

SUCO DE LARANJA COM FERRO: ASPECTOS QUÍMICOS E NUTRICIONAIS (UMA ALTERNATIVA NO COMBATE À ANEMIA)**Lúcia Helena Seron**

Departamento de Química - Universidade Federal de São Carlos - Cx. P. 676 - São Carlos - SP

Emilio S. Contreras Guzmán

Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) - UNICAMP - Campinas - SP

Recebido em 16/3/92; cópia revisada em 25/6/92

In order to formulate a product that could supply lacked iron children, orange juice was fortified with ferrous sulphate in three different molar ratios of vitamin C and Fe^{2+} . The fortified juice was stored at three different conditions: ambient temperature, refrigerated and frozen during 49 days. The product was analyzed each seven days to determine losses of vitamin C and Fe^{2+} or the occurrence of undesirable changes in the taste or colour of the juice. The addition of ferrous sulphate to orange juice with subsequent storage showed that the addition did not cause undesirable alterations or significant losses of the nutritional properties of the juice if it was stored refrigerated or frozen.

Keywords: orange juice; vitamin C; iron; determination.

INTRODUÇÃO

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.

O Ferro, elemento presente em todas as células do organismo e envolvido com um grande número de reações bioquímicas, tem uma importância nutricional largamente conhecida¹. A anemia nutricional é, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS)², um dos maiores problemas de saúde pública de países em desenvolvimento. Sua maior causa é a deficiência de ferro, também chamada anemia ferropriva³.

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. 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 ferro⁴.

A diminuição da hemoglobina impede a perfeita oxigenação dos tecidos, restringindo a capacidade física do homem proporcionalmente à sua gravidade. Porém, mecanismos fisiológicos 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 cardíaca⁵.

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

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 absorvido⁶.

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 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 biodisponibilidade⁷.

Os fatores que influenciam a absorção do ferro não-heme podem ser estimuladores ou inibidores. Dentre os primeiros, o ácido ascórbico⁸ é o mais potente e mais estudado pois facilita a absorção do ferro pela formação de quelatos solúveis tanto em pH alto quanto baixo⁹. A inclusão de suco de laranja ou limão durante a refeição aumenta a absorção do ferro 3 a 4 vezes¹⁰. Carne e peixe também são apontados como estimuladores da absorção do ferro, assim como as secreções gástricas podem facilitar a absorção do ferro.

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 digeríveis¹¹. Os fitatos têm seu efeito inibidor ainda questionado.

Caso os governos estaduais ou federais venham a implementar os seus programas de alimentação institucional com medidas para reverter a carência de ferro de crianças em idade escolar, 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.

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 escolar.

A 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.

MÉTODOS*Método da Redução de Íons Cúpricos*

Contreras et alii¹² publicaram um 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 extra-

ção 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.

Em nossa pesquisa, fizemos a determinação do ácido ascórbico no suco utilizando um sistema de uma única fase¹³ comparativamente ao método de Contreras et alii¹².

Após agitar-se a solução diluída de suco com clorofórmio, a fase aquosa é tamponada e adiciona-se o reagente de complexação que contém cuproína (2,2'-biquinolína), íons Cu^{2+} e etanol. O complexo púrpura $[\text{Cu}(\text{cuproína})_2]^+$ se forma em uma única fase sendo avaliado espectrofotometricamente a 545 nm.

Método da orto-fenantrolina¹⁴

A determinação se baseia no complexo vermelho-alaranjado $[(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3\text{Fe}]^{2+}$ 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.

Para determinar ferro no suco de laranja, procedeu-se do seguinte modo: após o tratamento da solução diluída do suco com clorofórmio, a fase aquosa foi tamponada e adicionou-se solução de hidroxilamina esperando-se 15 minutos para assegurar a redução do ferro. A seguir adicionou-se solução etanólica de orto-fenantrolina, agitou-se levemente e determinou-se a absorbância da solução a 510 nm.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparo do 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 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 - $\text{nH}_2\text{Asc}:\text{Fe}^{2+} = 5:1$

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

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

(*) Obs: utilizamos a abreviação H_2Asc para o ácido ascórbico.

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 49 dias.

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

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 retirados aproximadamente 5,00 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.

A ordem da 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
- 5,00 ml de etanol.

Obs.: O reagente de complexação era composto de três partes em volumes de etanol saturado com cuproína (2,2'-biquinolína) e uma parte em volume de solução 0,075% de acetato cúprico em água.

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 e Fe^{2+} no período considerado, expressa em porcentagem, foi obtida pela fórmula seguinte:

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

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

Foi utilizada a mesma solução diluída e tratada com clorofórmio das amostras I, III e IV, do item anterior. O Fe^{2+} foi determinado pelo método da orto-fenantrolina¹⁵ 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 absorbância 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.

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.

RESULTADOS

As tabelas 1 a 3 apresentam os resultados da porcentagem de perda de vitamina C e Fe^{2+} do suco de laranja concentrado adicionado de sulfato ferroso durante a estocagem. Os quadros A, B e C das Tabelas 1 a 3 representam os dados das perdas de vitamina C e Fe^{2+} para as amostras contendo diferentes relações molares de ácido ascórbico: Fe^{2+} (5:1, 2:1 e 1:1 respectivamente). Os valores do item (a) das Tabelas correspondem à perda total de vitamina C e Fe^{2+} determinada através da 2,2'-biquinolína; os valores do item (b) correspondem apenas à perda de vitamina C pois essa amostra não contém ferro; os valores do item (c) correspondem apenas à perda de ferro determinada através da o-fenantrolina e convertida ao método da 2,2'-biquinolína; os valores do item (d) representam a perda total de vitamina C e Fe^{2+} calculada de maneira indireta, isto é, a soma dos valores dos itens b + c.

Tabela 1 - Perdas de vitamina C e Fe^{2+} (expressas em porcentagem) do suco de laranja não adicionado e adicionado de ferro em várias relações molares (amostras Ia a IVa) estocado à temperatura ambiente por 49 dias (item (a): perda total de vitamina C + Fe^{2+} ; item (b): perda de vitamina C; item (c): perda de Fe^{2+} ; item (d): soma (b)+(c)).

Amostra		Tempo de estocagem (dias)						
		07	14	21	28	35	42	49
A	(a) Suco com Fe ²⁺ 5:1 (IIa)	0,20	10,6	17,3	23,1	31,7	51,9	59,6
	(b) Suco sem Fe ²⁺ (Ia)	2,10	9,40	12,5	17,7	25,0	48,9	56,3
	(c) Fe ²⁺ no suco 5:1 (IIa)	3,80	5,70	11,3	11,3	11,3	17,0	17,0
	(d) Soma b+c	2,30	9,00	12,4	17,1	23,6	45,8	52,3
B	(a) Suco com Fe ²⁺ 2:1 (IIIa)	8,90	12,5	17,0	23,2	33,0	53,6	60,7
	(b) Suco sem Fe ²⁺ (Ia)	2,10	9,40	11,5	17,7	25,0	49,0	56,3
	(c) Fe ²⁺ no suco 2:1(IIIa)	0,00	16,1	19,4	20,2	33,1	37,1	37,1
	(d) Soma b+c	1,60	10,4	12,7	17,6	25,8	45,0	50,6
C	(a) Suco com Fe ²⁺ 1:1 (IVa)	1,60	11,3	19,4	24,2	33,9	55,6	59,7
	(b) Suco sem Fe ²⁺ (Ia)	2,10	9,40	12,5	17,7	25,0	48,9	56,3
	(c) Fe ²⁺ no suco 1:1 (IVa)	2,30	13,1	21,3	23,5	34,8	38,0	39,4
	(d) Soma b+c	2,10	10,6	14,6	19,5	28,1	45,5	50,9

DISCUSSÃO

O suco de laranja concentrado 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 3,60 e 18,0 mg de Fe^{2+} , valores adequados para o planejamento 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 provadores¹⁶ mas foi usado para avaliar os efeitos de uma adição em excesso.

Os efeitos da adição de Fe^{2+} foram testados em três condições rotineiras da merenda escolar (temperatura ambiente, sob refrigeração e sob congelamento) durante 49 dias (7 semanas), período suficiente para que o produto seja consumido pelas instituições, pois o produto não visa o consumidor do supermercado.

Pelos dados das Tabelas 2 e 3 vemos que as perdas dos teores de vitamina C e de Fe^{2+} foram aumentando progressivamente até a quinta semana, havendo um aumento abrupto até a sétima semana. As perdas foram menores nas amostras estocadas a temperaturas mais baixas que nas estocadas à temperatura ambiente.

Na estocagem à temperatura ambiente (Tabela 1) a perda total de vitamina C e Fe^{2+} (dados do item a) foi relativamente alta no período considerado (59,6% no suco 5:1), não tendo havido, no entanto, diferença significativa nas amostras com teor mais alto de ferro (60,7% para o suco 2:1 e 59,7% para o suco 5:1 respectivamente). Esses valores foram um pouco menores nas amostras refrigeradas (-42,7%) e bem menores nas amostras congeladas (-35,6%).

As perdas de vitamina C isoladamente (item b) foram altas (56,3%) no período, tendo sido idênticas nas três amostras com diferentes teores de ferro, o que indica que a adição de Fe^{2+} não causa perda de vitamina C do suco. Esse comportamento foi observado para as três temperaturas de estocagem.

As perdas de Fe^{2+} isoladamente (item c) aumentaram sensivelmente de acordo com o aumento do teor de Fe^{2+} das amostras, tendo sido maiores nas amostras estocadas à tempe-

ratura ambiente, diminuindo nas amostras refrigeradas e congeladas sendo que esse efeito foi mais pronunciado nas amostras com teor mais alto de ferro (suco com Fe^{2+} 1:1).

Os dados do item d das Tabelas 1 a 3 se referem à soma das perdas de vitamina C e de Fe^{2+} medidas separadamente, por métodos diferentes. Nota-se que esse cálculo indireto dá valores inferiores ao método direto (dados do item a). Levando-se em conta que o sistema alimentar é complexo e os seus componentes estão sujeitos a interações, a disparidade desses valores não é exagerada. Deve-se lembrar que a determinação de Fe^{2+} com orto-fenantrolina desfaz complexos ferrosos, registrando o Fe^{2+} total. Já a determinação com 2,2'-biquinolína só determina Fe^{2+} não complexado, descartando-se o Fe^{2+} ligado à vitamina C e a outros compostos existentes no suco como pectatos, flavonóides, etc.

Outro aspecto analisado durante a estocagem foi o da intensidade da cor amarela do suco de laranja pois sua modificação poderia levar a problemas de aceitação do produto. De um modo geral, o Fe^{2+} acelerou a oxidação dos carotenóides (pigmentos amarelos), efeito relacionado como o teor de Fe^{2+} , porém não diretamente proporcional. A adição de Fe^{2+} comprometeu a aparência do suco adicionado na relação molar

Tabela 2 - Perdas de vitamina C e Fe^{2+} (expressas em porcentagem) do suco de laranja não adicionado e adicionado de ferro em várias relações molares (amostras Ib a IVb) estocado sob refrigeração a $+5,0^\circ\text{C}$ por 49 dias (item (a):perda total de vitamina C + Fe^{2+} ; item (b):perda de vitamina C; item (c): perda de Fe^{2+} ; item (d):soma (b)+(c)).

Amostra		Tempo de estocagem (dias)						
		07	14	21	28	35	42	49
A	(a) Suco com Fe ²⁺ 5:1 (IIb)	2,90	6,70	7,70	11,5	38,5	40,4	42,3
	(b) Suco sem Fe ²⁺ (Ib)	0,00	3,10	0,00	3,10	28,1	30,2	33,4
	(c) Fe ²⁺ no suco 5:1 (IIb)	0,00	5,70	5,70	11,4	11,4	13,2	17,0
	(d) Soma b+c	0,00	3,40	0,60	3,90	26,5	28,5	31,7
B	(a) Suco com Fe ²⁺ 2:1 (IIIb)	0,90	7,10	3,60	10,7	40,2	41,1	42,9
	(b) Suco sem Fe ²⁺ (Ib)	0,00	3,10	0,00	3,10	28,1	30,2	33,4
	(c) Fe ²⁺ no suco 2:1(IIIb)	2,40	10,5	13,7	20,2	29,0	31,5	33,9
	(d) Soma b+c	4,80	4,50	2,70	6,40	27,4	29,5	32,4
C	(a) Suco com Fe ²⁺ 1:1 (IVb)	0,00	2,40	1,60	9,70	37,1	39,5	42,7
	(b) Suco sem Fe ²⁺ (Ib)	0,00	3,10	0,00	3,10	28,1	30,2	33,4
	(c) Fe ²⁺ no suco 1:1 (IVb)	3,60	3,60	4,50	11,31	31,7	31,7	32,1
	(d) Soma b+c	1,10	3,30	1,40	5,70	29,2	30,7	33,0

Tabela 3 - Perdas de vitamina C e Fe^{2+} (expressas em porcentagem) do suco de laranja não adicionado e adicionado de ferro em várias relações molares (amostras Ic a IVc) estocado sob congelação a $-18,0^\circ\text{C}$ por 49 dias (item (a):perda total de vitamina C + Fe^{2+} ; item (b): perda de vitamina C; item (c): perda de Fe^{2+} ; item (d):soma (b)+(c)).

Amostra		Tempo de estocagem (dias)						
		07	14	21	28	35	42	49
A	(a) Suco com Fe ²⁺ 5:1 (IIc)	2,90	2,90	2,90	3,80	27,9	32,7	35,6
	(b) Suco sem Fe ²⁺ (Ic)	1,00	1,00	0,00	0,00	17,7	22,9	25,0
	(c) Fe ²⁺ no suco 5:1 (IIc)	0,00	0,00	5,70	11,4	15,1	17,0	17,0
	(d) Soma b+c	0,90	0,90	0,60	1,20	17,4	22,3	26,10
B	(a) Suco com Fe ²⁺ 2:1 (IIIc)	3,80	1,00	1,90	4,80	26,9	31,7	35,6
	(b) Suco sem Fe ²⁺ (Ic)	1,00	1,00	0,00	0,00	17,7	22,9	25,0
	(c) Fe ²⁺ no suco 2:1(IIIc)	2,40	4,80	7,20	13,7	16,1	20,2	24,20
	(d) Soma b+c	1,30	1,80	1,40	2,70	16,8	21,6	25,6
C	(a) Suco com Fe ²⁺ 1:1 (IVc)	0,00	0,00	1,00	2,00	20,0	30,8	38,5
	(b) Suco sem Fe ²⁺ (Ic)	1,00	1,00	0,00	0,00	17,7	22,9	25,0
	(c) Fe ²⁺ no suco 1:1 (IVc)	0,00	0,00	0,90	0,90	6,80	10,0	14,1
	(d) Soma b+c	0,70	0,70	0,30	0,30	14,3	18,8	23,1

1:1, especialmente na estocagem à temperatura ambiente. No entanto, as amostras refrigeradas apresentaram uma modificação muito pequena na intensidade dos pigmentos e as amostras congeladas não mudaram os valores iniciais dos pigmentos durante os 49 dias de estocagem.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a adição de sulfato ferroso ao suco

de laranja concentrado é viável, não causando modificações marcantes do sabor e da cor do suco, especialmente até uma relação molar de vitamina C: Fe^{2+} de 2:1 e em estocagem refrigerada ou congelada pelo tempo ótimo de quatro semanas. Nessas condições, são também preservadas a quase totalidade das propriedades nutricionais do suco, como o teor de vitamina C e de Fe^{2+} . Seria de grande importância que a idéia dessa pesquisa fosse aplicada pelos órgãos governamentais responsáveis pela merenda escolar.

REFERÊNCIAS

1. Crosby, W.H.; *Am.J.Clin.Nutr.*, (1979), 32, 715.
2. Baker, S.J. e Demayer, E.M.; "Nutritional anemia: its understanding and control with special reference to the work of the World Health Organization"; *Am.J.Clin.Nutr.*, (1979), 32, 368.
3. PAHO Advisory Committee On Medical Research, "Iron Metabolism and Anemia" (Symposium), Pan American Health Organization, 1969.
4. Koziol, B.J.; Ohira, Y.; Edgerton, V.R. e Simpson, D.R.; *Am.J.Clin.Nutr.*, (1982), 36, 830.
5. Huebers, H. e Finch, C.A.; *Seminars in Hematology*, (1982), 19, 3.
6. Bjorn - Rasmussen, E.; Hallberg, L.; Magnusson, B.; Rossander, L.; Svanberg, B. e Arvidsson, B.; *Am.J.Clin.Nutr.*, (1976), 29, 772.
7. Cook, J.D. e Monsen, E.R.; *Am.J.Clin.Nutr.*, (1976), 29, 859.
8. Lynch, S.R. e Cook, J.D.; *Ann.N.Y. Acad.Sci.*, (1980), 355, 32.
9. Amine, E.K. e Hegsted, D.M.; *J.Agric.Food Chem.*, (1974), 22, 470.
10. Rossander, L.; Hallberg, L. e Morck, T.A.; *Am. J. Clin. Nutr.*, (1979), 32, 2384.
11. Morck, T.A.; Lynch, S.R. e Cook, J.D.; *Am.J.Clin.Nutr.*, (1983), 37, 416.
12. Contreras, G.E.; Strong, F.C. e Guernelli, O.; "Determinação de Ácido Ascórbico (Vitamina C) por Redução de Íons Cúpricos"; *Química Nova*, (1984), 7, 60.
13. Seron, L.H. e Contreras, G.E.S.; "Determinação de Fe^{2+} e ácido ascórbico e suas interações em um sistema natural (suco de laranja concentrado)", Tese de Doutorado, UNICAMP, Instituto de Química, (1991).
14. Thomas, J.C. e Chamberlin, G.J.; "Colorimetric Chemical Analytical Methods", The Tintometer Ltd., Salisbury, (1980).
15. Schilt, A.A.; "Analytical Applications of 1,10-phenanthroline and Related Compounds", Pergamon Press Ltd., Oxford, (1969).
16. Silva, M.A. da; "Valor Threshold (Limite de Detecção) para Fe^{2+} em suco de laranja"; Comunicação pessoal, laboratório de Avaliação Sensorial da FEA - UNICAMP, (1987).

Publicação financiada pela FAPESP