$$

$$\text{B.D.R. F/B} = \frac{1,62}{1,19} \times 100 = 136\%$$

2º) Biodisponibilidade Relativa em relação à dieta de caseína, sulfato ferroso e ácido ascórbico (curva C).

$$\text{B.D.R. B/C} = \frac{1,19}{1,43} \times 100 = 83\%$$

$$\text{B.D.R. D/C} = \frac{1,53}{1,43} \times 100 = 107\%$$

$$\text{B.D.R. E/C} = \frac{1,58}{1,43} \times 100 = 111\%$$

$$\text{B.D.R. F/C} = \frac{1,62}{1,43} \times 100 = 113\%$$

Análise Estatística dos Dados

Inicialmente foram calculadas as médias das taxas de hemoglobina para cada tratamento (dieta) utilizando os dados da Tabela 35 referentes ao 12º dia de repleção.

Tratamento	Média
A	8,8 ± 1,45
B	16,9 ± 1,53
C	21,3 ± 1,66
D	20,2 ± 2,66
E	20,3 ± 2,68
F	20,4 ± 1,67

A seguir, fez-se a análise de variância calculando-se a Tabela ANOVA e a constante F de acordo com o método apresentado por Bender et alii /84/.

O valor de F calculado pela Tabela ANOVA (29,98) é maior que o valor tabelado (2,60). Podemos então concluir que há uma diferença significativa entre as médias de nossos seis grupos experimentais.

Tabela ANOVA - Cálculos da soma dos quadrados

FONTE	GL	SQ	QM	F
Bloco	05	10,40	2,08	-
Tratamento	05	666,96	133,39	29,98
Resíduo	25	111,24	4,45	-
Total	35	788,60	-	-

$$F_{0,05} (5,25) = 2,60 \text{ (tabelado) /84/}.$$

onde GL é o número de graus de liberdade

SQ é a soma dos quadrados

QM é a soma dos quadros mínimos

F é o teste de significância.

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO

V.1. Determinação de Ácido Ascórbico, de Fe^{2+} e de Misturas Equimolares de Ambos em Sistema Bifásico

A determinação de ácido ascórbico em meio de tampão acetato 0,50 M mostrou ser praticamente independente do pH, como se pode ver pelos dados da Tabela A.01 e pela Figura 01. A absorvância relativa ao complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ varia muito pouco quando se passa de pH 2,65 a 6,00, o que traz grande vantagem à determinação desse micronutriente em vários tipos de amostras com diferentes faixas de acidez. Os valores de ϵ' ficaram praticamente constantes, na faixa de 8,00 a 9,00 $\times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Em meio de tampão citrato 0,50 M a determinação de ácido ascórbico mostrou alguma variação com o pH, tendo sido melhor (valor de ϵ' mais alto) em pH mais ácido (Tabela A.02 e Figura 02). Provavelmente, em pH mais altos, haja interferência do citrato na determinação em vista deste formar complexo com Cu^{2+} com constante de estabilidade alta /85/ ($\log K \text{ estab} = 12,0$) o que, de certa forma, compete com a formação do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$.

Em meio de tampão metafosfato 0,50 M o sistema se comportou de maneira análoga à da determinação em meio de citrato, sendo mais quantitativa em pH 2,65 com o valor de ϵ' mais próximo do valor esperado (Tabela A.03 e Figura 03).

Observação: definimos como ϵ' o coeficiente de absorvância molar condicional, isto é, dependente do meio de reação que nem sempre é igual ao valor de ϵ relatado na literatura.

A determinação de Fe^{2+} em meio de tampão acetato 0,50M também mostrou ser praticamente independente do pH (Tabela A.04 e Figura 04), apresentando o mesmo valor de ϵ' em pH 4,00, 4,65 e 6,00 ($\epsilon' = 6,7 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e um valor ligeiramente menor em pH 2,65 ($5,8 \times 10^3$) $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Provavelmente um pH mais ácido interfere em alguma extensão na formação do complexo $\text{Cu}(\text{cuproína})_2^+$.

Em meio de tampão citrato 0,50 M a determinação de Fe^{2+} mostrou ser extremamente dependente do pH, como se pode ver pelos dados da Tabela A.05 e pela Figura 05. O íon citrato, sendo um bom agente quelante para ferro /85/ ($\log K \text{ estab} = 7,3$) interfere na reação de redução de íons cúpricos, seqüestrando o Fe^{2+} , impedindo que ele reaja com Cu^{2+} . Esse efeito é observado muito mais intensamente em pH menos ácidos como 4,00, 4,65 e 6,00, ao passo que em pH 2,65 é um pouco menos acentuado pois em pH ácidos há pouco ânion citrato livre para seqüestrar o Fe^{2+} . Assim, com o aumento do pH aumenta a concentração de ânions citrato e conseqüentemente o poder seqüestrante pelo ferro.

Em pH 2,65 o valor do ϵ' esteve abaixo do valor esperado, embora ainda considerável. Nos outros pH o valor do ϵ' foi desprezível indicando que praticamente não houve formação do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$. Houve inibição quase total da reação de redução de íons cúpricos a pH 4,00, 4,65 e 6,00 e a pH 2,65 ocorreu em menor extensão do que a esperada.

Em meio de tampão metafosfato 0,50 M a determinação de Fe^{2+} mostrou o mesmo efeito embora menos intenso que em meio de citrato, isto é, o efeito seqüestrante do metafosfato pelo Fe^{2+} aumenta com o aumento do pH. Pode-se ver pelos dados da Tabela A.06 e pela Figura 06 que em pH 2,65 não houve inibição da

reação, isto é, o metafosfato não apresentou poder seqüestrante do Fe^{2+} , tendo-se conseguido o valor do ϵ' esperado, concordante com a literatura /76/. Em pH 4,00 e 4,65 houve inibição parcial da reação, embora o valor de ϵ' ainda tenha sido relativamente grande. Mas em pH 6,00 houve inibição quase total da reação, o complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ praticamente não se forma. Comparando o efeito seqüestrante do metafosfato pelo Fe^{2+} vemos que o citrato é um agente quelante muito mais forte que o metafosfato para Fe^{2+} , no sistema em estudo. Esses dados estão de acordo com os valores das constantes de formação de complexo do ácido cítrico e do ácido metafosfórico com o ferro.

As Tabelas 01, 02 e 03 apresentam dados da determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} , em quantidades equimolares. Esse estudo é de particular interesse visto que, pela mesma reação (redução de íons cúpricos) se pode determinar os dois compostos de interesse nutricional no suco de laranja.

Esse método permite avaliar a soma dos teores de ácido ascórbico e de Fe^{2+} de uma única solução, no entanto, não é possível saber-se qual o teor de cada um desses componentes. Somente no caso de misturas equimolares de ambos é que se pode avaliar, por aproximação, o teor de cada um, pois sabendo-se que cada mol de Fe^{2+} reduz um mol de Cu^{2+} e cada mol de ácido ascórbico reduz dois moles de Cu^{2+} , a absorvância do complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ será uma parte devida ao Fe^{2+} e duas partes devida ao ácido ascórbico.

Em relação às tabelas já citadas, vemos que em tampão acetato (Tabela 01), a absorvância obtida (A_{obtida}) durante a determinação conjunta de ácido ascórbico e Fe^{2+} é muito próxima da soma das absorvâncias das determinações individuais ($A_{\text{teóri}}$

ca). Devemos levar em consideração que o H_2Asc e o Fe^{2+} reagem formando um complexo tão logo entram em contato, o que diminui o valor da absorbância do complexo $[Cu(cuproína)_2]^+$, levando à diferença entre A teórica e A obtida.

O estudo com citrato (Tabela 02) mostra que em pH 2,65, a absorbância obtida na determinação conjunta é a soma das absorbâncias das determinações individuais. No entanto, em pH 4,65 e 6,00 observa-se o efeito seqüestrante do citrato nas determinações individuais de Fe^{2+} , levando a grandes diferenças entre A obtida e A teórica.

Em tampão metafosfato (Tabela 03) também se observa o mesmo efeito que em tampão citrato, pois como vimos nas determinações em separado, os dados são mais quantitativos em pH 2,65, havendo interferência do meio na formação do complexo $[Cu(cuproína)_2]^+$ em pH mais altos.

V.2. Estudos do Meio de Reação (Sistema de Uma Fase)

V.2.1. Concentração do etanol

O efeito da substituição do meio bifásico pelo método de uma fase, através da adição de etanol no meio aquoso tamponado, foi o primeiro estudo abordado. Desconhecia-se se o etanol poderia causar inibição da reação de redução de Cu^{2+} pelo ácido ascórbico ou pelo Fe^{2+} inviabilizando a proposta original de determinar através de uma reação única os dois compostos de interesse nutricional no suco de laranja. Para tanto, foi necessário prefixar alguns parâmetros e reexaminá-los posteriormente para aprimoramento da técnica analítica. A literatura /86/ recomenda o uso de tampão acetato (HAc/NaAc) na zona de pH ácido. Visto que o suco de laranja tem pH entre 3 e 4 foi decidido abranger de pH 2,65 até 6,00.

O tampão citrato (ácido cítrico/citrato de sódio) também foi considerado pois o ácido cítrico é um dos solutos principais do suco de laranja e qualquer que for o tampão principal, o citrato atuará como tampão secundário.

Numa primeira aproximação, a molaridade do tampão foi fixada em $2,5 \times 10^{-2}$ M com valores de pH em 2,65, 4,65 e 6,00. O volume de reação por razões práticas e econômicas foi fixado em 5,00 mL. Sob estas condições, foi avaliada a influência do etanol adicionado nas concentrações de 50 a 80%, usando como redutor Fe^{2+} (Tabelas 14 e 16) e ácido ascórbico (Tabelas 13 e 15).

Na Tabela 13 verifica-se que a redução de Cu^{2+} pelo ácido ascórbico em tampão acetato ocorre de maneira eficiente com qualquer uma das concentrações de etanol. O desvio padrão foi pequeno e não houve diferença significativa na absorbância das reações para um mesmo pH ou para pH diferentes.

Na Tabela 15 aprecia-se a influência da porcentagem de etanol na redução de Cu^{2+} pelo ácido ascórbico em meio de citrato. Os valores de absorbância acusam que não há diferença significativa entre os meios com 50 ou 80% de etanol para um mesmo pH. A diferença existente entre pH 2,65 e 4,65 e entre pH 2,65 e 6,00 certamente não é devida ao etanol, mas sim, ao íon citrato.

Na Tabela 14 registram-se as médias, desvios padrão e coeficiente de variação da absorbância quando foi usado Fe^{2+} como redutor do Cu^{2+} onde se percebe que no tampão acetato a reação procede de maneira semelhante para as duas concentrações de etanol e independentemente do pH do sistema. O valor médio da absorbância ficou em torno de 0,416, sendo praticamente metade do valor obtido para ácido ascórbico de igual molaridade no mesmo sistema tampão.

Na Tabela 16 confirma-se que o etanol, em meio de citrato, nos limites testados, não afeta os valores de absorbância pois não há diferença significativa entre 50 e 80% de etanol para um mesmo pH. A diferença marcante entre os 3 pH não é devida ao etanol, senão ao citrato, cujo efeito é discutido mais adiante.

De um modo geral, os baixos coeficientes de variação (< 2,0%) indicam que as reações têm boa reprodutibilidade nas

duas concentrações de etanol e, particularmente, em pH 2,65. No pH 4,65 os coeficientes de variação são um pouco maiores, porém ainda abaixo de 2,0%. As reações no pH 6,00 são as menos reprodutíveis, especialmente no meio de citrato e com Fe^{2+} como redutor.

Após examinar a influência da concentração de etanol em relação à natureza do tampão e do seu pH, definiu-se uma porcentagem de etanol de 72,5%, valor suficiente para manter dissolvidas a 2,2'-biquinolina e o complexo $[\text{Cu}(2,2'\text{-biquinolina})_2]^+$. Valores menores que 50% de etanol não foram considerados por causar precipitação do ligante.

V.2.2. Influência da concentração dos tampões na reação de redução de íons cúpricos

A figura 16 mostra a influência da molaridade do tampão acetato e citrato na redução de Cu^{2+} por ácido ascórbico e Fe^{++} nos 3 valores de pH considerados. No caso do ácido ascórbico (Figura 16A), um aumento de molaridade do acetato em 10 vezes não causa mudanças importantes de absorbância. A pequena diminuição em pH 6,0 só ocorre com o tampão de concentração máxima.

Em contraste, o tampão citrato (Figura 16B) inibe a reação de forma acentuada, causando um decréscimo de absorbância de 35,6% no ensaio com ácido ascórbico em tampão de pH 6,00. Entretanto, nos sistemas de pH 4,65 e 2,65 não houve inibição

com nenhuma das molaridades testadas.

A reação com Fe^{2+} em tampão acetato (Figura 16C) mostra que a redução de Cu^{2+} procede regularmente independente do pH e da molaridade do mesmo. A reação do Fe^{2+} em tampão citrato (Figura 16D) pelo contrário, depende grandemente do pH e da molaridade. A inibição ocorre já em pH 4,65, sendo maior em pH 6,00 onde a perda de absorvância atinge 81%. Certamente que a eventual determinação de Fe^{2+} via redução de Cu^{2+} e complexação com cuproína deverá limitar-se a soluções de pH entre 2,5 e 4,65, de concentrações molares de citrato abaixo de $2,5 \times 10^{-2}$ M.

O efeito do tampão citrato em pH 6,00, na redução do Cu^{2+} pelo Fe^{2+} , provavelmente envolve a formação do quelato de citrato ferroso, limitando a concentração de Fe^{2+} livre para atuar sobre o Cu^{2+} . Se o efeito inibidor for devido apenas à formação de quelatos, como explicar então a diminuição registrada com o ácido ascórbico? Em pH 6,00 tanto o ácido ascórbico como o ácido cítrico estariam na forma de ânions, ambos competindo pelo Cu^{2+} , o substrato redutível. Visto que o citrato está numa concentração muito maior que a do ascorbato ($2,5 \times 10^{-2}$ M e $1,25 \times 10^{-3}$ M, respectivamente), a causa poderia ser a insuficiência de Cu^{2+} para formar ambos os quelatos, deficiência que seria menor quanto mais baixa fosse a molaridade do citrato, o que está de acordo com o gráfico B da figura 16, curva do pH 6,00. No entanto, a diminuição da "reatividade" parece não ser devida unicamente à quelação do Cu^{2+} , como veremos mais adiante.

Já foi mencionado que quando se trabalha com suco de laranja o tampão resultante terá obrigatoriamente citrato, cuja

concentração será função do volume e da diluição do suco de laranja utilizado na determinação. O suco fresco tem em média 0,72% de ácido cítrico /87/, porém para a determinação da vitamina C, deve ser diluído no mínimo 10 vezes, ficando então com 0,072%, que resulta em uma solução $3,74 \times 10^{-3}$ M. Este valor é muito menor que o valor inferior da Figura 16 ($2,5 \times 10^{-2}$ M).

De acordo com estas considerações, a formulação de um tampão misto acetato/citrato deverá ter acetato, preferivelmente na concentração mais baixa testada ($2,5 \times 10^{-2}$ M) e citrato numa concentração molar próxima à do suco: $3,125 \times 10^{-3}$ M.

Com este tampão misto será possível estudar o comportamento do ácido ascórbico, do Fe^{2+} ou da mistura de ambos, imitando a situação que acontecerá no suco fortificado.

V.2.3. Influência da adição de NaCl e formulação do tampão definitivo

As tentativas para "normalizar" a redução do Cu^{2+} pelo Fe^{2+} em pH 4,65 e 6,00 e pelo ácido ascórbico em pH 6,00, aumentando a concentração do Cu^{2+} , não surtiram efeito. Portanto, tentou-se o caminho da mudança da força iônica com NaCl para formar o citrato de sódio, permitindo o Fe^{2+} e provavelmente o Cu^{2+} atuarem livremente na reação de óxido-redução.

A Figura 17 mostra que quando o redutor é Fe^{2+} , a absorbância aumenta com o aumento da molaridade do NaCl, atingindo um patamar estável na concentração molar de $4,0 \times 10^{-2}$ M de

NaCl. Quando o redutor é ácido ascórbico, o patamar é atingido já com 2×10^{-2} M de NaCl. A literatura relata /88/ que o aumento da força iônica causa um deslocamento do pKa. Esses resultados são mostrados na Figura 17.

Os tampões para trabalhos futuros foram adicionados de NaCl ficando definitivamente com os seguintes componentes: acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M/citrato $3,125 \times 10^{-3}$ M/cloreto de sódio $4,00 \times 10^{-2}$ M.

V.2.4. Estudos da velocidade de reação do ácido ascórbico e do Fe^{2+} com Cu^{2+}

Uma vez definida a composição do tampão, foi estudada a velocidade de redução do Cu^{2+} por Fe^{2+} e pelo ácido ascórbico a fim de determinar o tempo ótimo para leitura espectrofotométrica.

Na Figura 18 encontra-se a relação entre absorvância e tempo de desenvolvimento da cor para pH 4,65. No tampão acetato/citrato com e sem NaCl, incluindo-se o tampão acetato apenas para comparação com e sem NaCl. A primeira leitura foi feita aos 10 segundos; nesse período, a redução do Cu^{2+} pelo Fe^{2+} nos 4 meios de reação já tinha ocorrido. Com o ácido ascórbico, em tampão misto com e sem NaCl, a redução também atingiu a estabilidade entre 0 e 10 segundos. Com tampão acetato puro, a absorvância aos 10 segundos ficou próxima dos valores do tampão misto, porém, continuou a aumentar progressivamente. O NaCl no

acetato não estabilizou a reação, apenas diminuiu a absorbância em torno de 10% (valor aos 15 minutos). Este comportamento é explicado na literatura /14/ pela oxidação completa da molécula de ácido ascórbico que não se estabiliza no intermediário ácido dehidroascórbico ou ácido dicetogulônico, os primeiros produtos de oxidação, mas progride para dar ácido oxálico e, finalmente, CO_2 .

Em tal situação, o número de moles de Cu^+ aumentará progressivamente, tal qual foi registrado no experimento em pH 4,65. Em pH 2,65 e 4,00 foi observado o mesmo fenômeno, porém, com menor intensidade. Esses resultados estão graficados na Figura 18.

O aumento progressivo da absorbância no tampão acetato puro pode causar erros se a leitura for feita depois de um minuto.

A estabilidade da absorbância no tampão acetato/citrato aumentou consideravelmente. Aparentemente, a pequena quantidade do íon citrato no tampão atua como regulador de concentração dos íons Cu^{2+} disponíveis para oxidação do ácido ascórbico cuja degradação ficaria restrita ao nível de ácido dehidroascórbico, como atestam os valores da absorbância molar, que correspondem aproximadamente à redução de dois moles de Cu^{2+} .

É interessante mencionar que a presença de NaCl no tampão acetato causa uma ligeira diminuição (~ 8,0%) da absorbância na reação com ácido ascórbico, enquanto que com Fe^{2+} a absorbância sofre um pequeno acréscimo.

V.3. Determinação de Ácido Ascórbico, de Fe^{2+} e de Misturas Equimolares de Ambos em Sistema de uma Fase, pela Reação de Redução de Ions Cúpricos

A determinação de ácido ascórbico no sistema de uma fase, em meio de tampão acetato 0,50 M, independe do pH, de maneira análoga à observada no sistema bifásico. No entanto, os valores de ϵ' obtidos nesse caso, foram muito maiores (8,00 a $9,00 \times 10^3$ no sistema bifásico contra 12,8 a $13,6 \times 10^3$ no sistema de uma fase) indicando que, mantidas as mesmas condições de tampão e pH, o meio etanólico possibilitou determinações mais quantitativas do ácido ascórbico. As Figuras 1 e 7 mostram esses dados.

Em meio de tampão citrato 0,50 M, o efeito do pH foi semelhante ao observado no sistema bifásico, sendo os valores de ϵ' maiores no pH mais ácido, decrescendo com o aumento do pH. No entanto, os valores de ϵ' para cada pH foram maiores no sistema de uma fase que no sistema bifásico. As Figuras 02 e 08 permitem essas observações.

Quando se utilizou tampões de concentração mais baixa, ou seja, $2,5 \times 10^{-2}$ M, observou-se que em meio de acetato não houve alteração dos valores de ϵ' mas houve uma sensível melhora dos resultados em meio de citrato (Figuras 09 e 10). Nota-se que a determinação de ácido ascórbico é mais quantitativa em concentrações menores de citrato, no sistema de uma fase. Provavelmente deve ser devido à baixa solubilidade do citrato em meio etanólico, que interfere na reação de redução de íons cú-

pricos.

Em meio de tampão metafosfato $2,5 \times 10^{-2}$ M, a determinação de ácido ascórbico foi quase quantitativa apenas em pH 2,65, nos demais pH os valores de ϵ' foram bastante baixos (Figura 11). Provavelmente, o meio etanólico não seja adequado para esse tampão, mesmo de baixa concentração.

A determinação de Fe^{2+} no sistema de uma fase apresentou os valores de ϵ' esperados em meio de tampão acetato 0,50 M e $2,5 \times 10^{-2}$ M, sendo independente do pH na faixa de 2,65 a 6,00 (Figuras 12 e 13). Em meio de tampão citrato $2,5 \times 10^{-2}$ M (Figura 14), a determinação foi quantitativa apenas em pH 2,65 sendo que em pH maiores ocorre interferência do citrato que sequestra o Fe^{2+} impedindo sua reação. Em tampão metafosfato $2,5 \times 10^{-2}$ M os valores de ϵ' obtidos foram próximos do valor esperado, independente do pH na faixa considerada (Figura 15).

É oportuno observar que os valores de ϵ' esperados seriam os valores relatados na literatura /76/ quando se fez a determinação de Cu^{2+} com cuproína, usando hidroxilamina como redutor. Essa determinação foi feita para constatação e comparação com nossas condições de trabalho e seus resultados encontram-se nas Tabelas A.16 e A.17 e graficamente na Figura 19. Como vemos, o valor de ϵ obtido é aquele encontrado na literatura, ou seja, $6,67 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ em meios de tampão acetato ou citrato $2,5 \times 10^{-2}$ M.

Dessa forma, na determinação de Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos, onde 1 mol de Fe^{2+} reduz 1 mol de Cu^{2+} produzindo 1 mol de Cu^+ , o valor de ϵ esperado em determinações quantitativas é o valor citado ou bem próximo desse.

Nas determinações de ácido ascórbico, onde se sabe que 1 mol de ácido ascórbico reduz 2 moles de Cu^{2+} , é de se esperar que o valor de ϵ' seja o dobro do valor obtido na determinação de ferro. Assim, definimos o ϵ' que nem sempre é igual ao ϵ (que é uma constante !) pois o ϵ' depende do meio de reação, podendo a determinação ser quantitativa ou não.

As determinações conjuntas de Fe^{2+} e ácido ascórbico em meio de tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M pH 2,65, 4,65 e 6,00 apresentaram os resultados esperados, sendo a absorvância da determinação conjunta quase sempre idêntica à soma das absorvâncias das determinações individuais.

Em tampão citrato nota-se alguma interferência do citrato em relação ao ferro, principalmente em pH menos ácido, levando a diferenças entre os valores de A obtida e A teórica.

Em tampão metafosfato, os valores da determinação conjunta foram os esperados, principalmente em pH 2,65 e 4,65, havendo diferenças entre A obtida e A teórica, apenas em pH 6,00. Como era de se esperar pelos resultados das determinações individuais de ácido ascórbico, o metafosfato não se comporta bem em meio etanólico, em pH alto.

V.4. Formação do Complexo Ferro-Ácido Ascórbico

Durante a realização de experimentos em que se tentava propor um método para a determinação simultânea de Fe^{2+} e de ácido ascórbico a partir de soluções contendo quantidades equimolares de ambos, observou-se que a absorvância da solução, relativa ao complexo $\text{Cu}(\text{cuproína})_2^+$ diminuía gradualmente com o tempo. Essa diminuição poderia ser interpretada como uma perda parcial do poder redutor do Fe^{2+} e do ácido ascórbico, causada por oxidação dos compostos pelo oxigênio ou pela formação de um composto estável, o que diminuiria a "disponibilidade" desses compostos para agirem como redutores do Cu^{2+} .

Os primeiros experimentos foram realizados em tampão acetato e citrato de molaridade fixa ($2,5 \times 10^{-2}$ M) com ajuste de pH em 2,65, 4,65 e 6,00. Os resultados mostraram que a absorvância do complexo $\text{Cu}(\text{cuproína})_2^+$ diminuía progressivamente com o tempo, acusando o envolvimento dos grupos redutores dos reagentes.

A diminuição era rápida, porém, não instantânea. A Figura 23 apresenta o comportamento de misturas equimolares de Fe^{2+} e ácido ascórbico ($0,227 \mu\text{moles/mL}$). A diminuição da absorvância foi expressa como % da absorvância da mistura no tempo.

Em tampão citrato $2,5 \times 10^{-2}$ M de pH 2,65 nota-se que a diminuição da absorvância ocorreu aproximadamente até os primeiros 20 minutos, atingindo 14,0% de redução. Após esse tempo, não houve mudança na absorvância. Já no caso do pH 4,65 e 6,00, a diminuição da absorvância continuou durante o período comple-

to do experimento (2 horas), porém a forma da curva sugere uma estabilização após esse período. A inclinação das curvas segue a ordem $\text{pH } 2,65 < \text{pH } 6,00 < \text{pH } 4,65$, indicando a influência do grau de ionização do ácido ascórbico ou do citrato na combinação do Fe^{2+} com o ácido ascórbico.

A Figura 23 mostra que em condições idênticas às do experimento anterior, a mudança do tampão acelerou a reação em qualquer um dos pH testados. Em tampão acetato 2,65, não foi observada estabilização após 20 minutos, relatada para o tampão citrato. Aproximadamente 55,0% da absorbância inicial tinha desaparecido após 2 horas. Nos tampões de pH 4,65 e 6,00 a diminuição da absorbância nos primeiros 10 minutos foi quase 100% maior do que em pH 2,65. A partir dos 30 minutos, a diminuição da absorbância da mistura no tampão de pH 4,65 mostrou tendência à estabilização enquanto que em pH 6,00 continuou a diminuir.

Uma avaliação preliminar permite concluir que em valores mais baixos de pH, a eventual formação do complexo parece ser menor e que a presença de ânions com propriedades quelantes fortes (citrato) de alguma maneira interfere na formação do complexo, cuja fórmula seria $[(\text{FeHAsc})]^+$ /19/. Essa conclusão não leva em conta a provável perda de Fe^{2+} e de ácido ascórbico por oxidação durante o experimento, perda que seria somada à diminuição da absorbância devida à complexação, aumentando a inclinação das curvas.

Além do mais, como foi salientado no Capítulo III, a mistura de ambos os redutores deveria ser analisada num tampão tendo a concentração de citrato próxima daquela que haveria no

suco de laranja diluído, submetido aos estudos de estocagem. Portanto, a eventual formação do complexo $\text{Fe}(\text{HAsc})^+$ foi estudada no tampão misto contendo citrato, NaCl para maximização da cor e acetato, indispensável para regular o pH dos experimentos.

V.4.1. Estimativa de formação do complexo levando em conta as perdas dos componentes por oxidação

a) Em tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M

As Figuras 24, 25 e 26 apresentam a evolução da reação do Fe^{2+} e do H_2Asc em misturas equimolares, acompanhando simultaneamente a evolução do ácido ascórbico e do Fe^{2+} de forma isolada.

O fato mais marcante do experimento se refere à constatação de que a diminuição da absorvância da mistura não representa unicamente a formação do complexo, mas inclui perdas do ácido ascórbico por oxidação. Uma quantidade extremamente diluída do ácido ascórbico no tubo de reação ($= 22,0 \mu\text{g}$) torna-o facilmente oxidável no curso do experimento. A perda por oxidação em condições padronizadas de agitação e temperatura, constatou-se ser função do pH do tampão. Após 25 minutos tinham-se perdido 30,6% do ácido ascórbico em pH 2,65, 55,4% em pH 4,00 e 84,3% em pH 4,65. Os dados em pH 6,00 não são comentados pois foram muito elevados e ocorreram antes de 25 minutos. Pelo contrário, o Fe^{2+} no tampão acetato de pH 2,65 a 6,00 se manteve estável, não se registrando mudanças em 25 minutos.

De posse desses dados, a obtenção da porcentagem do complexo formado foi estimada da seguinte maneira: a absorvân-

cia da mistura de Fe^{2+} e H_2Asc num tempo qualquer representaria as frações molares destes compostos que não formaram complexo (frações molares idênticas, pois a relação de moles é de 1:1). Se não houvesse oxidação, a diferença entre a absorbância da mistura no tempo zero e no tempo considerado daria diretamente a quantidade de complexo. Porém, uma fração de H_2Asc foi oxidada, sendo registrada na diminuição da absorbância geral, de modo que para se obter a diminuição devida ao complexo, é necessário que seja deduzida dos cálculos finais (Tabela 17).

A soma das absorbâncias do H_2Asc e do Fe^{2+} livres (S) em um tempo qualquer representam a disponibilidade desses compostos para formar complexo. Se a mistura real (M) tiver uma absorbância menor que "S" será devida à formação de complexo. A Figura 27 apresenta esses resultados. Esta forma não é ideal para se encontrar a quantidade de complexo formado, porém, pela via química, há poucas opções para evitar a oxidação do ácido ascórbico. Não é possível adicionar outros redutores (SO_2 , H_2 , etc.), pois interferem na reação de redução do Cu^{2+} , inviabilizando o método analítico aqui proposto. O borbulhamento de N_2 poderia ser uma opção em ensaios futuros.

b) Em tampão misto (acetato ($2,5 \times 10^{-2}$ M) / citrato ($3,125 \times 10^{-3}$ M)/NaCl ($6,0 \times 10^{-2}$ M))

Nas Figuras 28, 29 e 30 apresentam-se as mudanças de absorbância da mistura de H_2Asc e Fe^{2+} , do H_2Asc e do Fe^{2+} isoladamente em função do tempo. A Figura 28 permite apreciar o efeito notável da inclusão de citrato na estabilização do H_2Asc

em pH 2,65. A curva da mistura de H_2Asc e Fe^{2+} praticamente repete a forma da curva do citrato puro (Figura 23) e considerando que a oxidação do H_2Asc neste pH é muito pequena, a diminuição da absorvância representa quase que totalmente as quantidades de Fe^{2+} e de H_2Asc , comprometidas no complexo. A Tabela 18 mostra que a porcentagem de complexo formado (calculado) ficou praticamente constante em 18,0%, valor atingido após 5 minutos aproximadamente.

Na Figura 29 observa-se que o efeito estabilizador do citrato em pH 4,00 no tampão misto não é tão marcante quanto em pH 2,65, particularmente o Fe^{2+} parece ser removido do sistema e não oxidado, a quelação do Fe^{2+} pelo citrato impede-o de reduzir o Cu^{2+} . Já a diminuição do H_2Asc parece ser mesmo devida à oxidação. Sua perda foi de 2,60% em 25 minutos, porcentagem bem menor que a perda no mesmo pH em tampão acetato (55,4%). Na Tabela 17 nota-se que a porcentagem de complexo formado em pH 4,00 é maior que em pH 2,65 também tendendo a um valor estável de 23,5% após 5 minutos.

Na Figura 30 observa-se que o efeito de ionização do citrato influi cada vez mais na quantidade de Fe^{2+} livre para redução do Cu^{2+} . O teor de Fe^{2+} em pH 4,65 diminuiu 31,8% em 25 minutos e certamente não se trata de oxidação, já que em acetato puro do mesmo pH, não há perda de Fe^{2+} . O ácido ascórbico diminuiu 11,5% em 25 minutos. É curioso como concentrações tão pequenas de citrato conseguem influir na disponibilidade do Fe^{2+} para reduzir o Cu^{2+} . A Tabela 18 mostra que a porcentagem de complexo continua aumentando em pH 4,65 e atinge valores maiores que em pH 2,65 e 4,00. Há um deslocamento do tempo para se atin

gir a porcentagem de formação máxima (31,3%) que ocorre aos 12 minutos. Após esse tempo, há um declínio provavelmente porque o complexo atinge o equilíbrio e parte do Fe^{2+} é seqüestrada pelo citrato. A Figura 31 mostra a formação do complexo em tampão misto.

V.5. Experimentos de Estocagem do Suco de Laranja Concentrado Adicionado de Fe^{2+}

Os experimentos para avaliar as mudanças no teor de Fe^{2+} e de vitamina C foram realizados com suco de laranja concentrado a 50% de sólidos totais, de procedência industrial fabricado recentemente.

Como foi detalhado no Capítulo III (Parte Experimental) o suco foi adicionado de sulfato ferroso heptahidratado em três níveis, de modo que o produto pudesse fornecer em um copo de 200 mL de suco diluído entre 3,6 e 18,0 mg de Fe^{2+} . Esses valores oferecem uma escolha razoável para o planejamento dos programas de fortificação nutricional. O suco com 18,0 mg de Fe^{2+} está acima do limite de 6,0 mg, valor estimado como máximo sem causar detecção sensorial pelos provadores /89/, mas que foi usado para pesquisar os efeitos de uma adição em excesso. Além das considerações nutricionais e sensoriais, a quantidade de Fe^{2+} foi definida de acordo com o teor de vitamina C existente no suco. Assim, foram experimentadas três relações molares

de Fe^{2+} : vitamina C que são: 1:1, 1:2 e 1:5.

Os efeitos da adição de Fe^{2+} foram testados em três condições que abrangem situações rotineiras da merenda escolar: estocagem à temperatura ambiente, sob refrigeração (+ 5,0°C) e sob congelação (- 18,0°C). O tempo foi fixado entre 49 e 55 dias, período suficiente para que o produto seja consumido pelas instituições, pois o produto não tem como alvo o consumidor do supermercado.

Foram feitos dois experimentos de estocagem com sucos diferentes. O primeiro (E_1) serviu para aprimorar detalhes e conhecer os fenômenos de uma maneira geral. O segundo experimento foi feito com mais detalhes e de uma maneira mais padronizada.

As Figuras 32, 33 e 34 mostram os resultados do Experimento 1. De um modo geral demonstrou-se que em temperatura ambiente (Figura 32) o decréscimo do teor de Fe^{2+} e de vitamina C foi acelerado, dando uma perda diária média de 0,71, 1,36, 1,39 e 1,77% para as amostras sem Fe^{2+} e com adição de Fe^{2+} na relação molar 1:5, 1:2 e 1:1, respectivamente. O experimento à temperatura ambiente foi interrompido aos 17 dias para a amostra sem Fe^{2+} e aos 25 dias para as amostras com Fe^{2+} por suspeita de contaminação fúngica.

Nas amostras estocadas sob refrigeração, os decréscimos da absorvância foram menores, registrando perdas diárias de vitamina C (amostra sem Fe^{2+}) e de vitamina C + Fe^{2+} (amostras 1:5, 1:2 e 1:1) da ordem de 0,53, 0,63, 0,73 e 0,88%, respectivamente. Nas amostras congeladas, a perda diária média continuou a diminuir, sendo de 0,33, 0,52, 0,52 e 0,63% para as amostras sem Fe^{2+} e com Fe^{2+} 1:5, 1:2 e 1:1, respectivamente.

Dos resultados acima, nota-se que a adição de Fe^{2+} ace lera a perda diária de Fe^{2+} + vitamina C e que essa perda é pra ticamente a mesma para amostras com pouco Fe^{2+} (1:5 e 1:2) e se torna maior na amostra com mais Fe^{2+} (1:1). Também fica claro que as amostras congeladas conservam melhor os teores iniciais de Fe^{2+} + vitamina C. Na amostra com Fe^{2+} 1:1, a seqüência da perda diária média segue a ordem temperatura ambiente, sob refrigeração e sob congelação, apresentando os valores 1,77, 0,88 e 0,63%, respectivamente. O ganho na preservação do Fe^{2+} e vita mina C nas amostras estocadas a + 5,0°C e - 18,0°C foi de 100 e 180% em relação à amostra mantida em temperatura ambiente.

O Experimento 2 (E_2) foi feito mais completo acompanhando a evolução dos pigmentos, do teor de Fe^{2+} e da vitamina C determinados isoladamente e da mistura de ambos os nutrientes. As Figuras 35, 36 e 37 registram as mudanças de absorbância para estocagem em temperatura ambiente (35), refrigerada (36) e congelada (37).

Na Figura 35 repete-se uma situação análoga à do Experimento 1 com a diferença que, desta vez, não houve proliferação fúngica evitada pela adição de um antifúngico (ácido sórbico 0,2%). Observa-se que houve uma diminuição quase linear até o 35º dia, dando valores de perda diária média de 0,71, 0,91, 0,94 e 0,97% para as amostras sem Fe^{2+} e com Fe^{2+} 1:5, 1:2 e 1:1, respectivamente. Após o 35º dia registrou-se uma que da abrupta, perdendo-se em apenas 7 dias tanto quanto se tinha perdido nos 35 dias anteriores.

Na Figura 36 (estocagem a + 5,0°C) há um melhoramento substancial da preservação da vitamina C e do Fe^{2+} . Nas pri-

meiras quatro semanas, as perdas foram pequenas. Até o 28º dia, nas amostras sem Fe^{2+} e com Fe^{2+} 1:5, 1:2 e 1:1 apresentaram perdas diárias médias de 0,11, 0,41, 0,38 e 0,34%, respectivamente. Isto indica que a perda de vitamina C foi acelerada pelo Fe^{2+} . Entretanto, a concentração do Fe^{2+} não foi tão crítica pois as perdas ficaram bastante próximas nas três amostras com Fe^{2+} .

Novamente, entre o 28º e o 35º dia registrou-se um acentuado decréscimo de absorvância, um fenômeno já observado nas amostras à temperatura ambiente. Nas amostras refrigeradas, a queda foi mais marcante, passando, na amostra sem Fe^{2+} , de uma perda de 3,1% para 28,1% em apenas 7 dias. Nas amostras com Fe^{2+} também houve uma aceleração das perdas passando em apenas 7 dias de 11,5 para 38,5% na amostra com Fe^{2+} 1:5, de 10,7 para 40,2% na amostra com Fe^{2+} 1:2 e de 9,7 para 37,1% na amostra com Fe^{2+} 1:1. As perdas continuaram após o 35º dia, porém, com velocidade menor. Não se encontram na literatura referências sobre esse fenômeno, mesmo porque a adição de ferro ao suco de laranja é uma proposta que não havia sido abordada anteriormente. De qualquer modo, é importante saber que o suco de laranja concentrado e adicionado de Fe^{2+} poderá ser mantido com perdas mínimas de Fe^{2+} e de vitamina C por até quatro semanas sob refrigeração.

Na Figura 37 (estocagem a $-18,0^\circ\text{C}$) fica confirmado o esquema geral de evolução da absorvância. As absorvâncias diminuem lentamente até o 28º dia com perdas totais no período entre zero e 0,16%. Mais uma vez, a queda acentuada ocorre após a 4ª semana de estocagem, porém, não chega a comprometer o fornecimento de Fe^{2+} e vitamina C. Na estocagem refrigerada e con

gelada registra-se que a adição de Fe^{2+} causa um aumento das perdas de absorvância, porém a perda não parece estar relacionada com a quantidade de Fe^{2+} , mas apenas com a sua presença.

Nas Tabelas 22, 23 e 24 apresentam-se os resultados da absorvância perdida (inicial - final) para cada semana de estocagem. Os quadros mostram simultaneamente a absorvância da mistura de Fe^{2+} + vitamina C (a), de vitamina c (b), do Fe^{2+} (c) e da soma (b + c). Na Tabela 22A verifica-se que a perda de absorvância da mistura de Fe^{2+} + vitamina C em 49 dias atingiu 59,6%, isto é, mais da metade da vitamina C do suco e do Fe^{2+} foram oxidados ou degradados por outros mecanismos. Certamente, esse resultado desaconselha armazenar o suco de laranja concentrado, com ou sem Fe^{2+} , à temperatura ambiente. As Tabelas 22B e 22C mostram que os teores de Fe^{2+} , em qualquer uma das concentrações testadas, causa decréscimos muito próximos, em torno de 60,0%. Um valor ligeiramente menor (56,0%) foi registrado na amostra sem Fe^{2+} (somente vitamina C). Isso indica que, em temperatura ambiente, o prejuízo é tão grande que se torna inespecífico. Por outro lado, verifica-se que a vitamina C é a maior responsável pelas perdas na mistura. O fato é comprovado através da evolução das perdas de Fe^{2+} isoladamente que são inferiores ao patamar de 56,0%, ficando em 17,0, 37,1 e 39,4% nas relações molares de Fe^{2+} : vitamina C de 1:5, 1:2 e 1:1, respectivamente.

É interessante comparar as perdas de absorvância determinada de maneira direta nos sucos com Fe^{2+} pela 2,2-biquinolina e as perdas obtidas pela soma das absorvâncias da vitamina

C e do Fe^{2+} medidas separadamente, isto é, um cálculo indireto. Percebe-se que o cálculo indireto dá valores inferiores ao direto. Levando-se em conta que o sistema alimentar é complexo e os seus componentes estão sujeitos a interações, a disparidade nas perdas não é exagerada. Deve ser lembrado que a determinação de Fe^{2+} com o-fenantrolina desfez complexos ferrosos, registrando o Fe^{2+} total. Já a determinação com 2,2'-biquinolina só determina o Fe^{2+} não complexado, descartando-se o Fe^{2+} ligado à vitamina C e, possivelmente, a pectatos, flavonóides e outros compostos existentes no suco. Por esse motivo, a perda por esse método será maior.

As Tabelas 23 e 24 atestam que a estocagem a temperaturas baixas reduz mais intensamente a perda do Fe^{2+} do que a perda de vitamina C, também pode-se notar que a perda do ferro é influenciada pela sua concentração. No suco com a relação de Fe^{2+} : vitamina C de 1:5 a perda no sistema a + 5,0°C foi de 17,0% em 49 dias e, na mesma amostra congelada, também foi de 17,0%.

Nas amostras com teores maiores de Fe^{2+} (1:2 e 1:1) as perdas ficaram entre 24,2 e 33,9%. Porém, houve uma notável exceção na amostra 1:1 congelada, na qual a perda em 49 dias foi de apenas 14,1%. Essas observações ficam mais claras na Figura 38. Nela foram graficadas as perdas de Fe^{2+} nas diferentes condições de estocagem, com dados extraídos das Tabelas 22, 23 e 24.

Das mesmas tabelas foram extraídos dados para representar a variação da vitamina C da Figura 39. A figura indica que à temperatura ambiente, as perdas de vitamina C ocorrem desde a primeira semana, enquanto que nos sistemas resfriados há um

retardamento, uma espécie de resistência intrínseca à oxidação que dura em torno de 4 semanas e, quando esgotada, registra-se uma súbita aceleração das perdas. É importante salientar que o comportamento a + 5,0°C e a - 18,0°C é relativamente semelhante.

Para converter as absorbâncias do complexo $[\text{Fe}(\text{o-fen})_3]^{2+}$ em valores de absorbância referentes à determinação do Fe^{2+} por 2,2'-biquinolina e permitir a soma b+c, foram usadas a relação entre os valores de ϵ de cada reação, além de um fator de volume, como é mostrado na Tabela 25.

V.6. Evolução dos Pigmentos no Suco Estocado com e sem Adição de Fe^{2+}

A avaliação dos efeitos da estocagem na intensidade da cor amarela do suco de laranja torna-se importante no grau de aceitação do produto e não em termos do valor nutricional.

Por tratar-se de uma proposta nova, a literatura não registra informações sobre o efeito do Fe^{2+} na estabilidade da cor do suco de laranja. Os resultados aqui apresentados se referem às mudanças gerais da cor e não pretende esclarecer que pigmentos individuais estariam sendo afetados. Por isso, apenas é avaliada a absorbância de um extrato de carotenóides em clorofórmio e a absorbância da fração aquosa. Ambos os valores dão uma medida da degradação geral da cor, tal como seria percebido

pelo consumidor.

Por tratar-se de uma mistura de carotenóides, não é conveniente expressar a absorbância em termos de mg, mesmo que isto seja possível empregando algum carotenóide típico como padrão /87/. Preferiu-se usar a expressão da absorbância a 450 nm por grama de suco concentrado (suco original) que serve satisfatoriamente para comparações relativas.

A Figura 40 mostra os espectros de absorção dos carotenóides do suco estocado sob congelação, de 400 a 500 nm. Basicamente existem 2 máximos: um a 430 nm e outro a 450 nm. Após a estocagem congelada (- 18,0°C) por 49 dias, o espectro manteve suas características originais. As perdas de absorbância aparecem registradas na Tabela 26. Trata-se de perdas pequenas, que não comprometem a qualidade visual do suco.

A Figura 41 mostra os espectros de absorção das amostras armazenadas à temperatura ambiente por 49 dias. Os espectros mostram mudanças importantes, mesmo para a amostra sem ferro. De um modo geral, o Fe^{2+} acelerou a oxidação dos carotenóides, efeito relacionado com o teor de Fe^{2+} , porém não diretamente proporcional. As amostras iniciais (em linha tracejada) apresentaram espectros coincidentes independente da adição de Fe^{2+} . Após algumas semanas, a presença do Fe^{2+} começou a influir na degradação dos carotenóides. As mudanças se caracterizam por uma diminuição do máximo a 450 nm e por um deslocamento da absorbância para próximo de 400 nm prevalecendo o máximo a 430 nm, como a característica mais relevante. O fato de ter registrado degradação dos carotenóides também nas amostras sem ferro, sugere que o oxigênio introduzido na massa do suco durante a homogeneiza-

ção preparatória para estocagem, contribui com uma parcela de degradação. O Fe^{2+} provavelmente catalisa as reações, auxiliado pela grande dispersão dos carotenóides no meio aquoso. Os carotenóides podem ser considerados lipídeos insolúveis em água. A estrutura com duplas ligações conjugadas dos carotenóides é um excelente substrato para reações de oxidação.

As Tabelas 26 e 27 mostram as perdas de absorbância no sistema estocado sob congelação e à temperatura ambiente. As amostras congeladas mostram perdas muito pequenas da cor amarela brilhante típica. A adição de Fe^{2+} só comprometerá a aparência do suco se adicionado na relação molar 1:1 ($\text{Fe}^{2+} : \text{H}_2\text{Asc}$), que, no caso significam 279 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para cada 100,0 g de suco concentrado, uma dose de Fe^{2+} que excede o mínimo detectável sensorialmente no suco já diluído para beber (1 x 7) e portanto, não pode ser usada. Um valor de 139,5 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ adicionado em 100,0 g de suco (relação molar 1:2) parece mais conveniente em termos sensoriais. Essa quantidade adicionada praticamente não alterou o espectro dos pigmentos em 49 dias de estocagem congelada, ficando próximo do espectro da amostra sem ferro.

Na Tabela 27 fica evidente o efeito indesejável da temperatura ambiente na vida útil dos produtos. Praticamente todas as amostras com Fe^{2+} diminuíram a cor amarela em mais de 20% contra 9,2% do controle sem Fe^{2+} . As perdas ocorrem lentamente nos primeiros 30 dias. Apenas 1/4 da perda total ocorreu no primeiro mês contra 3/4 no mês seguinte. Possivelmente, a reação se processa por mecanismos de radicais livres, muito comum em lipídeos polinsaturados /14/.

No suco mantido à temperatura ambiente, a adição de ferro aumenta a pigmentação da fase aquosa, como pode ser observado na Figura 42. Esta fração (metanol/água) coleta os produtos de reação de Maillard, que ocorrem amplamente entre compostos com grupos amino e açúcares redutores, aldeídos e carbonilos em geral e cuja formação tem sido relatada na literatura como sendo catalisada pela vitamina C. Kennedy et alii /90/ relatam que ácido ascórbico parece ser o precursor do escurecimento não-enzimático observado nesse tipo de alimentos devido à formação de compostos carbonílicos reativos produzidos a partir de sua degradação, que tendem a se polimerizar, ou reagir com compostos nitrogenados para dar pigmentos de cor marrom. Essa reação poderia explicar a pigmentação razoavelmente importante ocorrida na amostra sem Fe^{2+} . Já a presença de Fe^{2+} poderia catalisar outras reações ou mesmo contribuir com sua própria pigmentação (como Fe^{3+}).

É importante salientar que a adição de Fe^{2+} produz um aumento dos pigmentos aquo-solúveis do suco, muito embora esses valores sejam pequenos quando comparados com os registrados após 60 dias em temperatura ambiente. Os espectros não apresentam máximos característicos entre 540 e 400 nm e foi escolhido 450 nm apenas para comparar com os valores dos carotenóides.

Na Tabela 28 aparecem registradas as mudanças da pigmentação da fase aquosa através da armazenagem em temperatura ambiente. É possível deduzir que o ferro está relacionado com a formação da cor amarronzada da fase aquosa do suco. Não foi possível, entretanto, observar alguma proporcionalidade entre a intensidade da cor e o teor de Fe^{2+} adicionado. Considerando que

a cor amarela dos carotenóides diminui e a cor amarronzada aumenta, o resultado da estocagem à temperatura ambiente é uma mudança da tonalidade da cor do suco e não apenas de intensidade.

As amostras armazenadas sob congelação durante 49 dias praticamente não mudaram os valores iniciais do teor de pigmentos da fase aquosa, de modo que os dados foram omitidos.

V.7. Ensaio Biológico

Pelos resultados obtidos de % de Retenção ou Biodisponibilidade Absoluta, vimos que a retenção do ferro é muito maior na presença de ácido ascórbico ou de vitamina C (dietas com suco de laranja liofilizado) do que na ausência desse micronutriente. Observamos que houve um aumento de quase 30% na retenção do ferro da dieta C (contendo sulfato ferroso e ácido ascórbico) em relação à dieta B (contendo apenas sulfato ferroso). As duas dietas continham o mesmo nível de ferro: 28 mg Fe^{2+} por Kg de dieta. Apesar de os ratos não necessitarem de vitamina C na dieta por terem capacidade de sintetizá-la /91/, ainda assim, esse dado mostra o efeito do ácido ascórbico ou da vitamina C na absorção do ferro, o que se evidencia pela rapidez com que o rato se recupera da anemia, alcançando a taxa máxima de hemoglobina no sangue, como se pode ver pela Figura 44. No presente trabalho, consideramos que os ratos atingiram a taxa máxima de hemoglobina no 12º dia (pico da absorção). Do 12º ao 14º dia ob

servou-se uma pequena queda no nível de hemoglobina e isso pode ser explicado pois quando o sangue do rato atingiu a taxa máxima de hemoglobina observada, todos os sistemas de estocagem de ferro estavam saturados e, a partir daí, a absorção passa a ser menor e mais lenta, tendendo a estabilizar-se num nível um pouco abaixo dessa taxa /91/.

É oportuno esclarecer que usamos a denominação vitamina C quando nos referimos ao composto natural encontrado nos alimentos e ácido ascórbico quando nos referimos ao composto sintético fabricado em laboratório, embora tenham a mesma estrutura e função.

Comparando-se os resultados da % de Retenção do ferro das dietas D, E e F que continham suco de laranja liofilizado (fonte natural de vitamina C) com as dietas C e B, vemos que a vitamina C mostra o mesmo efeito benéfico do ácido ascórbico no sentido de aumentar a absorção do ferro e, se levarmos em conta que a Dieta D possuía um nível de vitamina C cinco vezes menor que o nível de ácido ascórbico da Dieta C (as duas dietas tinham o mesmo nível de ferro) podemos observar que a vitamina C fornecida por uma fonte natural parece ser um pouco melhor em aumentar a absorção do ferro da dieta do que o ácido ascórbico puro.

Comparando-se os dados de % de Retenção das dietas D, E e F entre si (possuíam diferentes relações molares de Fe^{2+} : vitamina C) vemos que um excesso de vitamina C ou de ácido ascórbico na dieta é desnecessário uma vez que os resultados pouco diferiram, sendo inclusive, 1,4% maior a % de Retenção do ferro da dieta D, indicando que a relação molar de 1:2 de Fe^{2+} :

vitamina C seria a mais próxima do ideal.

Pelos valores de Biodisponibilidade Relativa, calculados a partir das curvas da Figura 43, vemos também que a biodisponibilidade do ferro de dietas contendo vitamina C é maior de que de dietas sem vitamina C mas esses valores praticamente não diferem na presença de excesso de vitamina C.

V.8. Escolha do Melhor Procedimento Experimental

Levando em conta os resultados obtidos, pode-se sugerir que o sistema de uma fase pode ser preferido em relação ao sistema de duas fases para as análises do suco de laranja pois não apresentou problemas de interferência, tendo, inclusive, mostrado vantagens em rapidez e sensibilidade.

Os sistemas de tampão que apresentaram os melhores resultados nas determinações de ácido ascórbico e de Fe^{2+} foram o tampão acetato $2,50 \times 10^{-2}$ M e o tampão misto acetato $2,50 \times 10^{-2}$ M/citrato $1,13 \times 10^{-3}$ M/NaCl $6,00 \times 10^{-2}$ M.

Para o estudo de formação de complexo entre ácido ascórbico e Fe^{2+} o melhor meio foi o tampão misto de pH 4,65.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

1. A determinação quantitativa de ácido ascórbico pelo método de redução de Cu^{2+} para Cu^+ e complexação com 2,2'-biquinolina foi adaptado para operar em sistema de uma fase, com etanol 72,5%, não tendo apresentado problemas de interferência na reação no sistema estudado: suco de laranja. Pelo contrário, houve alguma melhora na sensibilidade da determinação. Um mol de ácido ascórbico reduz dois moles de Cu^{2+} .

2. Verifica-se que é possível determinar Fe^{2+} via redução de Cu^{2+} e complexação com 2,2'-biquinolina no mesmo meio etanólico usado para determinar ácido ascórbico. Um mol de Fe^{2+} reduz um mol de Cu^{2+} .

3. É possível determinar simultaneamente numa solução a soma de Fe^{2+} e ácido ascórbico via redução de Cu^{2+} , sendo que a absorbância total é composta por 2/3 da concentração molar do ascorbato e 1/3 da concentração de Fe^{2+} em soluções equimolares. A formação de complexos entre estes compostos inibe a sua capacidade redutora de modo que a diminuição da absorbância, descontadas as perdas por oxidação, é uma medida do comprometimento entre Fe^{2+} e ácido ascórbico.

4. As reações de Fe^{2+} e de ácido ascórbico com Cu^{2+} em tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M não foram afetadas pelo pH na faixa testada (2,65 a 6,00). Em tampão citrato $3,125 \times 10^{-3}$ M, na mesma faixa de pH, as reações ocorrem sem alteração, porém, a absorvividade molar diminui em pH alto, particularmente em pH 6,00. O efeito inibidor do citrato foi diminuído pela inclu-

são de NaCl $6,0 \times 10^{-2}$ M no tampão, porém não completamente em pH 6,00.

5. Verificou-se que a complexação de Fe^{2+} com ácido ascórbico é pequena em pH 2,65 aumentando gradualmente em pH 4,00 e 4,65. Em pH 6,00 não foi possível determinar o teor de complexo.

6. Os estudos com suco de laranja concentrado adicionado de Fe^{2+} mantendo relações de vitamina C: Fe^{2+} de 1:1, 2:1 e 5:1 mostraram que se o suco é mantido congelado, as concentrações de vitamina C e Fe^{2+} permanecem quase inalteradas até duas semanas. A estocagem a $+5,0^{\circ}C$ produz perdas de ~33% de vitamina C e ~17% de Fe^{2+} no mesmo período e nas amostras estocadas à temperatura ambiente as perdas foram de 56% para vitamina C e 17% para Fe^{2+} (amostras 5:1).

7. Nas amostras de suco estocado à temperatura ambiente, a presença de Fe^{2+} causou mudanças de cor que se manifesta pelo escurecimento da cor amarela típica. Foi registrada uma perda da absorbância dos pigmentos carotenóides e um aumento da absorbância dos pigmentos solúveis em água.

8. Os resultados do ensaio biológico mostraram que a absorção do ferro da dieta é maior em presença de vitamina C ou de ácido ascórbico.

9. Destes resultados pode-se inferir que tecnologicamente não há impedimentos para o preparo do suco de laranja fortificado com Fe^{2+} nos níveis de 3,6 a 18,0 mg Fe^{2+} /200 mL de suco diluído, desde que o produto seja conservado e mantido para o consumo em freezer a $-18,0^{\circ}\text{C}$.

10. A pesquisa apresenta a vantagem de utilizar métodos simples, rápidos e de alta sensibilidade, que podem ser utilizados por analistas em laboratórios de controle de qualidade /92/.

APENDICE

Tabela A.01 - Estudo do efeito do pH na determinação de ácido ascórbico pela redução de íons cúpricos (sistema bi-fásico) em tampão acetato 0,50 M.

[H ₂ Asc] x 10 ⁵	Valores de absorvância (545 nm)			
	pH 2,65	pH 4,00	pH 4,65	pH 6,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,14	0,12	0,12	0,12	0,11
	0,11	0,10	0,12	0,12
2,27	0,22	0,27	0,24	0,23
	0,23	0,24	0,24	0,20
3,41	0,34	0,35	0,34	0,36
	0,35	0,37	0,37	0,37
4,54	0,43	0,51	0,48	0,44
	0,46	0,50	0,50	0,48

Tabela A.02 - Estudo do efeito do pH na determinação de ácido ascórbico pela redução de íons cúpricos (sistema bi-fásico) em tampão citrato 0,50 M.

[H ₂ Asc] x 10 ⁵	Valores de absorvância (545 nm)			
	pH 2,65	pH 4,00	pH 4,65	pH 6,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,14	0,19	0,09	0,09	0,06
	0,20	0,10	0,08	0,07
2,27	0,29	0,20	0,18	0,13
	0,28	0,22	0,16	0,14
3,41	0,38	0,26	0,24	0,21
	0,40	0,28	0,23	0,22
4,54	0,56	0,40	0,36	0,28
	0,58	0,44	0,37	0,30

Tabela A.03 - Estudo do efeito do pH na determinação de ácido ascórbico pela redução de íons cúpricos (sistema bifásico) em tampão metafosfato 0,50 M.

[H ₂ Asc] x 10 ⁵	Valores de absorvância (545 nm)			
	pH 2,65	pH 4,00	pH 4,65	pH 6,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,14	0,16	0,13	0,10	0,09
	0,15	0,12	0,11	0,10
2,27	0,32	0,26	0,18	0,16
	0,33	0,25	0,19	0,17
3,41	0,40	0,38	0,31	0,27
	0,44	0,37	0,33	0,29
4,54	0,58	0,52	0,39	0,33
	0,60	0,54	0,38	0,32

Tabela A.04 - Estudo do efeito do pH na determinação de Fe²⁺ pela redução de íons cúpricos (sistema bifásico) em tampão acetato 0,50 M.

[Fe ²⁺] x 10 ⁵	Valores de absorvância (545 nm)			
	pH 2,65	pH 4,00	pH 4,65	pH 6,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,89	0,06	0,07	0,08	0,09
	0,08	0,08	0,07	0,04
1,79	0,13	0,13	0,14	0,09
	0,10	0,14	0,16	0,08
3,58	0,17	0,26	0,31	0,24
	0,19	0,26	0,33	0,28
7,16	0,49	0,55	0,61	0,53
	0,55	0,56	0,62	0,55

Tabela A.05 - Estudo do efeito do pH na determinação de Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema bifásico) em tampão citrato 0,50 M.

$[\text{Fe}^{2+}] \times 10^5$	Valores de absorvância (545 nm)			
	pH 2,65	pH 4,00	pH 4,65	pH 6,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,89	0,06	0,05	0,04	0,04
	0,06	0,04	0,03	0,05
1,79	0,10	0,05	0,06	0,05
	0,12	0,05	0,06	0,04
3,58	0,21	0,06	0,09	0,04
	0,23	0,10	0,08	0,06
7,16	0,39	0,11	0,09	0,13
	0,42	0,12	0,09	0,08

Tabela A.06 - Estudo do efeito do pH na determinação de Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema bifásico) em tampão metafosfato 0,50 M.

$[\text{Fe}^{2+}] \times 10^5$	Valores de absorvância (545 nm)			
	pH 2,65	pH 4,00	pH 4,65	pH 6,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,89	0,07	0,08	0,05	0,01
	0,07	0,09	0,03	0,01
1,79	0,14	0,14	0,10	0,02
	0,15	0,13	0,08	0,04
3,58	0,29	0,26	0,17	0,04
	0,28	0,25	0,18	0,05
7,16	0,57	0,46	0,43	0,12
	0,58	0,49	0,45	0,07

Tabela A.07 - Estudo do efeito do pH na determinação de ácido as córico pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão acetato 0,50 M.

[H ₂ Asc] x 10 ⁵	Valores de absorvância (545 nm)			
	pH 2,65	pH 4,00	pH 4,65	pH 6,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,14	0,18	0,18	0,17	0,17
	0,18	0,19	0,17	0,18
2,27	0,38	0,35	0,35	0,35
	0,36	0,37	0,36	0,35
3,41	0,56	0,55	0,53	0,54
	0,57	0,55	0,53	0,53
4,54	0,76	0,73	0,70	0,69
	0,75	0,73	0,71	0,71

Tabela A.08 - Estudo do efeito do pH na determinação de ácido as córico pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão citrato 0,50 M.

[H ₂ Asc] x 10 ⁵	Valores de absorvância (545 nm)			
	pH 2,65	pH 4,00	pH 4,65	pH 6,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,14	0,20	0,14	0,12	0,09
	0,18	0,15	0,12	0,08
2,27	0,36	0,26	0,24	0,18
	0,35	0,27	0,25	0,16
3,41	0,53	0,41	0,35	0,29
	0,54	0,39	0,37	0,26
4,54	0,76	0,54	0,47	0,36
	0,76	0,56	0,46	0,35

Tabela A.09 - Estudo do efeito do pH na determinação de ácido as córico pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M.

[H ₂ Asc] x 10 ⁵	Valores de absorvância (545 nm)			
	pH 2,65	pH 4,00	pH 4,65	pH 6,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,14	0,18	0,20	0,18	0,17
	0,19	0,20	0,19	0,18
2,27	0,37	0,37	0,36	0,36
	0,37	0,39	0,36	0,36
3,41	0,53	0,58	0,57	0,56
	0,56	0,56	0,56	0,56
4,54	0,75	0,77	0,74	0,74
	0,73	0,75	0,76	0,74

Tabela A.10 - Estudo do efeito do pH na determinação de ácido as córico pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão citrato $2,5 \times 10^{-2}$ M.

[H ₂ Asc] x 10 ⁵	Valores de absorvância (545 nm)			
	pH 2,65	pH 4,00	pH 4,65	pH 6,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,14	0,20	0,18	0,16	0,17
	0,18	0,17	0,16	0,16
2,27	0,38	0,36	0,33	0,32
	0,37	0,37	0,34	0,33
3,41	0,58	0,54	0,50	0,48
	0,56	0,53	0,52	0,47
4,54	0,75	0,73	0,66	0,63
	0,76	0,73	0,67	0,64

Tabela A.11 - Estudo do efeito do pH na determinação de ácido ascórbico pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão metafosfato $2,5 \times 10^{-2}$ M.

[H ₂ Asc] x 10 ⁵	Valores de absorvância (545 nm)			
	pH 2,65	pH 4,00	pH 4,65	pH 6,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,14	0,14	0,09	0,12	0,01
	0,15	0,08	0,10	0,02
2,27	0,30	0,16	0,22	0,02
	0,29	0,15	0,20	0,02
3,41	0,46	0,26	0,30	0,04
	0,47	0,27	0,33	0,04
4,54	0,58	0,33	0,42	0,06
	0,58	0,34	0,42	0,05

Tabela A.12 - Estudo do efeito do pH na determinação de Fe²⁺ pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão acetato 0,50 M.

[Fe ²⁺] x 10 ⁵	Valores de absorvância (545 nm)		
	pH 2,65	pH 4,65	pH 6,00
0,00	0,00	0,00	0,00
1,14	0,09	0,09	0,10
	0,09	0,09	0,10
2,27	0,18	0,19	0,20
	0,18	0,20	0,20
3,41	0,27	0,28	0,30
	0,27	0,30	0,30
4,54	0,35	0,40	0,38
	0,36	0,40	0,39

Tabela A.13 - Estudo do efeito do pH na determinação de Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M.

$[\text{Fe}^{2+}] \times 10^5$	Valores de absorvância (545 nm)		
	pH 2,65	pH 4,65	pH 6,00
0,00	0,00	0,00	0,00
1,14	0,08	0,10	0,08
	0,08	0,09	0,08
2,27	0,18	0,18	0,17
	0,17	0,17	0,17
3,41	0,27	0,26	0,26
	0,28	0,26	0,26
4,54	0,36	0,36	0,35
	0,38	0,36	0,35

Tabela A.14 - Estudo do efeito do pH na determinação de Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão citrato $2,5 \times 10^{-2}$ M.

$[\text{Fe}^{2+}] \times 10^5$	Valores de absorvância (545 nm)		
	pH 2,65	pH 4,65	pH 6,00
0,00	0,00	0,00	0,00
1,14	0,10	0,05	0,02
	0,10	0,06	0,02
2,27	0,19	0,08	0,04
	0,20	0,09	0,04
3,41	0,30	0,13	0,08
	0,30	0,12	0,06
4,54	0,41	0,18	0,10
	0,41	0,18	0,09

Tabela A.15 - Estudo do efeito do pH na determinação de Fe^{2+} pela redução de íons cúpricos (sistema de uma fase) em tampão metafosfato $2,5 \times 10^{-2}$ M.

$[\text{Fe}^{2+}] \times 10^5$	Valores de absorvância (545 nm)			
	pH 2,65	pH 4,00	pH 4,65	pH 6,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,14	0,08	0,07	0,07	0,08
	0,08	0,07	0,08	0,08
2,27	0,16	0,15	0,16	0,16
	0,16	0,15	0,16	0,16
3,41	0,25	0,23	0,24	0,25
	0,25	0,23	0,24	0,24
4,54	0,33	0,30	0,32	0,33
	0,32	0,30	0,32	0,33

Tabela A.16 - Determinação de Cu^{2+} por redução com hidroxilamina e complexação com cuproína em meio de tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M.

$[\text{Cu}^{2+}] \times 10^5$	Valores de absorvância (545 nm)			
	pH 2,65	pH 4,00	pH 4,65	pH 6,00
1,0	0,08	0,09	0,08	0,09
	0,08	0,08	0,08	0,08
2,0	0,16	0,17	0,17	0,17
	0,16	0,17	0,17	0,17
4,0	0,32	0,31	0,32	0,32
	0,32	0,32	0,32	0,32
8,0	0,66	0,65	0,66	0,66
	0,65	0,66	0,68	0,66

Tabela A.17 - Determinação de Cu^{2+} por redução com hidroxilamina e complexação com cuproína em meio de tampão citrato $2,5 \times 10^{-2}$ M.

$[\text{Cu}^{2+}] \times 10^5$	Valores de absorvância (545 nm)			
	pH 2,65	pH 4,00	pH 4,65	pH 6,00
1,0	0,08	0,09	0,09	0,08
	0,08	0,08	0,08	0,08
2,0	0,16	0,17	0,16	0,16
	0,16	0,17	0,16	0,16
4,0	0,32	0,32	0,32	0,32
	0,32	0,33	0,32	0,31
8,0	0,64	0,65	0,64	0,64
	0,64	0,65	0,65	0,64

Tabela A.18 - Curva padrão da determinação de Fe^{2+} com o-fenantrolina (sem utilizar hidroxilamina) em tampão acetato 0,50 M. Valores de absorvância a 510 nm.

$[\text{Fe}^{2+}] \times 10^5$	pH 2,65	pH 4,65
1,14	0,16	0,16
	0,15	0,15
2,27	0,29	0,30
	0,29	0,29
3,41	0,44	0,44
	0,44	0,45
4,54	0,59	0,59
	0,58	0,59
5,67	0,75	0,74
	0,75	0,75

Tabela A.19 - Curva padrão da determinação de Fe^{2+} com o-fenantrolina (sem hidroxilamina) em tampão citrato 0,50 M. Valores de absorvância a 510 nm.

$[\text{Fe}^{2+}] \times 10^5$	pH 4,65
1,14	0,15
	0,13
2,27	0,28
	0,28
3,41	0,43
	0,44
4,54	0,59
	0,58
5,67	0,75
	0,74

Tabela A.20 - Curva padrão da determinação de Fe^{2+} com o-fenantrolina (usando hidroxilamina como redutor) em tampão acetato e em tampão citrato 0,50 M. Valores de absorvância a 510 nm.

$[\text{Fe}^{2+}] \times 10^5$	acetato pH 4,65	citrato pH 4,65
1,14	0,14	0,15
	0,13	0,13
2,27	0,29	0,28
	0,28	0,28
3,41	0,42	0,43
	0,43	0,44
4,54	0,58	0,58
	0,59	0,58
5,67	0,75	0,75
	0,75	0,74

Tabela A.21 - Curva padrão da determinação de Fe^{2+} com o-fenantrolina (com hidroxilamina) em meio de HCl 2,0%. Valores de absorbância a 510 nm.

$[\text{Fe}^{2+}] \times 10^5$	A
1,14	0,14
	0,14
2,27	0,28
	0,29
3,41	0,42
	0,43
4,54	0,56
	0,57
5,67	0,72
	0,72

Tabela A.22 - Curva padrão da determinação de Fe^{2+} com o-fenantrolina (com hidroxilamina) em meio de H_2SO_4 0,10M. Valores de absorbância a 510 nm.

$[\text{Fe}^{2+}] \times 10^5$	A
1,14	0,16
	0,16
2,27	0,31
	0,31
3,41	0,46
	0,47
4,54	0,62
	0,63

Tabela A.23 - Evolução da absorvância (relativa ao complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ em função do tempo de reação de uma mistura equimolar de ácido ascórbico e Fe^{2+} ($2,27 \times 10^{-4}$ M) em tampão acetato $2,5 \times 10^{-2}$ M.

Tempo (min)	Valores de absorvância (545 nm)		
	pH 2,65	pH 4,65	pH 6,00
0,0	0,57	0,60	0,62
0,5	0,56	0,59	0,57
01	0,54	0,54	0,50
02	0,52	0,49	0,45
03	0,51	0,45	0,41
04	0,51	0,43	0,39
05	0,50	0,38	0,38
10	0,46	0,33	0,32
15	0,44	0,27	0,29
20	0,38	0,26	0,28
25	0,36	0,25	0,28
30	0,35	0,24	0,27
45	0,30	0,23	0,26
60	0,27	0,22	0,21
90	0,24	0,22	0,20
120	0,23	0,22	0,18

Tabela A.24 - Evolução da absorbância (relativa ao complexo $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ em função do tempo de reação de uma mistura equimolar de ácido ascórbico e Fe^{2+} ($2,27 \times 10^{-4}$ M) em tampão citrato $2,5 \times 10^{-2}$ M.

Tempo (min)	Valores de absorbância (545 nm)		
	pH 2,65	pH 4,65	pH 6,00
0,0	0,48	0,49	0,35
0,5	0,47	0,43	0,33
01	0,46	0,42	0,31
02	0,45	0,41	0,30
03	0,44	0,39	0,28
04	0,43	0,36	0,27
05	0,42	0,35	0,26
10	0,41	0,32	0,24
15	0,41	0,29	0,22
20	0,40	0,27	0,19
25	0,40	0,26	0,17
30	0,40	0,24	0,15
45	0,40	0,20	0,12
60	0,40	0,18	0,08
90	0,40	0,14	0,07
120	0,39	0,11	0,04

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- /1/ Hughes, D.E.; Anal. Chem. 57, 555-8 (1985).
- /2/ Kutsky, J.R.; "Handbook of Vitamins and Hormones", Van Norstrand Co., New York, 1973.
- /3/ Stolyarov, K.P. e Amantova, I.A.; Talanta 14, 1237-44 (1967).
- /4/ Hay, G.W.; Lewis, B.A. e Smith, F.; "Ascorbic Acid, Chemistry" em "The Vitamins", vol. I, ed. por W. H. Sebrell, e R. Harris, 2ª ed., Academic Press, New York, London, 307-32 (1967).
- /5/ Bauernfeind, J.C. e Pinkert, D.M.; Adv. Food Res. 18, 219 (1970).
- /6/ Lesser, Michael; "Nutrition and Vitamin Therapy", Grove Press, Inc., New York, 1ª ed., 1980.
- /7/ Counsell, J.N. e Hornig, D.H.; "Vitamin C (Ascorbic Acid)"; Appl. Sci. Publ. Ltd., London, 1981.
- /8/ Conrad, M.E. e Schade, S.G.; Gastroenterology 55(1), 35-45 (1968).

- /9/ Cook, J.D. e Monsen, E.R.; Amer. J. Clin. Nutr. 30, 235-241 (1977).
- /10/ Committee on Dietary Allowances, Food and Nutrition Board, "Recommended Dietary Allowances", National Academy of Sciences, 9^a ed., Washington, 1980.
- /11/ Baker, E.M.; Hodges, R.E.; Hood, J.; Sauberlich, H. E.; March, S.C. e Canham, J.E.; Am. J. Clin. Nutr. 24, 444-54 (1971).
- /12/ Kallner, A.; Hartman, D. e Hornig, D.; Int. J. Vit. Nutr. Res. 47, 383-88 (1977).
- /13/ Cameron, E. e Pauling, L.; Proceedings National Academy of Science 73(10), 3685-89 (1976).
- /14/ Liao, M.L. e Seib, P.A.; Food Chem. 30, 289-312 (1988).
- /15/ Liu, Y.C.; Liu, Z.L. e Han, Z.X.; Rev. Chem. Intermed. 10, 269-89 (1988).
- /16/ Lohmann, W.; Hillenkamp, F.; Rosmarinowsky, J.; Bachmann, D. e Karas, M.; Fresenius Z. Anal. Chem. 317, 129 (1984).
- /17/ Liao, M.L. e Seib, P.A.; Food Technol. 41(11), 104-7, 111 (1987).

- /18/ Martell, A.E.; "Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism and Uses", ed. P.A. Seib e B.M. Tolbert; Adv. Chem. Ser., nº 200, American Chemical Society, Washington, 153-78 (1982).
- /19/ Khan, T.M.M. e Martell, A.E.; J. Am. Chem. Soc. 89(16), 4176-85 (1967).
- /20/ Gorman, J.E. e Clydesdale, F.M.; J. Food Sci. 48, 1217-25 (1983).
- /21/ Bauernfeind, J.C.; "Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism and Uses", ed. P.A. Seib e B.M. Tolbert; Adv. Chem. Ser. nº 200, American Chemical Society, Washington, 395-497 (1982).
- /22/ Dawson, R.C.; "Ascorbate Oxidase, a Review", em "The Biochemistry of Copper", ed. J. Peisach, P. Aisen e W.W. Blumber, Academic Press, New York e London, p. 303-38 (1966).
- /23/ Contreras, G.E.; Strong, F.C. e Guernelli, O.; "Determinação de Ácido Ascórbico (Vitamina C) por Redução de Íons Cúpricos", Química Nova, 7(2), 60-64 (1984).
- /24/ Xu, J. e Jordan, R.B.; Inorg. Chem. 29(16), 2933 - 36 (1990).

- /25/ Martinez, P. e Uribe, D.; J. Chim. Phys. 78(1), 47-49 (1981).
- /26/ Pachla, L.A.; Reynolds, D.L. e Kissinger, P.T.; J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68(1), 1-12 (1985).
- /27/ Hasselmann, C. e Diop, P.A.; Science des Aliments 3 (2), 161-80 (1983).
- /28/ Tillmans, J.; Z. Untersuch Levensm. 54, 33-43 (1927).
- /29/ Tonelli, D.; Budini, R. e Girotti, S.; Ann. Chim. 70(3-4), 111-17 (1980).
- /30/ Thompsen, J.C. e Mottola, H.A.; Anal. Chem. 56, 755-57 (1984).
- /31/ Sieh, H.H. e Sweet, T.R. Anal. Biochem. 96(1), 1 - 5 (1979).
- /32/ Contreras, G.E.; "Determinação de Tocoferóis e Tocotrienóis em Extratos Lipídicos por Redução de Ions Cúpricos", Tese de Doutorado, FEAA, UNICAMP, 1981.
- /33/ Roe, J.H. e Kuether, C.A.; J. Biol. Chem. 147, 399 - 407 (1943).
- /34/ Schmall, M.; Pifer, C.W.; Wollish, E.G.; Duschinsky, R. e Gainer, H.; Anal. Chem. 26, 1520-21 (1954).

- /35/ Perone, S.P. e Kretlow, W.J.; Anal. Chem. 38, 1760 - 63
(1966).
- /36/ Heyrovsky, J. e Zuman, P.; "Practical Polarography",
Academic Press, New York, p.102 (1968).
- /37/ Lindquist, J.; Analyst 100, 339-348 (1975).
- /38/ Official Methods of Analysis of the A.O.A.C., ed. W. Hor-
witz, 13^a ed., Assoc. Off. Anal. Chem., Washington,
D.C., 1980.
- /39/ Strohl, A.N. e Curran, D.J.; Anal. Chem. 51, 1045 - 49
(1979).
- /40/ Marsh, D.G.; Jacobs, D.L. e Veening, H.; J. Chem. Educ.
50, 626-28 (1973).
- /41/ Bunton, N.G.; Jeenings, N. e Crosby, N.T.; J. Assoc. Public
Anal. 17(3), 105-110 (1979).
- /42/ Schlack, J.E.; J. Assoc. Off. Agric. Chem. 57, 1346 - 48
(1974).
- /43/ Pachla, L.A. e Kissinger, P.T.; Anal. Chem. 48(2), 364-
-7 (1976).

- /44/ Schilt, A.A. e McBride, L.; "The Copper Reagents: cuproine, neocuproine, bathocuproine", G. Frederick Smith Chemical Company, Columbus, Ohio, 1972.
- /45/ Callender, S.T.; Mallett, B.J. e Smith, M.D.; Brit. J. Haemat. 3, 186-192 (1957).
- /46/ Martinez, P. e Uribe, D.; Z. Naturforsch 37b, 1446-49 (1982).
- /47/ Gorman, J.E. e Clydesdale, F.M.; J. Food Sci. 49, 500-503 (1984).
- /48/ Martinez, P.; Zulaga, J. e Uribe, D.; Z. Phys. Chemie 268, 105-112 (1987).
- /49/ Crosby, W.H.; Am. J. Clin. Nutr. 32, 715-16 (1979).
- /50/ Baker, S.J. e Demayer, E.M.; Am. J. Clin. Nutr. 32, 368-417 (1979).
- /51/ PAHO Advisory Committee on Medical Research, "Iron Metabolism and Anemia" (Symposium), Pan American Health Organization, 1969.
- /52/ Taboada, H.L.; Revista Chilena de Pediatria 54(2), 132-38 (1983).

- /53/ Organización Mundial de La Salud, Série de Informes Técnicos nº 580, Genebra, 1975.
- /54/ Koziol, B.J.; Ohira, Y.; Edgerton, V.R. e Simpson, D.R.; Am. J. Clin. Nutr. 36, 830-39 (1982).
- /55/ Huebers, H. e Finch, C.A.; Seminars in Hematology 19(3-5), 1982.
- /56/ Weinberg, E.D.; Microbiol. Rev. 42, 45-66 (1978).
- /57/ Robrins, E. e Pederson, T.; Nutr. Abst. Rev. 53, 585-98 (1983).
- /58/ Dallman, P.R.; Beutler, E. e Finch, C.A.; Brit. J. Haematol. 40, 179-84 (1978).
- /59/ Dallman, P.R.; Refino, C. e Yland, N.J.; Am. J. Clin. Nutr. 35, 671-77 (1982).
- /60/ Narassinga-Rao, B.S.; Brit. Med. Bull. 37, 25-43 (1981).
- /61/ Crosby, W.H.; Seminar. in Hematol. 3, 299-306 (1966).
- /62/ Forth, W. e Rummel, W.; Physiol. Rev. 53(3), 724 - 792 (1973).
- /63/ Layrisse, M.; Martinez-Torres, C.; Renzy, M. e Leets, I.; Blood 33, 430-443 (1969).

- /64/ Cook, J.D.; Lipschitz, D.A.; Miles, L.E.M. e Finch, C. A.; Am. J. Clin. Nutr. 27, 681-687 (1974).
- /65/ Monsen, E.R.; Hallberg, L.; Layrisse, M.; Hegsted, D. M.; Cook, J.D.; Mertz, W. e Finch, C.A.; Am. J. Clin. Nutr. 31, 134-141 (1978).
- /66/ Bjorn-Rasmussen, E.; Hallberg, L.; Magnusson, B.; Rossander, L.; Svanberg, B. e Arvidsson, B.; Am J. Clin. Nutr. 29, 772-779 (1976).
- /67/ Stekel, A.; Amar, M.; Calvo, E.; Chadud, P.; Hertrampf, E.; Llaguno, S.; Olivares, M. e Pizarro, F.; Archivos Latinoamericanos de Nutrición 33(1), 33-41 (1983).
- /68/ Cook, J.D. e Monsen, E.R.; Am. J. Clin. Nutr. 29, 859-867 (1976).
- /69/ Lynch, S.R. e Cook, J.D.; Ann. N.Y. Acad. Sci. 355, 32 (1980).
- /70/ Callender, S.T. e Warner, G.T.; Am. J. Clin. Nutr. 21, 1170 (1968).
- /71/ Amine, E.K. e Hegsted, D.M.; J. Agric. Food Chem. 22 (3), 470-76 (1974).
- /72/ Rossander, L.; Hallberg, L. e Morck, T.A. Am. J. Clin. Nutr. 32, 2384-2489 (1979).

- /73/ Morck, T.A.; Lynch, S.R. e Cook, J.D.; Am. J. Clin. Nutr. 37, 416-20 (1983).
- /74/ Hallberg, L.; Ann. Rev. Nutr. 123, 47-53 (1981).
- /75/ Thomas, J.C. e Chamberlin, G.J.; "Colorimetric Chemical Analytical Methods", 9ª ed., The Tintometer Ltd., Salisbury, England, 1980.
- /76/ Schilt, A.A.; "Analytical Applications of 1,10-phenanthroline and Related Compounds", Pergamon Press Ltd., 1ª ed., Oxford, 1969.
- /77/ Skoog, D.A. e West, D.M.; "Principles of Instrumental Analysis", Holt, Rinehart and Winston, Inc., 2ª ed., New York, 1971.
- /78/ Willard, H.H.; Meritt, L.L. e Dean, J.A.; "Instrumental Methods of Analysis", D. Van Nostrand Company, 4ª ed., New York, 1974.
- /79/ Lee, K. e Clydesdale, F.M.; J. Food Sci. 44(2), 549 (1979).
- /80/ Watt, K.B. e Merrill, L.A.; "Composition of foods-raw, processed, prepared", Agr. Handbook nº 8, U.S. Dept. Agr., Washington, D.C., 1963.

- /81/ Bligh, E.G. e Dyer, W.J.; Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917 (1959).
- /82/ Official Methods of Analysis of the A.O.A.C.; "Vitamins and other nutrients (bioassay methods)", 14^a ed., Ed. Sidney Williams, A.O.A.C., Arlington, 1984.
- /83/ Fritz, J.C.; Pla, G.W.; Roberts, T.; Boehne, J.W. e Hove, E.L.; J. Agric. Food Chem. 18, 647-51 (1970).
- /84/ Bender, F.E.; Douglass, L.W. e Kramer, A.; "Statistical Methods for Food and Agriculture", Avi Publ. Comp. Inc., Westport, 1981.
- /85/ Ringbom, A., "Complexation in Analytical Chemistry" In terscience Publ., 1^a ed., New York, 1963.
- /86/ Hacket, C.E.S.; Anal. Chim. Acta 12, 358 (1955).
- /87/ Nagy, S.; Shaw, P.E. e Veldhuis, M.K.; "Citrus Science and Technology", cap. 8, vol. 1, The Avi Publ. Comp., Westport, 1977.
- /88/ Rossotti, F.C. e Rossotti, H.; "The Determination of Stability Constants and Other Equilibrium Constants in Solution", McGraw-Hill Book Comp., Inc., New York, 1961.

- /89/ Silva, Maria Aparecida da; "Valor Threshold (limite de detecção) para Fe^{2+} em suco de laranja", Comunicação pessoal; Laboratório de Avaliação Sensorial da FEA-UNICAMP, 1987.
- /90/ Kennedy, J.F.; Rivera, Z.S.; Loyd, L.L.; Warner, F.P e Jumel, K.; J. Sci. Food Agric. 52, 85-95 (1990).
- /91/ Baker, H.J.; Lidsey, J.R. e Weisbrotk, S.H.; "The Laboratory Rat - biology and diseases", vol. I, Academic Press, Inc., Orlando, 1979.
- /92/ Baker, W.L. e Lowe, T.; Analyst 110, 1189 (1985).