



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS - MBT**

JUSSIVAL DE ABREU PINHEIRO NOVAES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA
QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE REDUTORA
DE EXTRATOS VEGETAIS SECOS**

MANAUS

2008

JUSSIVAL DE ABREU PINHEIRO NOVAES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA
QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE REDUTORA
DE EXTRATOS VEGETAIS SECOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cecilia Veronica Nunez

MANAUS

2008

N935d Novaes, Jussival de Abreu Pinheiro
Desenvolvimento e validação de método para
quantificação da capacidade redutora de extratos vegetais
secos . / Jussival de Abreu Pinheiro Novaes -- Manaus:
Universidade do Estado do Amazonas, 2008.
112 f. : il. color

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do
Amazonas - Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2008.
Orientadora: Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez

1. Desenvolvimento de método 2. Validação de
método 3.Capacidade redutora 4.Extrato vegetal I. Título.
CDU:604(043)



UEA
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DO
AMAZONAS

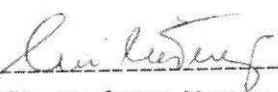



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROESP
CURSO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS




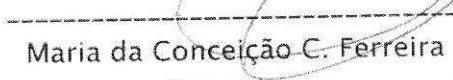
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO
DE *JUSSIVAL DE ABREU PINHEIRO NOVAES*
ALUNO DO CURSO DE MESTRADO EM
BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS.

Aos vinte e dois dias do mês de janeiro do ano de dois mil e oito, às quinze horas, realizou-se na Sala de aula do Curso de Biotecnologia, localizada no 1º andar, da Escola Superior de Ciências da Saúde, sito a Avenida Carvalho Leal, número 1777, Cachoeirinha, a defesa pública da dissertação do aluno **JUSSIVAL DE ABREU PINHEIRO NOVAES**, sob o título "**Desenvolvimento e validação de método para quantificação da capacidade redutora de extratos vegetais secos**". Atividade complementar aos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais, tendo como orientadora a Prof^ª. Dra. Cecília Verônica Nunez, segundo encaminhamento do Prof. Dr. Ademir Castro e Silva, Coordenador do Curso e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas – UEA. A Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes Professores: Prof. Dr. Jorge Luis Lopez Lozano (membro), Dr. Ézio Sargentini Junior (Membro). Encerrada a sessão após as arguições, os membros examinadores emitiram o parecer final sobre a dissertação, tendo o aluno sido APROVADO conforme o parecer da referida Comissão.
Manaus (AM), 22 de janeiro de 2008.


Dra. Cecília Verônica Nunez / UEA
(Orientadora)


Dr. Jorge Luis Lopez Lozano
Membro


Dr. Ezio Sargentini Jr.
Membro


Maria da Conceição C. Ferreira
Secretária

Dedico esta conquista à minha família, como resultado dos momentos ausentes.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua presença em minha vida, pois sem ela, esse trabalho não existiria;

A minha orientadora, Cecilia Veronica Nunez, pela paciência e apoio;

Aos meus amigos Joyceane, Luciana, Priscila, Janildo, Ézio, Edilene e Eduardo;

A Dra. Zênis Novais pelo apoio técnico nas medidas eletroquímicas.

RESUMO

O método desenvolvido nesta dissertação é definido como um método químico de quantificação indireta da capacidade redutora de extratos vegetais. Baseia-se na redução de íons Fe^{3+} por substâncias químicas contidas nos extratos e posterior quantificação de íons Fe^{2+} por técnica espectrofotométrica na região do visível usando o método adaptado do reagente 1,10-fenantrolina. A metodologia de desenvolvimento e validação adotada foi composta por três partes: caracterização da quantificação de íons Fe^{2+} na forma do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$; redução de íons Fe^{3+} por substâncias orgânicas e extratos vegetais; e caracterização do método proposto. Ácido ascórbico, hidroquinona, catecol, pirogallol, quercetina, Trolox®, BHA, BHT, cisteína e glutatona foram usados como redutores de referência. As amostras de extratos vegetais secos foram obtidas do banco de extratos do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, instalado na Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais (CPPN) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). O critério para a escolha dos extratos usados no processo de validação foi baseado em medidas (picos ou bandas de oxidação) por técnica de voltametria cíclica. O complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ é estável e nas condições testadas apresentou absorção máxima em 508,8 nm com absorvidade molar em torno de $(1,084 \pm 0,003) \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. A quantificação de íons Fe^{2+} na forma do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ é linear na faixa de 0,2 a 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A reta ajustada obtida pelo método dos mínimos quadrados apresentou equação $\text{ABS} = 0,01444 \pm 0,19417 \times [\text{Fe}^{2+}]$ ($R^2 = 0,9994$) para concentrações até 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $\text{ABS} = 0,00263 \pm 0,19974 \times [\text{Fe}^{2+}]$ ($R^2 = 0,9997$) até 5,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O processo de oxidação estabelecido consiste em duas etapas: (1) reação com íons Fe^{3+} e (2) reação com íons Fe^{3+} na presença de 1,10-fenantrolina. O grau de oxidação e a linearidade variam de acordo com o mecanismo de reação. O método proposto apresentou resposta positiva para o peptídeo glutatona, diferentemente de outros métodos descritos na literatura. O método desenvolvido e validado apresenta as seguintes características: Limite de decisão, de detecção e de quantificação iguais a 0,17 $\mu\text{g Fe}^{2+}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,20 $\mu\text{g Fe}^{2+}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 0,31 $\mu\text{g Fe}^{2+}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente; Reprodutibilidade e repetibilidade entre 0,5% e 3,9%; Discrepância absoluta entre 1,3% e 3,9% para os seguintes redutores ácido ascórbico, hidroquinona e BHA. Etanol, metanol, acetona e DMSO podem ser usados para dissolver os extratos vegetais. Etilenoglicol e DMF podem ser usados, mas podem coordenar com íons $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. A coordenação dos íons $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ por ligantes presentes no extrato é lábel em relação ao quelante 1,10-fenantrolina. Os íons Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , SO_4^{2-} , Cl^- e NO_3^- não interferem na quantificação do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, mas o íon PO_4^{3-} interfere em concentrações maiores que 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A radiação UV produz um falso positivo, convertendo Fe^{3+} em Fe^{2+} . Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o método desenvolvido para quantificação da capacidade redutora de extratos vegetais mostrou-se adequado e de fácil execução.

ABSTRACT

The developed method in this work is defined as a chemical method of indirect quantification of the reducing capacity of vegetable extracts. It is based on the reduction of ions Fe^{3+} by chemical substances contained in the extracts and subsequent quantification of Fe^{2+} ions for spectrophotometric technique in range of the visible using the adapted method of the reagent 1,10-phenanthroline. The procedure of the development and validation was composed by three parts: characterization of the quantification of Fe^{2+} in the form of the complex $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$; reduction of ions Fe^{3+} by organic compounds and vegetable extracts; and characterization of the proposed method. Ascorbic acid, hydroquinone, catechol, pyrogallol, quercetine, Trolox™, BHA, BHT, cisteine and glutathione were used as reference reducing. The samples of dry vegetable extract were obtained from bank of extracts of the Laboratory of Bioprospection and Biotechnology, installed in the *Coordenação de Pesquisas de Produtos Naturais* (CPPN) of the *Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia* (INPA). The criterion for the choice of the extracts used in the validation process was based on measures (peaks or oxidation bands) by cyclic voltammetry technique. The compound $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ is stable and in the tested conditions it did present maximum absorption in 508.8 nm with molar absorptivity around $(1.084 \pm 0.003) \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. The quantification of ions Fe^{2+} in the form of the compound $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ is linear in the range from 0.2 to 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The adjusted line obtained by the method of minimum squares presented equation $\text{ABS} = 0.01444 \pm 0.19417 \times [\text{Fe}^{2+}]$ ($R^2 = 0.9994$) for concentrations up to 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $\text{ABS} = 0.00263 \pm 0.19974 \times [\text{Fe}^{2+}]$ ($R^2 = 0.9997$) up to 5.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Established oxidation process consists of two stages: (1) reaction with ions Fe^{3+} and (2) reaction with ions Fe^{3+} in the presence of 1,10-phenanthroline. The oxidation degree and the linearity vary in agreement with the reaction mechanism. The proposed method presented positive answer for the glutathione, differently of other methods described in the literature. The developed method and validated presents the following characteristics: Limit of decision, of detection and of quantification was of 0.17 $\mu\text{g Fe}^{2+}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0.20 $\mu\text{g Fe}^{2+}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 0.31 $\mu\text{g Fe}^{2+}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively; Reproducibility and repeatability between 0.5% and 3.9%; absolute discrepancy between 1.3% and 3.9% for the following reducing: ascorbic acid, hydroquinone and BHA. Ethanol, methanol, acetone and DMSO can be used to dissolve the vegetable extracts. Ethylene glycol and DMF can be used, but they can coordinate with $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ions. The coordination of the $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ions for ligands present in the extract are labile in relation to chelante 1,10-phenanthroline. The Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , SO_4^{2-} , Cl^- e NO_3^- don't interfere in the quantification of the complex $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, but PO_4^{3-} ion interfere in higher concentrations than 10 $\mu\text{g Fe}^{2+}\cdot\text{mL}^{-1}$. The UV radiation produces false positive, converting Fe^{3+} in Fe^{2+} . With base in the obtained results, it can be concluded that the method developed for quantification of the reducing capacity of vegetable extracts was appropriate and of easy execution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do princípio químico e das características do método proposto.	23
Figura 2: Espectros de absorção das soluções de Fe^{3+} , e dos complexos de Fe^{3+} e Fe^{2+} com 1,10-fenantrolina.	46
Figura 3: Diagrama dos níveis energéticos dos orbitais d em campo octaédrico para configuração d^6 de spin baixo.	48
Figura 4: Estimativa visual dos limites, inferior e superior, da faixa linear para a quantificação de íons Fe^{2+}	49
Figura 5: Regressão linear da relação entre a absorbância do complexo e a concentração de Fe^{2+} na faixa de 0 – 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	49
Figura 6: Dispersão dos resíduos para regressão linear na faixa de 0,0 – 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	51
Figura 7: Estruturas químicas das substâncias orgânicas usadas como redutores de íons Fe^{3+}	54
Figura 8: Redução de íons Fe^{3+} por substâncias orgânicas em função do tempo em duas etapas: a) na ausência de 1,10-fenantrolina durante os primeiros 10 minutos; b) na presença de 1,10-fenantrolina durante os 50 minutos restantes.	55
Figura 9: Redução de íons Fe^{3+} por substâncias orgânicas em função do tempo na presença de 1,10-fenantrolina: (a) durante os primeiros 10 minutos; b) durante os 50 minutos restantes.	56
Figura 10: Redução de Fe^{3+} em função da concentração de redutor.	57
Figura 11: Estrutura do complexo binuclear μ -oxo-bis[aquobis(1,10-fenantrolina)ferro(III)] e proposta de mecanismo para oxidação de ácido ascórbico (HA).	59
Figura 12: Formação de Fe^{2+} em diferentes condições reacionais: a) 10 minutos; b) 60 minutos.	61
Figura 13: Oxidação e dimerização de fenóis.	64
Figura 14: Limites de detecção e quantificação do método expressos em unidades de concentração de Fe^{2+} . As curvas A, B e C são curvas de distribuição normal. A área preenchida mais densa equivale a 9,0% e a menos densa equivale a 5%.	66

Figura 15: Efeito da radiação ultravioleta em soluções contendo Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 1,10-fenantrolina	72
Figura 16: Efeito do solvente usado no preparo das amostras em soluções contendo Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 1,10-fenantrolina. Os intervalos de confiança são de 95% para 3 amostras.....	73
Figura 17: Efeito do solvente usado no preparo das amostras em soluções contendo Fe^{2+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 1,10-fenantrolina. Os intervalos de confiança são de 95% para 3 amostras.....	74
Figura 18: Efeito do extrato em soluções contendo, inicialmente, Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e tampão acetato.	75
Figura 19: Efeito de íons em soluções contendo, inicialmente, Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 1,10-fenantrolina. Os valores no interior das barras indicam a concentração do íon em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\text{IC}_{95\%}$ para 3 amostras).	77
Figura 20: Efeito de íons em soluções contendo, inicialmente, Fe^{2+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 1,10-fenantrolina. O espaço entre as linhas pontilhadas representa a concentração de referência no intervalo de confiança de 95%.	78
Figura 21: Capacidade redutora dos extratos testados e do ácido ascórbico (AA).	79
Figura 22: Correlação da capacidade redutora estimada pelos métodos com Fe^{3+} e DPPH•.	80
Figura B1: a. Célula eletroquímica; b. Potenciostato/galvanostato.	91
Figura B2: Voltamogramas dos extratos 4E, 4I e 4J.	91
Figura B3: Voltamogramas dos extratos 5L, 6P e 7S.....	92
Figura B4: Voltamogramas dos extratos 8T, 8W e 8X.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação e ocorrência de fenóis em análises de plantas.....	19
Tabela 2: Características e códigos de identificação dos extratos testados	27
Tabela 3: Informações das soluções redutoras usadas para verificar a redução de íons Fe^{3+} em função do tempo de reação	33
Tabela 4: Informações das soluções redutoras usadas para verificar a redução de íons Fe^{3+} em função da concentração de redutor	34
Tabela 5: Informações das soluções usadas para verificar a precisão do método	36
Tabela 6: Concentrações de elementos essenciais consideradas adequadas para crescimento e manutenção de plantas superiores	41
Tabela 7: Concentração das soluções iônicas	43
Tabela 8: Dados da regressão linear e análise de variância da relação absorbância do complexo versus concentração de Fe^{2+} no intervalo de 0,0 – 10,0 $\mu g.mL^{-1}$	50
Tabela 9: Dados da regressão linear e análise de variância da relação absorbância do complexo versus concentração de Fe^{2+} no intervalo de 0,0 – 5,5 $\mu g.mL^{-1}$	52
Tabela 10: Parâmetros da regressão linear entre concentração de Fe^{2+} e concentração de redutor	62
Tabela 11: Razão molar para a reação em duas etapas em determinada faixa de concentração do redutor.....	63
Tabela 12: Reprodutibilidade do método para diferentes concentrações de extrato	68
Tabela 13: Repetibilidade do método para diferentes concentrações de extrato	69
Tabela 14: Discrepâncias do método com o oxidante Fe^{3+}	70
Tabela 15: Comparação da capacidade redutora dos extratos usando os oxidantes Fe^{3+} e DPPH•	71
Tabela C.1: Linearidade do sistema – Seção 6.2 da Metodologia	93
Tabela C.2: Faixa de trabalho do sistema – Seção 6.3 da Metodologia	94

Tabela C.3: Redução de Fe ³⁺ (10,0 µg.mL ⁻¹) por Trolox (13,8 µg.mL ⁻¹) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia	95
Tabela C.4: Redução de Fe ³⁺ (10,0 µg.mL ⁻¹) por ácido ascórbico (8,0 µg.mL ⁻¹) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia	95
Tabela C.5: Redução de Fe ³⁺ (10,0 µg.mL ⁻¹) por hidroquinona (4,6 µg.mL ⁻¹) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia	96
Tabela C.6: Redução de Fe ³⁺ (10,0 µg.mL ⁻¹) por cisteína (12,4 µg.mL ⁻¹) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia	96
Tabela C.7: Redução de Fe ³⁺ (10,0 µg.mL ⁻¹) por BHA (8,3 µg.mL ⁻¹) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia	97
Tabela C.8: Redução de Fe ³⁺ (10,0 µg.mL ⁻¹) por pirogallol (1,7 µg.mL ⁻¹) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia	97
Tabela C.9: Redução de Fe ³⁺ (10,0 µg.mL ⁻¹) por extrato 5L (19,9 µg.mL ⁻¹) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia	98
Tabela C.10: Redução de Fe ³⁺ (10,0 µg.mL ⁻¹) por catecol (2,2 µg.mL ⁻¹) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia	98
Tabela C.11: Redução de Fe ³⁺ (10,0 µg.mL ⁻¹) por extrato 6P (22,2 µg.mL ⁻¹) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia	99
Tabela C.12: Redução de Fe ³⁺ (10,0 µg.mL ⁻¹) por quercetina (2,9 µg.mL ⁻¹) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia	99
Tabela C.13: Redução de Fe ³⁺ (10,0 µg.mL ⁻¹) por glutathione (26,5 µg.mL ⁻¹) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia	100
Tabela C.14: Redução de Fe ³⁺ (10,0 µg.mL ⁻¹) por BHT (28,2 µg.mL ⁻¹) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia	100
Tabela C.15: Redução de Fe ³⁺ em função da concentração de Trolox – Seção 7.2 da Metodologia	101
Tabela C.16: Redução de Fe ³⁺ em função da concentração de ácido ascórbico – Seção 7.2 da Metodologia	101
Tabela C.17: Redução de Fe ³⁺ em função da concentração de hidroquinona – Seção 7.2 da Metodologia	102
Tabela C.18: Redução de Fe ³⁺ em função da concentração de cisteína – Seção 7.2 da Metodologia	102
Tabela C.19: Redução de Fe ³⁺ em função da concentração de BHA – Seção 7.2 da Metodologia	103
Tabela C.20: Redução de Fe ³⁺ em função da concentração de pirogallol – Seção 7.2 da Metodologia	103
Tabela C.21: Redução de Fe ³⁺ em função da concentração de extrato 5L – Seção 7.2 da Metodologia	104
Tabela C.22: Redução de Fe ³⁺ em função da concentração de catecol – Seção 7.2 da Metodologia	104
Tabela C.23: Redução de Fe ³⁺ em função da concentração de extrato 6P – Seção 7.2 da Metodologia	105

Tabela C.24: Redução de Fe ³⁺ em função da concentração de quercetina – Seção 7.2 da Metodologia.....	105
Tabela C.25: Redução de Fe ³⁺ em função da concentração de glutatona – Seção 7.2 da Metodologia.....	106
Tabela C.26: Redução de Fe ³⁺ em função da concentração de BHT – Seção 7.2 da Metodologia.....	106
Tabela C.27: Absorbância dos “brancos” – Seção 8.1 da Metodologia.....	107
Tabela C.28: Reprodutibilidade e repetibilidade do extrato 5L – Seção 8.2 da Metodologia.....	107
Tabela C.29: Reprodutibilidade e repetibilidade do extrato 6P – Seção 8.2 da Metodologia.....	107
Tabela C.30: Repetibilidade dos extratos – Seção 8.2 da Metodologia	108
Tabela C.31: Quantificação da capacidade redutora dos extratos usando o método com DPPH• – Seção 8.3 da Metodologia	108
Tabela C.32: Curva de ácido ascórbico usando o método com Fe ³⁺ – Seção 8.3 da Metodologia.....	109
Tabela C.33: Curva de ácido ascórbico usando o método com DPPH• – Seção 8.3 da Metodologia.....	109
Tabela C.34: Efeito da radiação UV – Seção 8.4.1 da Metodologia.....	109
Tabela C.35: Efeito do solvente – Seção 8.4.2 da Metodologia.....	110
Tabela C.36: Efeito de ligantes presentes nos extratos – Seção 8.4.3 da Metodologia.....	110
Tabela C.37: Efeito de íons – Seção 8.4.4 da Metodologia	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	absorbância (em alguns casos o índice indica o comprimento de onda em nm no qual a absorbância foi medida, p. ex., ABS _{508,8})
ABTS	ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
BHA	2(3)- <i>terc</i> -Butil-4-metóxi-fenol
BHT	2,6-Di- <i>terc</i> -butil-4-metil-fenol
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH•	radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila
DPR	desvio padrão relativo de um conjunto de dados
DPR%	desvio padrão relativo percentual de um conjunto de dados
Fen	1,10-fenantrolina
FRAP	poder antioxidante para reduzir Fe ³⁺ , do inglês <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
ORAC	capacidade de absorbância do radical oxigênio, do inglês <i>Oxygen Radical Absorption Capacity</i>
TEAC	capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox, do inglês <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina

LISTA DE SÍMBOLOS

\bar{x}	média de um conjunto de dados
s	desvio padrão de um conjunto de dados
\hat{x}	valor predito de x
$N(\mu, \sigma)$	distribuição normal com média μ e desvio padrão σ
pK_a	logaritmo negativo da constante de dissociação ácida K_a
\hat{y}	valor predito de y
λ	comprimento de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	comprimento de onda de máxima absorbância
μ	média populacional
M	fator multiplicativo (exemplos: $1 \mu\text{L} = 10^{-6}$ litro; $1 \mu\text{g} = 10^{-6}$ grama)
Σ	desvio padrão populacional
$ \Delta\text{ABS} $	valor absoluto da variação de absorbância
e_g	notação da teoria dos grupos relacionada a operações de simetria; aplicado para orbitais d com direção dos eixos coordenados x , y e z
e_i	i -ésimo resíduo da regressão linear ($e_i = y_i - \hat{y}_i$), onde y_i é o i -ésimo valor observado e \hat{y}_i é o i -ésimo valor predito de y_i
t_{2g}	notação da teoria dos grupos relacionada a operações de simetria; aplicado para orbitais d situados entre os eixos coordenados x , y e z
Δ_o	diferença energética entre os orbitais e_g e t_{2g}

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
METODOLOGIA.....	23
1 Materiais.....	24
2 Reagentes e solventes	24
3 Instrumentos e acessórios.....	25
4 Amostras de extratos secos	26
5 Soluções.....	27
5.1 Solução tampão de acetato de sódio (pH ~ 4,5)	27
5.2 Solução de 1,10-fenantrolina 0,25% (m/v)	27
5.3 Solução padrão de Fe ³⁺ (1.000,0 µg.mL ⁻¹)	28
5.4 Solução metanólica de 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (~ 28 µg.mL ⁻¹)	28
6 Estudo do sistema ferro-fenantrolina.....	28
6.1 Espectros de absorção.....	29
6.2 Linearidade do sistema	30
6.3 Faixa de trabalho do sistema	31
7 Redução de íons ferro(III) por substâncias orgânicas	31
7.1 Redução de ferro(III) em função do tempo de reação.....	32
7.2 Redução de ferro(III) em função da concentração de redutor.....	34
8 Caracterização do método proposto	35
8.1 Limites de detecção e quantificação	35
8.2 Precisão	35
8.3 Exatidão	37
8.4 Interferentes	38
8.4.1 Radiação ultravioleta	38
8.4.2 Efeito de solventes	39
8.4.3 Efeito de ligantes presentes nos extratos.....	40
8.4.4 Efeito de íons	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
1 Espectros de absorção do sistema ferro/fenantrolina	45
2 Faixas linear e de trabalho na quantificação de Fe ²⁺	48
3 Redução de íons Fe ³⁺ por substâncias orgânicas	54
4 Limites de detecção e de quantificação	65
5 Precisão e exatidão.....	67
6 Efeito da radiação UV	71

7 Efeito de solvente.....	73
8 Efeito de ligantes presentes nos extratos.....	75
9 Efeito de íons	76
10 Aplicação.....	78
CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS E OBRAS CONSULTADAS	85
APÊNDICE A – Procedimento de obtenção dos extratos vegetais	89
APÊNDICE B – Perfil oxi-redutor de extratos vegetais por técnica de voltametria cíclica.....	90
APÊNDICE C – Dados obtidos no processo de desenvolvimento e validação do método proposto	93
ANEXO A – Descarte de resíduos contendo 1,10-fenantrolina.....	112

INTRODUÇÃO

A validação de método pode ser definida como o processo destinado a estabelecer suas características e limitações, bem como, identificar os fatores que podem modificar essas características e com qual extensão (EUROCHEM, 2005). Por exemplo, um método químico analítico validado deve responder às seguintes perguntas: quais analitos ou substâncias podem ser quantificadas, em quais matrizes, e na presença de quais interferentes? Nessas condições, quais níveis de precisão e exatidão podem ser aceitos?

A validação e o desenvolvimento de um procedimento experimental são, geralmente, indissociáveis, uma vez que, na maioria dos casos, é impossível determinar exatamente quando o desenvolvimento termina e a validação começa. Muitos parâmetros do procedimento submetidos à validação são, ao menos, partes do desenvolvimento.

O grau ou extensão da validação de um método pode variar de acordo com o propósito. Se o propósito do método é a análise de substâncias químicas, a validação incluirá os parâmetros de exatidão, precisão, seletividade, sensibilidade, estabilidade, interferentes e efeito de matriz. Para a análise de drogas e seus metabólitos, além dos parâmetros já mencionados, outros relacionados com a

bioanalítica e farmacologia serão incluídos, e se for necessário, o procedimento deve ser feito com a participação de outros laboratórios (validação interlaboratorial). Em alguns casos, o processo deve seguir um protocolo definido por um determinado setor ou órgão internacional, como a *AOAC International* no caso de análises de alimentos.

Isolar constituintes de plantas com atividade farmacológica requer um longo processo e muita paciência. Por esse motivo, é importante dispor de métodos válidos que eliminem procedimentos de separação desnecessários. Testes químicos qualitativos e/ou quantitativos podem identificar metabólitos em extratos ou direcionar a separação de classes de constituintes úteis, e assim, economizar muito tempo.

Nos últimos anos, a área fitoquímica tem-se ocupado numa classe de metabólitos secundários com propriedade antioxidante, da qual se destacam as substâncias fenólicas. A tabela 1 apresenta a classificação das substâncias fenólicas comumente encontradas em análises de plantas. A maioria das substâncias fenólicas origina-se, usualmente, da rota do ácido chiquímico e é armazenada nos vacúolos das células vegetais. Com exceções importantes, as funções das substâncias fenólicas são obscuras e muitas vezes são simplesmente consideradas co-produtos. Acredita-se que sejam antioxidantes na planta e os pigmentos fenólicos sirvam como atrativos para polinizadores (BONNER, 1976; SALISBURY, 1992).

Vários métodos têm sido utilizados para estimar a capacidade antioxidante em extratos vegetais, entre eles: TEAC, usando ABTS na forma de um cátion radical (LEONG, 2002; PIETTA, 2000); ensaio com o radical DPPH• (LIU, 2007; LUIS,

2006); FRAP, usando Fe^{3+} coordenado com o ligante TPTZ (GUO, 2003; WONG, 2006); e ORAC, usando a proteína fluorescente ficoeritrina (PRICE, 2006; THAIPONG, 2006). ORAC e ensaio com DPPH• são métodos baseados em reações de transferência de átomos de hidrogênio, enquanto que FRAP e TEAC, transferência de elétrons. Outros métodos mais sofisticados usam técnicas como coulometria (PEYRAT-MAILLARD, 2000), voltametria cíclica (CHEVION, 2002), polarografia de onda quadrada e pulso diferencial com pré-concentração em gota de mercúrio – *stripping analysis* – (HERNÁNDEZ, 1995), ressonância spin-elétron (HU, 2002) e DNA imobilizado na superfície de eletrodos (MELLO, 2006).

Tabela 1: Classificação e ocorrência de fenóis em análises de plantas

Grupo		Fenóis mais comuns
Fenóis livres		Hidroquinona, catecol, orcinol, floroglucinol e pirogalol.
Ácidos fenólicos		Ácidos <i>p</i> -hidroxibenzóico, protocatéquico, vanílico e siríngico
Fenilpropanóides	Ácidos hidroxicinâmicos	Ácidos ferúrico, sinápico, caféico e <i>p</i> -coumárico
	Coumarinas	Umbeliferona, esculetina e escopoletina
	Lignanas e fenilpropenos	Miristicina, eugenol e isoeugenol
Flavonóides		Antocianinas, flavonóis, flavonas, flavononas, isoflavonas
Taninos		Taninos condensados, galotaninos, elagitaninos, prototaninos
Quinonas		Benzoquinonas, naftaquinonas, antraquinonas e quinonas isoprenóides

Fonte: HARBORNE, 1998.

Segundo Prior (1999), antioxidante é definido como uma substância que, quando presente em concentrações pequenas comparadas com do substrato

oxidável, previne ou diminui os efeitos do pró-oxidante no substrato. Um pró-oxidante seria uma substância tóxica que causaria danos oxidativos em biomoléculas importantes (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos), ou seja, pró-oxidante seria um oxidante de importância biológica. Assim, ele redefine alguns termos, dizendo que redutor e oxidante são termos químicos, enquanto que antioxidante e pró-oxidante tem significado no contexto de sistemas biológicos. Para reforçar sua colocação, Prior cita o método FRAP que trata redutor e antioxidante como sinônimo ao relacionar a capacidade antioxidante com a redução de íons Fe^{3+} , mas, no entanto, o método não quantifica glutathione (um antioxidante celular importante). A partir dele, tais definições vem sendo usadas constantemente.

Na base de dados ScienceDirect, observa-se que o termo antioxidante aparece pela primeira vez em uma publicação de química dos polímeros no início do século passado, como sinônimo de redutor (USE, 1929). O primeiro artigo na área biológica a usar o termo foi publicado em torno dos anos 50 (SWICK, 1952). Já, o termo pró-oxidante é usado para substâncias ou agentes que induzem a oxidação (BUDOWSKI, 1960; HUSBANDS, 1979; RANAWEERA, 1976). Além disso, a maioria dos métodos usados para quantificar a capacidade antioxidante, acima citados, baseia-se em reações de oxi-redução.

Quanto à definição de antioxidante, a mesma só faz sentido quando as enzimas são mencionadas. A propriedade antioxidante do ácido ascórbico, por exemplo, está indubitavelmente relacionada ao fato dele ser um bom agente redutor. Sua forma oxidada (ácido dehidroascórbico) pode ser reduzida pela glutathione formando um sistema reversível de oxi-redução, catalisada pela enzima glutathione-desidrogenase (CONN, 1980).

A importância dos antioxidantes é devida à capacidade de manter o balanço redox de sistemas biológicos, evitando o estresse oxidativo. O balanço redox, na célula, pode ser representado pela soma dos produtos do potencial de redução (obtida pela equação de Nernst) e da capacidade redutora (concentração de espécies reduzidas) de uma série de pares redox acoplados (equação 1). A intensidade e patogenicidade destes desequilíbrios vão depender das concentrações locais de espécies pró e antioxidantes, das constantes de velocidade de reação com moléculas-alvo e da compartimentalização celular destes processos (VASCONCELOS, 2007).

$$\text{Balanço redox} = \sum_i (E_i \times [\text{reductor}]_i) \quad (\text{Eq. 1})$$

Portanto, um método antioxidante no contexto biológico será válido se for realizado *in vivo*. Nesse contexto, nenhum dos métodos citados acima será válido para a avaliação de extratos com propriedade antioxidante, uma vez que todos se baseiam em procedimentos *in vitro*. Ou seja, não passam de métodos para estimar a capacidade redutora de extratos vegetais. Desses, o mais simples é o método usando o radical DPPH•, que possui a desvantagem de ser instável em intervalos de tempo maiores que 30 minutos (MOLYNEUX, 2004). Além da desvantagem similar ao radical DPPH•, o método TEAC possui um preparo muito longo.

Esse trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método simples para estimar a capacidade redutora de extratos vegetais baseado na redução de íons Fe³⁺ e quantificação dos íons Fe²⁺ usando o ligante 1,10-fenantrolina. A identificação de extratos redutores pode auxiliar na escolha do material vegetal a ser

priorizado em estudos fitoquímicos e farmacológicos, ou ainda, indicar a potencialidade do uso de tais extratos na indústria de alimentos e cosméticos em estado bruto. Segundo Khopde (2001), substâncias em formulação “natural” podem ser mais ativas que na forma isolada.

METODOLOGIA

Para um maior entendimento desta seção, o princípio químico e os pontos abordados no desenvolvimento e validação do método proposto estão esquematizados na figura 1. A metodologia adotada foi composta por três partes: caracterização da quantificação de íons Fe^{2+} na forma do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$; redução de íons Fe^{3+} por substâncias orgânicas e extratos vegetais; e caracterização do método proposto.

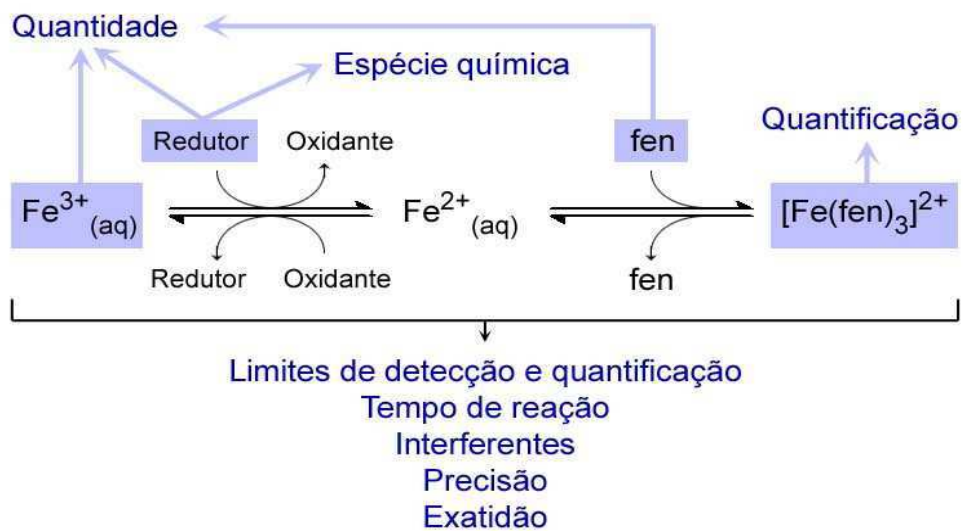


Figura 1: Esquema do princípio químico e das características do método proposto.

1 MATERIAIS

- Tubos de 1,5 mL com tampa, fabricante Eppendorf, modelo Standard 3810;
- Ponteiros para micropipetas, fabricante Gilson, modelos Diamond D200 e D1000;
- Indicador universal de pH (0–14) em tiras, fabricante Merck;
- Balões volumétricos de 10, 50, 100 e 1000 mL;
- Béqueres de 10 e 50 mL;

2 REAGENTES E SOLVENTES

- Acetato de sódio ($C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$) – Merck;
- Acetona (C_3H_6O) – Merck;
- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico [Trolox®] ($C_{14}H_{18}O_4$) – Aldrich*;
- Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$) – Merck;
- Ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) – Merck;
- Ácido clorídrico fumegante (HCl) – Merck;
- 2,6-Di-*terc*-butil-4-metil-fenol [BHT] ($C_{15}H_{24}O$) – Sigma-Aldrich*;
- 2(3)-*terc*-Butil-4-metóxi-fenol [BHA] ($C_{11}H_{16}O_2$) – Sigma*;
- Cloreto de hidroxilamônio ($H_3NO \cdot HCl$) – J. T. Baker;

- Etanol (C₂H₆O) – Cromoline;
- Etilenoglicol (C₂H₆O₂) – Vetec;
- 1,10-Fenantrolina (C₁₂H₈N₂ · H₂O) – Vetec;
- 1,1-Difenil-2-picril-hidrazila [DPPH•] (C₁₈H₁₂N₅O₆) - Sigma-Aldrich*;
- 1,2-Dihidroxibenzeno [Catecol] (C₆H₆O₂) – J. T. Baker;
- 1,4-Dihidroxibenzeno [Hidroquinona] (C₆H₆O₂) – CAAL;
- 1,2,3-Trihidroxibenzeno [Pirogalol] (C₆H₆O₃) – Vetec;
- Metanol (CH₄O) – Cromoline;
- N,N-Dimetilformamida (C₃H₇NO) – Aldrich**;
- Dimetilsulfóxido (C₂H₆OS) – Vetec;
- Quercetina (C₁₅H₁₀O₇ · 2H₂O) – Sigma*;
- Sulfato férrico amoniacal (H₄FeNO₈S₂ · 12H₂O) - Sigma-Aldrich*;

* Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany.

** Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA.

Nota: os nomes comerciais estão entre colchetes.

3 INSTRUMENTOS E ACESSÓRIOS

- 1 cubeta de vidro ótico com volume reduzido (1,5 mL);
- Espectrofotômetro UV/VIS feixe simples, fabricante CECIL Instruments, modelo CE1010 (SN: 90289);

- Balança analítica, fabricante Scientech, modelo AS 210;
- Deionizador de água, fabricante Elga, modelo PureLab Ultra;
- Centrífuga para micro tubos, fabricante Eppendorf, modelo MiniSpin;
- Micropipetas de volume variável (2-20 μL ; 30-200 μL ; 200-1000 μL), fabricante Gilson, modelos Pipetman P20, P200 e P1000.
- Fonte de radiação ultravioleta 254 nm, fabricante Spectronics Corp., modelo BLE-8T254;
- Fonte de radiação ultravioleta 365 nm, fabricante Light Express, modelo T56W-BLB.
- Cronômetro digital;

4 AMOSTRAS DE EXTRATOS SECOS

Os extratos vegetais secos foram obtidos do banco de extratos do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, instalado na Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Os detalhes da obtenção dos extratos estão descritos no apêndice A. Foram testados extratos obtidos com diclorometano, metanol e água. O critério para a escolha dos extratos usados no processo de validação foi baseado em medidas (picos ou bandas de oxidação) por técnica de voltametria cíclica (apêndice B). A tabela 2 apresenta as características dos extratos testados e os respectivos códigos de referência.

Tabela 2: Características e códigos de identificação dos extratos testados

Espécie	Material botânico	Extrato	Código
<i>Pouroma villosa</i>	Folha	Metanol	4E
<i>Pouroma villosa</i>	Folha	Água	4I
<i>Pouroma villosa</i>	Folha	Diclorometano	4J
<i>Minquartia guianensis</i>	Folha	Metanol	5L
<i>Duroia macrophylla</i> ⁽¹⁾	Folha	Metanol	6P
<i>Ferdinandusa goudotiana</i>	Folha	Metanol	7S
<i>Derris floribunda</i>	Folha	Diclorometano	8T
<i>Derris floribunda</i>	Raiz	Diclorometano	8W
<i>Derris floribunda</i>	Raiz	Metanol	8X

Nota: (1) Reclassificada como *Deguelia duckeana*

5 SOLUÇÕES

A seguir, estão descritas as soluções usadas em todo o processo de desenvolvimento, validação e aplicação do método. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada (condutância de $18 \text{ M}\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

5.1 Solução tampão de acetato de sódio (pH ~ 4,5)

Uma quantidade de acetato de sódio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) contendo 4,7628 g foi dissolvida em água e transferida, quantitativamente, para um balão volumétrico com capacidade para 1 L. Após a dissolução, foram adicionados 3,7 mL de ácido acético glacial ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) e água suficiente para completar o volume.

5.2 Solução de 1,10-fenantrolina 0,25% (m/v)

Uma quantidade de 1,10-fenantrolina ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) contendo 0,25 g foi dissolvida com solução tampão de acetato de sódio (pH ~ 4,5), transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume restante foi preenchido com solução tampão. A solução homogeneizada foi guardada em frasco escuro.

Todas as soluções contendo o reagente 1,10-fenantrolina foram reservadas para posterior tratamento. O anexo A descreve o procedimento usado para a decomposição do reagente antes do descarte.

5.3 Solução padrão de Fe^{3+} ($1.000,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Uma quantidade de sulfato férrico amoniacal ($\text{H}_4\text{FeNO}_8\text{S}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) contendo 8,6344 g foi dissolvida com uma solução de ácido clorídrico (HCl) 1% (v/v) e transferida, quantitativamente, para um balão volumétrico com capacidade para 1 L. Após a dissolução, o volume restante foi preenchido com a solução de ácido clorídrico. A solução homogeneizada foi guardada em frasco escuro.

5.4 Solução metanólica de 1,1-difenil-2-picril-hidrazila ($\sim 28 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Uma quantidade de DPPH• contendo 2,8 mg foi dissolvida com 1 mL de diclorometano, diluído com metanol e transferido para um balão volumétrico de 100 mL. O volume restante foi preenchido com metanol. A solução era preparada momentos antes do uso e guardada em frasco escuro.

6 ESTUDO DO SISTEMA FERRO-FENANTROLINA

A quantificação de íons Fe^{2+} com o reagente 1,10-fenantrolina (BASSETT, 1981) foi modificado para atender ao propósito do presente trabalho. As seguintes alterações foram feitas:

- redução dos volumes para ordem de μL ;
- o volume do redutor hidroxilamina, usado no preparo da curva analítica de Fe^{2+} (relação entre a absorbância do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ e a concentração de íons Fe^{2+}), foi estabelecido em $160 \mu\text{L}$;

- a solução de 1,10-fenantrolina (solução 5.2) foi preparada em tampão acetato pH ~ 4,5 (solução 5.1) com o objetivo de diminuir o número de alíquotas no procedimento e disponibilizar cerca de 43% de 1,10-fenantrolina desprotonada ($pK_a = 4,86$);
- a solução (5.2) contendo o ligante 1,10-fenantrolina foi adicionada em excesso a fim de deslocar os equilíbrios entre Fe^{3+}/Fe^{2+} e outros ligantes existentes no meio, garantindo, assim, a formação do complexo $[Fe(fen)_3]^{2+}$.

As subseções seguintes descrevem os procedimentos usados na caracterização do sistema ferro-fenantrolina para o método proposto.

6.1 ESPECTROS DE ABSORÇÃO

Varreduras na faixa do espectro eletromagnético compreendido entre 350-800 nm, com resolução de 5 nm, foram feitas para as seguintes soluções:

- Solução contendo íons Fe^{3+} com concentração de $5,0 \mu g.mL^{-1}$. *Preparo*: 5 μL de solução padrão de Fe^{3+} , 160 μL de água deionizada e 990 μL de solução tampão de acetato;
- Solução contendo íons Fe^{2+} com concentração de $5,0 \mu g.mL^{-1}$. *Preparo*: 5 μL de solução padrão de Fe^{3+} , 5 μL de solução de hidroxilamina 10% e 990 μL de solução tampão de acetato;
- Solução contendo íons Fe^{3+} com concentração de $5,0 \mu g.mL^{-1}$ na presença de 1,10-fenantrolina. *Preparo*: 5 μL de solução padrão de Fe^{3+} , 5 μL de água deionizada e 990 μL de solução 1,10-fenantrolina 0,25%;

- Solução contendo íons Fe^{2+} com concentração de $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na presença de 1,10-fenantrolina. *Preparo:* 5 μL de solução padrão de Fe^{3+} , 5 μL de solução de hidroxilamina 10% e 990 μL de solução 1,10-fenantrolina 0,25%.

Para as linhas de base foram usadas as respectivas soluções descritas acima com substituição da solução de ferro por água deionizada. O comprimento de onda com máxima absorção (λ_{max}) do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ foi determinado com resolução de 1 nm e usado para todas as determinações de Fe^{2+} .

6.2 LINEARIDADE DO SISTEMA

A faixa de concentração de íons Fe^{2+} estudada foi de 0 a $24 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As soluções contendo íons ferro foram preparadas a partir da solução padrão de Fe^{3+} (seção 5.3). Um volume de 160 μL de solução de hidroxilamina 10% (m/v) foi usada para reduzir os íons Fe^{3+} seguida de 800 μL da solução de 1,10-fenantrolina 0,25%. A leitura da absorbância foi feita após 15 minutos em 508,8 nm, como determinado na seção 6.1.

A faixa de linearidade foi determinada, visualmente, usando uma relação entre a medida de absorbância (eixo y) e a concentração de Fe^{2+} (eixo x). Uma determinação mais detalhada foi feita na seção seguinte (6.3) usando o método de regressão linear por mínimos quadrados.

A concentração inicial de íons Fe^{3+} para o procedimento de quantificação da capacidade redutora foi estabelecida com base nos resultados deste procedimento, sendo igual à concentração máxima de íons Fe^{2+} na faixa linear.

6.3 FAIXA DE TRABALHO DO SISTEMA

A faixa de concentração de Fe^{2+} estudada foi de 0,0 – 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, conforme a faixa de linearidade determinada na seção 6.2. Foram usadas seis soluções padrão de Fe^{3+} (1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) preparadas como descrito na seção 5.3, com volume de solução de 100 mL. As soluções padrão foram numeradas e associadas de maneira aleatória ao preparo de três curvas com concentrações de Fe^{2+} distribuídas uniformemente na faixa de 0,2 a 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os volumes de hidroxilamina 10% e 1,10-fenantrolina 0,25% foram 160 μL e 830 μL , respectivamente. A leitura da absorbância foi feita após 15 minutos em 508,8 nm. Para garantir independência das medidas em escala curta de tempo, o procedimento foi repetido três vezes, em dias diferentes.

A relação entre a absorbância do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ e a concentração de Fe^{2+} foi usada para expressar os resultados. O método de regressão linear por mínimos quadrados foi aplicado à relação para a estimativa dos parâmetros estatísticos da equação da reta. A análise dos resíduos foi usada para confirmar a linearidade da faixa de trabalho.

7 REDUÇÃO DE ÍONS FERRO(III) POR SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS

Os procedimentos descritos nesta seção tiveram como objetivos: definir um intervalo de tempo razoável para a redução de íons Fe^{3+} por substâncias orgânicas; definir um intervalo de concentração de soluções redutoras; e obter uma visão geral da redução de íons Fe^{3+} por diferentes redutores orgânicos. Em todos os procedimentos, as soluções contendo Fe^{3+} foram protegidas da incidência direta de luz. Ácido ascórbico, cisteína, glutatona reduzida, hidroquinona, catecol, pirogallol, quercetina, BHA, BHT e Trolox foram usados como redutores, além de dois extratos

que apresentaram bandas de oxidação por técnica de voltametria cíclica (apêndice B). As reações foram conduzidas em temperatura ambiente (23 °C) com flutuações da ordem de 2 °C, uma vez que o estudo cinético das mesmas não foi pretendido.

7.1 REDUÇÃO DE FERRO(III) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO

A redução de íons Fe^{3+} em função do tempo de reação foi observada para duas situações diferentes: redução na ausência de 1,10-fenantrolina nos primeiros 10 minutos e redução na presença de 1,10-fenantrolina após 10 minutos de reação com íons Fe^{3+} (procedimento A); e redução dos íons Fe^{3+} complexado com 1,10-fenantrolina (procedimento B). A concentração inicial de íons Fe^{3+} para essas observações foi de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a concentração dos redutores (tabela 3) foi estabelecida para que houvesse um gasto de metade da concentração inicial de Fe^{3+} , aproximadamente. Os procedimentos A e B estão descritos a seguir.

Procedimento A - técnica da retirada de alíquotas (LATHAM, 1974). Um volume de 200 μL da solução redutora (tabela 3) foi adicionada a 200 μL de solução padrão de Fe^{3+} e a solução foi homogeneizada. A contagem do tempo foi iniciada – “tempo zero” – no momento da adição da solução redutora. Em intervalos de 1 minuto, um volume de 980 μL de 1,10-fenantrolina 0,25% foi adicionado em uma alíquota de 20 μL da mistura reacional previamente reservada. A mistura contendo 1,10-fenantrolina foi homogeneizada e sua absorvância foi mensurada em 508,8 nm após 30 segundos contados a partir da adição da fenantrolina. O período observado foi de 10 minutos e a última mistura (para $t = 10$ minutos) foi reservada para a medida contínua da absorvância em intervalos de 10 minutos durante 50 minutos.

Procedimento B. Um volume de 980 μL de 1,10-fenantrolina 0,25% foi adicionado a uma alíquota de 10 μL de solução padrão de Fe^{3+} , seguido por uma alíquota de 10 μL de solução redutora. O “tempo zero” foi considerado ao momento da adição da solução redutora. A mistura reacional foi homogeneizada e sua absorbância em 508,8 nm foi mensurada em intervalos de 1 minuto; após 10 minutos, o intervalo foi de 10 minutos durante 50 minutos.

Tabela 3: Informações das soluções redutoras usadas para verificar a redução de íons Fe^{3+} em função do tempo de reação

Redutor	Massa (g)	Volume de solução (mL)	Solvente	Concentração ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
BHT	0,0705	25,0	Água/Acetona ⁽¹⁾	2,82
Glutaciona reduzida	0,0265	10,00	Água	2,65
Extrato 6P	0,0222	10,00	Etanol	2,22
Extrato 5L	0,0199	10,00	Etanol	1,99
Trolox	0,0138	10,00	Água/Acetona ⁽¹⁾	1,38
Cisteína	0,0124	10,00	Água	1,24
BHA	0,0208	25,0	Água/Acetona ⁽¹⁾	$8,32 \times 10^{-1}$
Ácido ascórbico	0,0114	25,0	Água	$8,00 \times 10^{-1}$
Hidroquinona	0,0114	25,0	Água	$4,56 \times 10^{-1}$
Quercetina	0,0144	50,0	Água/Acetona ⁽¹⁾	$2,88 \times 10^{-1}$
Catecol	0,0109	50,0	Água	$2,18 \times 10^{-1}$
Pirogalol	0,0171	100,0	Água	$1,71 \times 10^{-1}$

(1) O redutor foi completamente dissolvido em acetona e o volume restante preenchido com água ou acetona/água, a fim de manter a solubilidade do redutor.

Os dados foram avaliados com o uso de gráficos da concentração de íons Fe^{2+} formados versus tempo de reação.

7.2 REDUÇÃO DE FERRO(III) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE REDUTOR

Para avaliar o efeito da concentração de redutor na redução de íons Fe^{3+} , alguns parâmetros reacionais foram estabelecidos com base nas observações da subseção anterior (7.1). A reação foi conduzida em duas etapas: (1) reação de íons Fe^{3+} com o agente redutor; (2) continuação da reação na presença de 1,10-fenantrolina. A concentração inicial de íons Fe^{3+} no meio reacional foi de $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e as concentrações dos redutores foram obtidas por 12 diluições sucessivas das soluções apresentadas na tabela 4, totalizando 13 soluções para cada redutor com fator de diluição igual a 0,5.

Tabela 4: Informações das soluções redutoras usadas para verificar a redução de íons Fe^{3+} em função da concentração de redutor

Redutor	Massa (g)	Volume de solução (mL)	Solvente	Concentração (mg.mL^{-1})
BHT	0,1497	25,0	Água/Acetona ⁽¹⁾	5,99
Glutathiona reduzida	0,1210	25,0	Água	4,84
Extrato 6P	0,0222	10,00	Etanol	2,22
Ácido ascórbico	0,0513	25,0	Água	2,05
Cisteína	0,0510	25,0	Água	2,04
Troxol	0,0498	25,0	Água/Acetona ⁽¹⁾	1,99
Extrato 5L	0,0199	10,00	Etanol	1,99
BHA	0,0406	25,0	Água/Acetona ⁽¹⁾	1,62
Hidroquinona	0,0264	25,0	Água	1,06
Quercetina	0,0263	25,0	Água/Acetona ⁽¹⁾	1,05
Catecol	0,0249	25,0	Água	$9,96 \times 10^{-1}$
Pirogalol	0,0242	25,0	Água	$9,68 \times 10^{-1}$

(1) O redutor foi completamente dissolvido em acetona e o volume restante preenchido com água ou acetona/água, a fim de manter a solubilidade do redutor.

O seguinte procedimento foi adotado para as soluções do gradiente de concentração de cada redutor:

Procedimento. Um volume de 10 μL de solução redutora foi adicionado a uma alíquota de 10 μL da solução padrão de Fe^{3+} e a mistura reservada. Após 10 minutos, um volume de 980 μL de 1,10-fenantrolina 0,25% foi adicionado e a mistura homogeneizada. A absorbância em 508,8 nm foi mensurada após uma hora.

Os dados foram avaliados com o uso de gráficos da concentração de íons Fe^{2+} formados versus concentração de redutor.

8 CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Nesta seção estão descritos os procedimentos usados para caracterizar e avaliar os limites do método proposto.

8.1 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os “brancos” de reagentes (10 μL de solução padrão de Fe^{3+} , 10 μL de água e 980 μL de 1,10-fenantrolina 0,25%) preparados durante o processo de desenvolvimento e validação do método foram usados para estimar os limites de detecção (L.D.) e quantificação (L.Q), garantindo, assim, brancos independentes. Os limites de detecção e quantificação, expressos em μg de Fe^{3+} por mL de solução quantificada, foram estimados como $(\bar{x}_{\text{brancos}}+3.s)$ e $(\bar{x}_{\text{brancos}}+10.s)$, respectivamente (EUROCHEM, 1998; MILLER, 1984).

8.2 PRECISÃO

Os extratos vegetais 5L e 6P foram usados para avaliar as precisões de reprodutibilidade e repetibilidade em concentrações diferentes. Para os referidos extratos, foram feitas 3 soluções (tabela 5), as quais foram usadas para preparar os respectivos gradientes de concentração na faixa de 200 a 1.000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Os pontos

do gradiente de concentração produzidos a partir das soluções 5L₃ e 6P₃ foram usados para avaliar a repetibilidade (n = 3). Os demais extratos foram usados para avaliar a repetibilidade (n = 5) em uma determinada concentração.

Tabela 5: Informações das soluções usadas para verificar a precisão do método

Extrato	Massa (g)	Solução	Volume de solução (mL)	Solvente	Concentração (mg.mL ⁻¹)
5L	0,0508	5L ₁	50,0	Etanol/água (1:4)	1,02
5L	0,0499	5L ₂	50,0	Etanol/água (1:4)	$9,98 \times 10^{-1}$
5L	0,0487	5L ₃	50,0	Etanol/água (1:4)	$9,74 \times 10^{-1}$
6P	0,0533	6P ₁	50,0	Etanol/água (1:4)	1,07
6P	0,0518	6P ₂	50,0	Etanol/água (1:4)	1,04
6P	0,0451	6P ₃	50,0	Etanol/água (1:4)	$9,02 \times 10^{-1}$
4E	0,0355	4E	50,0	Etanol/água (3:7)	$7,10 \times 10^{-1}$
4I	0,0347	4I	50,0	Etanol/água (3:7)	$6,94 \times 10^{-1}$
4J	0,0338	4J	50,0	Etanol/água (3:7)	$6,76 \times 10^{-1}$
7S	0,0097	7S	10,00	Etanol/água (1:4)	$9,7 \times 10^{-1}$
8T	0,0326	8T	50,0	Etanol/água (3:7)	$6,52 \times 10^{-1}$
8W	0,0365	8W	50,0	Etanol/água (3:7)	$7,30 \times 10^{-1}$
8X	0,0376	8X	50,0	Etanol/água (3:7)	$7,52 \times 10^{-1}$

Nota: Os extratos secos foram completamente dissolvidos em etanol e o volume restante preenchido com água.

Procedimento. Um volume de 10 µL da solução de extrato na faixa de 200 a 1.000 µg.mL⁻¹ foi adicionado a uma alíquota de 10 µL da solução padrão de Fe³⁺ e a mistura reservada. Após 10 minutos, um volume de 980 µL de 1,10-fenantrolina 0,25% foi adicionado e a mistura homogeneizada. A absorbância em 508,8 nm foi mensurada após uma hora.

Os resultados foram expressos como $[Fe^{2+}]/[redutor]$ e a avaliação das precisões de repetibilidade e reprodutibilidade foi feita usando o desvio padrão relativo porcentual ($DPR\% = (s/\bar{x}) \times 100$), também conhecido como coeficiente de variação (CV).

8.3 EXATIDÃO

Por se tratar de quantificações da capacidade redutora de extratos brutos, dificilmente será conhecido o valor verdadeiro de tal medida. Para amenizar tal problema, uma estimativa da exatidão do método foi feita com os dados da seção 7.2 para os redutores de referência que apresentaram estequiometria definida e reação completa. Nesse caso, a razão estequiométrica $[Fe^{2+}]/[redutor]$ observada (coeficiente angular da relação $[Fe^{2+}]$ versus $[redutor]$ na faixa linear) foi comparada com o valor teórico.

Um outro procedimento consistiu na comparação dos resultados da seção 8.2 com os resultados obtidos da quantificação das mesmas soluções usando o oxidante radical DPPH•, freqüentemente aplicado na estimativa da capacidade antioxidante em extratos vegetais. Um volume de 10 μ L de solução de extrato vegetal foi adicionado em 990 μ L de solução metanólica de DPPH•. A mistura foi homogeneizada e guardada em local escuro. A absorbância em 517,0 nm foi mensurada após 30 minutos. O “branco” de reagentes foi feito substituindo a solução de extrato vegetal por água. O resultado foi expresso como $|\Delta ABS|$, onde $\Delta ABS =$ (absorbância do “branco” – absorbância da amostra).

Ácido ascórbico foi usado como redutor de equivalência para expressar os resultados dos dois métodos na mesma unidade. Os resultados foram convertidos

em concentração equivalente de ácido ascórbico por interpolação nas seguintes relações: absorvância do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ versus concentração de ácido ascórbico; $|\Delta\text{ABS}|$ da solução metanólica de DPPH• versus concentração de ácido ascórbico.

8.4 INTERFERENTES

A robustez do método foi avaliada para os seguintes parâmetros: foto-redução de íons Fe^{3+} por radiação ultravioleta; coordenação de íons $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ por moléculas de solvente ou substâncias orgânicas presentes na amostra; e, presença de íons.

8.4.1 Radiação ultravioleta

Foi observado, durante o desenvolvimento e validação do método, que soluções de Fe^{3+} , contendo 1,10-fenantrolina, quando expostas à iluminação por lâmpadas fluorescente (emissora de pequena quantidade de radiação ultravioleta) tornavam-se levemente vermelhas, indicando reação de foto-redução dos íons Fe^{3+} .

Para verificar o efeito da radiação ultravioleta (UV), 28 soluções de Fe^{3+} contendo 10 μL de solução padrão de Fe^{3+} $1.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 990 μL de 1,10-fenantrolina 0,25% foram preparadas, divididas em grupos de sete, e estes, submetidos a quatro ambientes diferentes: (1) ambiente iluminado por lâmpada UV com emissão máxima de 254 nm; (2) ambiente iluminado por lâmpada UV com emissão máxima de 365 nm; (3) ambiente iluminado por lâmpadas fluorescentes; (4) ambiente escuro. Nos tempos de 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 80 minutos uma solução de cada grupo foi aleatoriamente recolhida e a absorvância medida em 508,8 nm. O

efeito da radiação UV foi analisado em função da concentração de íons Fe^{2+} formados no tempo de exposição.

8.4.2 Efeito de solventes

O solvente usado para solubilizar os extratos vegetais secos pode ser um parâmetro influente no desempenho do método. Uma possível causa seria a coordenação dos íons $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ pelas moléculas do solvente, aumentando ou diminuindo a absorbância das soluções, e conseqüentemente, influenciando a quantificação de Fe^{2+} . Para verificar tal efeito, foram testados os seguintes solventes miscíveis em água: etanol, metanol, acetona, *N,N*-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol. As soluções testadas para cada solvente foram preparadas da seguinte forma:

- Solução de Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) na ausência de 1,10-fenantrolina. *Preparo*: 10 μL de solução padrão de $\text{Fe}^{3+} 1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 10 μL de solvente e 980 μL de tampão acetato após 10 minutos da adição do solvente;
- Solução de Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) na presença de 1,10-fenantrolina. *Preparo*: 10 μL de solução padrão de $\text{Fe}^{3+} 1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 10 μL de solvente e 980 μL de 1,10-fenantrolina 0,25% após 10 minutos da adição do solvente;
- Solução de Fe^{2+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) na ausência de 1,10-fenantrolina. *Preparo*: 10 μL de solução padrão de $\text{Fe}^{3+} 1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 10 μL de hidroxilamina 10%, 10 μL de solvente e 980 μL de tampão acetato após 10 minutos da adição do solvente;

- Solução de Fe^{2+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) na presença de 1,10-fenantrolina. *Preparo*: 10 μL de solução padrão de Fe^{3+} $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 10 μL de hidroxilamina 10%, 10 μL de solvente e 980 μL de 1,10-fenantrolina 0,25% após 10 minutos da adição do solvente.

As absorvâncias em 508,8 nm das soluções descritas acima foram mensuradas após uma hora. Os resultados, expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Fe^{2+} , foram comparados aos resultados obtidos com água (solvente de referência).

8.4.3 Efeito de ligantes presentes nos extratos

Substâncias contidas em extratos vegetais podem coordenar íons $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, e assim, influenciar no desempenho do método de modo semelhante aos solventes mencionados acima. A capacidade de formação de complexos corados das soluções de extrato descritas nas seções 7.2 e 8.2 foi avaliada com o seguinte procedimento:

Procedimento. Um volume de 10 μL da solução de extrato na faixa de 200 a $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi adicionado a uma alíquota de 10 μL da solução padrão de Fe^{3+} e a mistura reservada. Após 10 minutos, um volume de 980 μL de tampão acetato $\text{pH} = 4,5$ foi adicionado e a mistura homogeneizada. A absorvância em 508,8 nm foi mensurada após uma hora.

Os resultados expressos em $\text{ABS}_{508,8}$ foram comparados com a média dos brancos e com os limites de detecção e quantificação, também expressos em unidades de absorvância.

8.4.4 Efeito de íons

A maioria dos elementos essenciais absorvidos do meio externo pelas plantas está na forma iônica (tabela 6). Íons como nitrato (NO_3^-), fosfato (PO_4^{3-}) e sulfato (SO_4^{2-}) são absorvidos, ativados e usados para a síntese de substâncias bioquímicas importantes (p. ex., glutamina, ATP e ésteres de sulfato).

Tabela 6: Concentrações de elementos essenciais consideradas adequadas para crescimento e manutenção de plantas superiores

	Elemento	Símbolo	Forma disponível no ambiente ⁽¹⁾	Concentração em tecido seco	
				(mg.kg ⁻¹)	(%)
Micronutrientes	Molibdênio	Mo	MoO_4^{2-}	0,1	0,00001
	Níquel	Ni	Ni^{2+}	?	?
	Cobre	Cu	Cu^+ , Cu^{2+}	6	0,00060
	Zinco	Zn	Zn^{2+}	20	0,0020
	Manganês	Mn	Mn^{2+}	50	0,0050
	Boro	B	H_3BO_3	20	0,002
	Ferro	Fe	Fe^{3+} , Fe^{2+}	100	0,010
	Cloro	Cl	Cl^-	100	0,010
Macronutrientes	Enxofre	S	SO_4^{2-}	1.000	0,1
	Fósforo	P	H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}	2.000	0,2
	Magnésio	Mg	Mg^{2+}	2.000	0,2
	Cálcio	Ca	Ca^{2+}	5.000	0,5
	Potássio	K	K^+	10.000	1,0
	Nitrogênio	N	NO_3^- , NH_4^+	15.000	1,5
	Oxigênio	O	O_2 , H_2O , CO_2	450.000	45
	Carbono	C	CO_2	450.000	45
Hidrogênio	H	H_2O	60.000	6	

Fontes: BONNER, 1976; SALISBURY, 1992.

(1) As formas mais comuns estão em negrito.

A concentração de alguns desses íons nos tecidos vegetais pode variar entre 1 e 10 mM (BONNER, 1976); para soluções de extratos vegetais a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a concentração pode ser estimada em torno de algumas centenas de nanogramas por mililitro de solução.

Segundo Ohlweiler (1968), para a quantificação de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Fe^{2+} com 1,10-fenantrolina, são admissíveis até $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a maioria dos metais interferentes em certas condições de pH; ânions como sulfato, cloreto, pirofosfato, fosfato, oxalato e tartarato são tolerados em concentrações de 20 a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Comparando esses valores com os possíveis de serem encontrados em soluções diluídas de extratos vegetais, teoricamente, é garantida a ausência de interferência por íons de origem biológica.

Por causa das modificações no método original de quantificação de Fe^{2+} usando 1,10-fenantrolina, a influência dos íons apresentados na tabela 7 foi verificada para as seguintes condições:

- Coordenação de íons metálicos com 1,10-fenantrolina. *Preparo*: 10 μL da solução contendo o íon metálico, 170 μL de água e 820 μL de 1,10-fenantrolina 0,25%;
- Influência de íons em soluções contendo Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 1,10-fenantrolina. *Preparo*: 10 μL de solução padrão de Fe^{3+} $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 10 μL da solução contendo o íon, 160 μL de água e 820 μL de 1,10-fenantrolina 0,25%;

- Influência de íons em soluções contendo Fe^{2+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 1,10-fenantrolina. *Preparo:* 10 μL de solução padrão de Fe^{3+} $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 160 μL de hidroxilamina 10%, 10 μL da solução contendo o íon, 10 μL da solução contendo o íon e 820 μL de 1,10-fenantrolina 0,25%;
- Solução de referência contendo Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 1,10-fenantrolina. *Preparo:* 10 μL de solução padrão de Fe^{3+} $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 170 μL de água e 820 μL de 1,10-fenantrolina 0,25%;
- Solução de referência contendo Fe^{2+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 1,10-fenantrolina. *Preparo:* 10 μL de solução padrão de Fe^{3+} $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 10 μL de água, 160 μL de hidroxilamina 10% e 820 μL de 1,10-fenantrolina 0,25%.

Tabela 7: Concentração das soluções iônicas

	Íons	Concentração (mg.mL^{-1})
Cátions	Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+}	$2,00 \times 10^{-1}$
	Mg^{2+}	4,00
	Ca^{2+}	$1,00 \times 10^1$
	Na^+	$1,11 \times 10^1$
	K^+	$2,00 \times 10^1$
	NH_4^+	$3,00 \times 10^1$
Ânions	PO_4^{3-}	4,01
	SO_4^{2-}	$1,58 \times 10^1$
	Cl^-	$1,81 \times 10^1$
	NO_3^-	$3,00 \times 10^1$

As absorvâncias das soluções, feitas em triplicatas, foram mensuradas em 508,8 nm após 15 minutos da adição de 1,10-fenantrolina 0,25%. Para íons interferentes, o valor máximo tolerado foi determinado por repetição do procedimento usando soluções diluídas por um fator de 0,5 até o ponto em que não houvesse interferência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos foram reunidos no apêndice C na forma de tabelas para um melhor acompanhamento dos resultados. Durante toda a exposição dos resultados e discussão, os íons Fe^{3+} e Fe^{2+} , na ausência de 1,10-fenantrolina, receberam notação de íons livres, deixando de mencionar os complexos hexaquoferro(III) – $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ – e hexaquoferro(II) – $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ –, os complexos com os ânions Cl^- , SO_4^{2-} e $\text{H}_3\text{C-COO}^-$, inerentes ao método, bem como, os complexos com possíveis ligantes contidos no extrato vegetal. Essa simplificação é justificada pela estabilidade alta dos complexos Fe/fenantrolina, que causa a substituição dos ligantes mencionados, com exceção de ligantes mais fortes que a 1,10-fenantrolina, como, por exemplo, cianeto.

1 ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO SISTEMA FERRO/FENANTROLINA

Os espectros de absorção obtidos estão apresentados na figura 2. A solução de Fe^{2+} não absorve na faixa do visível, enquanto que a solução de Fe^{3+} , com coloração amarelo-pálido, apresentou uma absorção residual na faixa de 350-425 nm. A solução de Fe^{3+} com 1,10-fenantrolina apresentou uma intensa absorção em torno de 350 nm, diminuindo exponencialmente com o aumento do comprimento de onda. Para a solução de Fe^{2+} com 1,10-fenantrolina, a absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) foi em 508,8 nm, não havendo absorção significativa das outras soluções nesse

comprimento de onda. Existe, em torno de 393 nm, um ponto isobéstico (ponto em que substâncias diferentes têm a mesma absorção em um dado comprimento de onda) que pode ser usado para quantificar uma mistura contendo íons Fe^{3+} e Fe^{2+} .

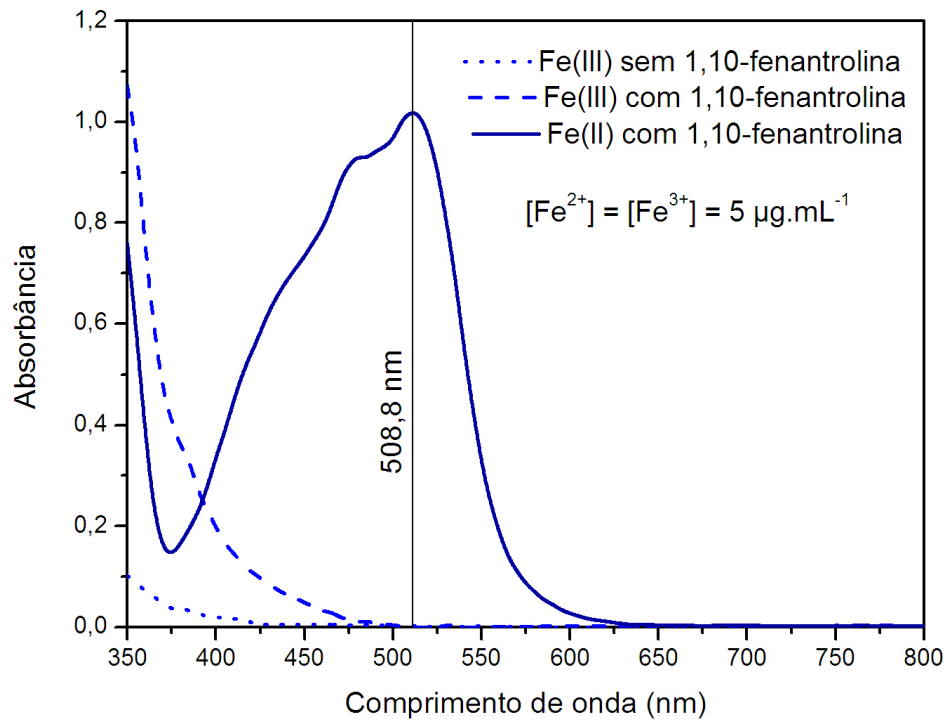


Figura 2: Espectros de absorção das soluções de Fe^{3+} , e dos complexos de Fe^{3+} e Fe^{2+} com 1,10-fenantrolina.

A formação de complexos envolvendo ferro e 1,10-fenantrolina depende das condições reacionais, principalmente do estado de oxidação dos íons ferro. Na proporção $\text{Fe}^{2+}:\text{fen}$ de 1:3 o equilíbrio favorece grandemente a formação do complexo vermelho-alaranjado $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, chamado tris-(1,10-fenantrolina)ferro(II) ou comumente ferroína ($K_{\text{eq}} \approx 10^{21}$). A coloração desse complexo é independente da acidez na faixa de pH 2 a 9 e o sistema corado é estável durante meses; em pH abaixo de 2, a coloração é tênue e se desenvolve lentamente, devido à protonação do ligante 1,10-fenantrolina. O complexo análogo tris-(1,10-fenantrolina)ferro(III), $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{3+}$, de coloração azul, não pode ser obtido pela reação direta entre Fe^{3+} e

1,10-fenantrolina, mas, por exemplo, pela oxidação do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ com ácido nítrico. Da reação direta entre Fe^{3+} e 1,10-fenantrolina resultam complexos binucleares com O^{2-} (μ -oxo) como ligante em ponte. A composição dessas espécies depende das condições da solução (proporção $\text{Fe}^{3+}:\text{fen}$, força iônica, pH). Solução aquosa de Fe^{3+} com excesso de 1,10-fenantrolina produz o complexo castanho-amarelado $[(\text{H}_2\text{O})(\text{fen})_2\text{FeOFe}(\text{fen})_2(\text{H}_2\text{O})]^{4+}$, μ -oxo-bis[aquobis(1,10-fenantrolina)ferro(III)]. Esse complexo binuclear pode ser reduzido a $[(\text{H}_2\text{O})(\text{fen})_2\text{FeOFe}(\text{fen})_2(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, que se dissocia para formar a espécie mais estável $[\text{Fe}(\text{Fen})_3]^{2+}$ (HARRIS, 1999; OHLWEILER, 1968; WALCZAK, 1998).

Íons Fe^{2+} ($3d^6$) e Fe^{3+} ($3d^5$), geralmente formam complexos com estrutura octaédrica. Pela teoria do campo cristalino (TCC), os orbitais d degenerados do íon isolado são desdobrados em dois grupos de orbitais d no momento da aproximação dos ligantes em configuração octaédrica (figura 3): e_g ($d_{x^2-y^2}$ e d_{z^2}) e t_{2g} (d_{xy} , d_{xz} e d_{yz}). Ligantes de campo forte como 1,10-fenantrolina provocam um intenso desdobramento (medido como Δ_o) e, conseqüentemente, um emparelhamento de elétrons resultando em configuração de *spin* baixo. Em complexos d^5 de *spin* baixo as transições $d-d$ são “permitidas” (maior probabilidade de ocorrência) e essas substâncias são fortemente coloridas. A intensa coloração do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ só pode ser explicada pela teoria do campo ligante (TCL), que supõe a interação dos orbitais d do metal com os orbitais do ligante. Neste caso, as transições eletrônicas envolvidas resultam da transferência de elétrons do Fe^{2+} para os orbitais π do ligante 1,10-fenantrolina (BASOLO, 1967; LEE, 1980; ORGEL, 1970).

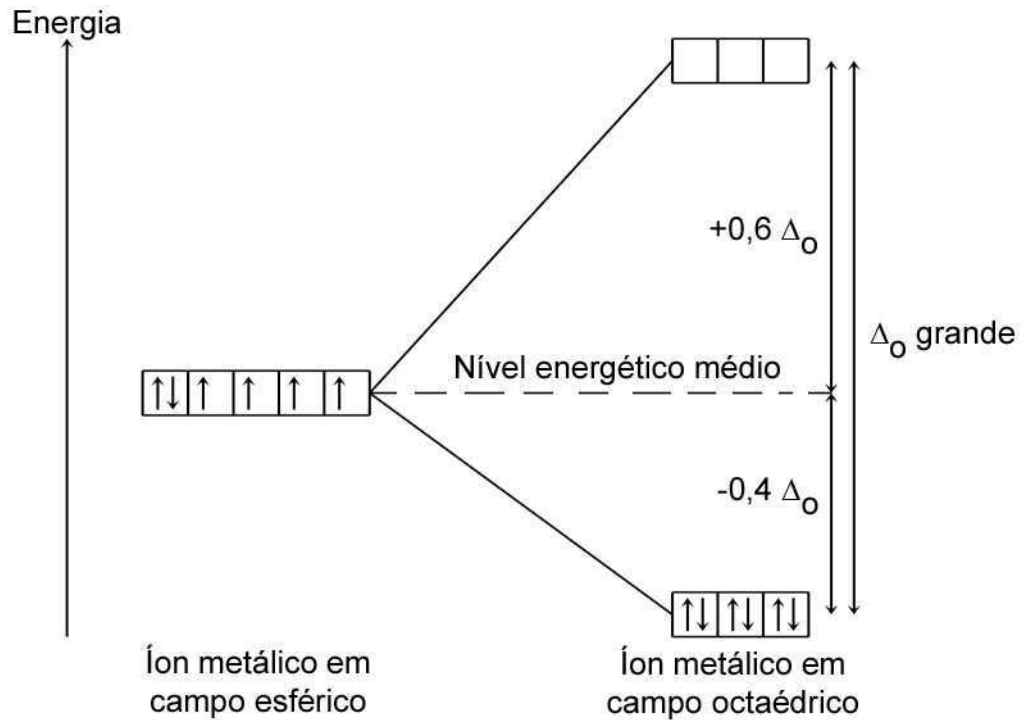


Figura 3: Diagrama dos níveis energéticos dos orbitais d em campo octaédrico para configuração d^6 de spin baixo.

Portanto, em soluções aquosas contendo Fe^{2+} , Fe^{3+} e excesso de 1,10-fenantrolina, as espécies predominantes são os complexos $[Fe(fen)_3]^{2+}$ com intensa absorvância em 508,8 nm e $[(H_2O)(fen)_2FeOFe(fen)_2(H_2O)]^{4+}$.

2 FAIXAS LINEAR E DE TRABALHO NA QUANTIFICAÇÃO DE Fe^{2+}

Os resultados dos procedimentos descritos nas seções 6.2 e 6.3 da Metodologia estão apresentados nos diagramas de dispersão das figuras 4 e 5, respectivamente. A análise de covariância (ANCOVA) para as determinações independentes do procedimento 6.3 indicou que os coeficientes angulares e lineares das retas ajustadas provieram da mesma população, ou seja, existe homogeneidade dos coeficientes angulares ($p = 0,7946$) e lineares ($p = 0,9872$). Por esse motivo, os dados foram tratados como uma única amostra (figura 5).

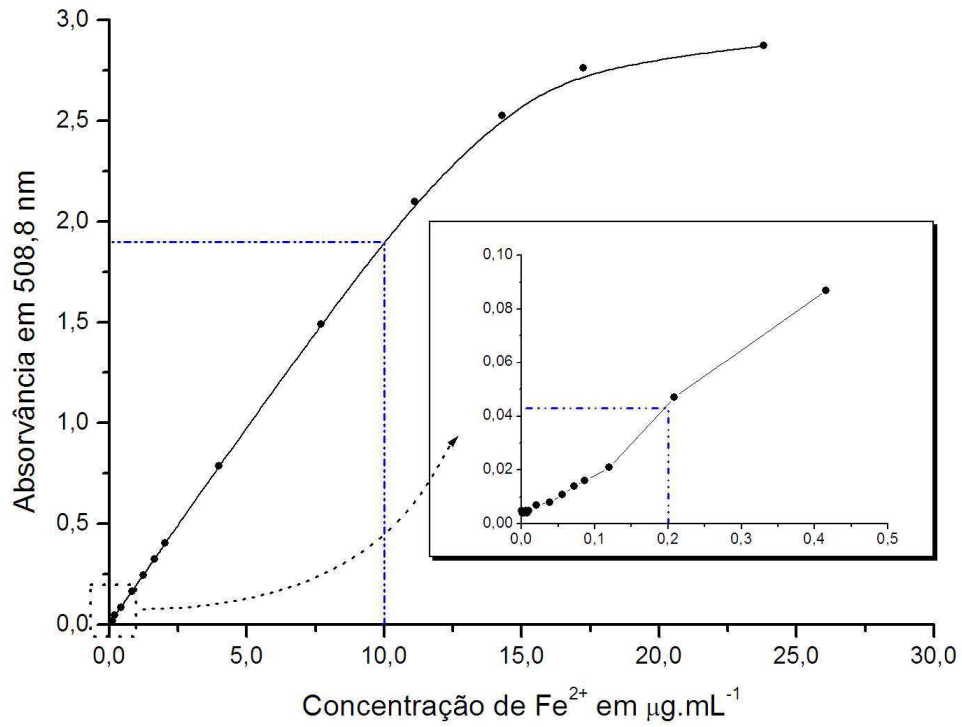


Figura 4: Estimativa visual dos limites, inferior e superior, da faixa linear para a quantificação de íons Fe²⁺.

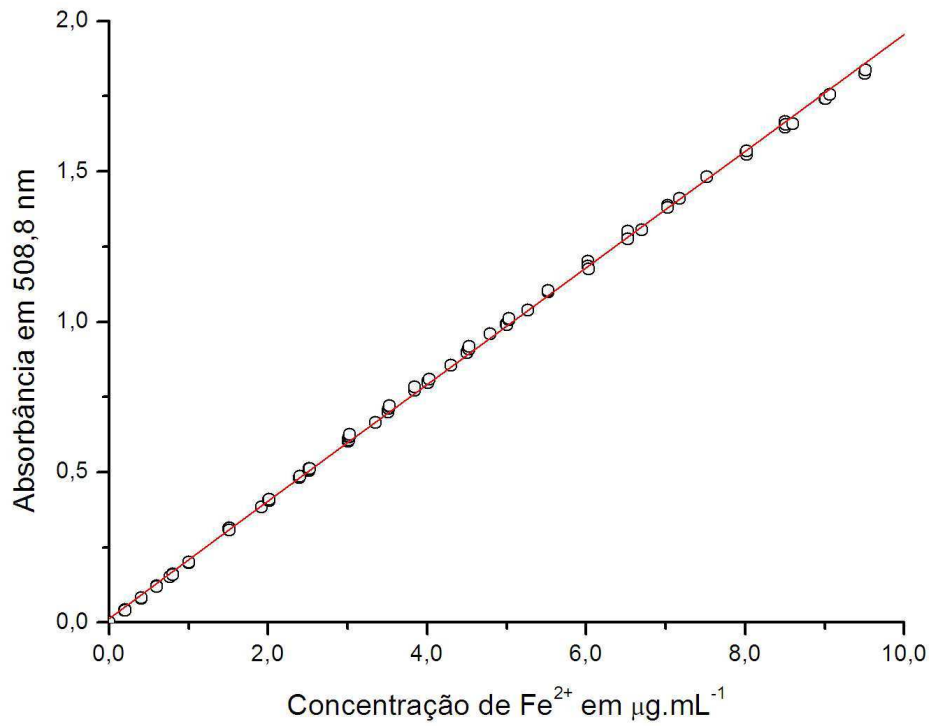


Figura 5: Regressão linear da relação entre a absorbância do complexo e a concentração de Fe²⁺ na faixa de 0 – 10 µg.mL⁻¹.

A faixa linear foi estimada visualmente entre 0,2 e 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (figura 4). Com relação às características dos pontos na faixa considerada, a dispersão dos mesmos (figura 5) nos mostra uma associação positiva (direção), um aspecto aparentemente linear (forma) e uma intensa relação entre as variáveis (força). Essa afirmação pode ser quantificada pelos resultados da regressão linear (tabela 8). Cerca de 99,9% da variação de absorvância do complexo foi explicada pela regressão linear, como mostra o valor de R^2 . A variação de absorvância por unidade de concentração de Fe^{2+} em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi de 0,194.

Tabela 8: Dados da regressão linear e análise de variância da relação absorvância do complexo versus concentração de Fe^{2+} no intervalo de 0,0 – 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Regressão linear : $Y = A + B * X$

Parâmetro	Valor	Erro	$t_{\text{calculado}}$	$p(t_{\text{cal.}} > t_{\text{tab}})$
A	0,01444	0,00229	6,2985	< 0.0001
B	0,19417	0,00048	403,30989	< 0.0001
R	R^2	R^2 ajustado	Erro padrão da regressão	N
0,99972	0,99944	0,99943	0,01279	93

Tabela ANOVA

Item	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Modelo	1	26,61114	26,61114	162658,86493
Resíduo	91	0,01489	$1,63601 \times 10^{-4}$	
Total	92	26,62603		

$$p(F_{\text{cal.}} > F_{\text{tab.}}) \rightarrow < 0.0001$$

A análise de variância (ANOVA) da regressão para o intervalo em questão forneceu um valor de F igual a 162.659, mesmo com um padrão curvilíneo da dispersão dos resíduos (figura 6). Isso significa que a variabilidade dos resíduos mostrou-se muito menor que a variabilidade da resposta e, assim, a reta ajustada pode ser usada para descrever a relação entre a absorbância do complexo e a concentração de Fe^{2+} . Não existem dúvidas de que uma regressão polinomial forneceria a melhor curva ajustada, mas a regressão linear foi adotada pela sua simplicidade operacional.

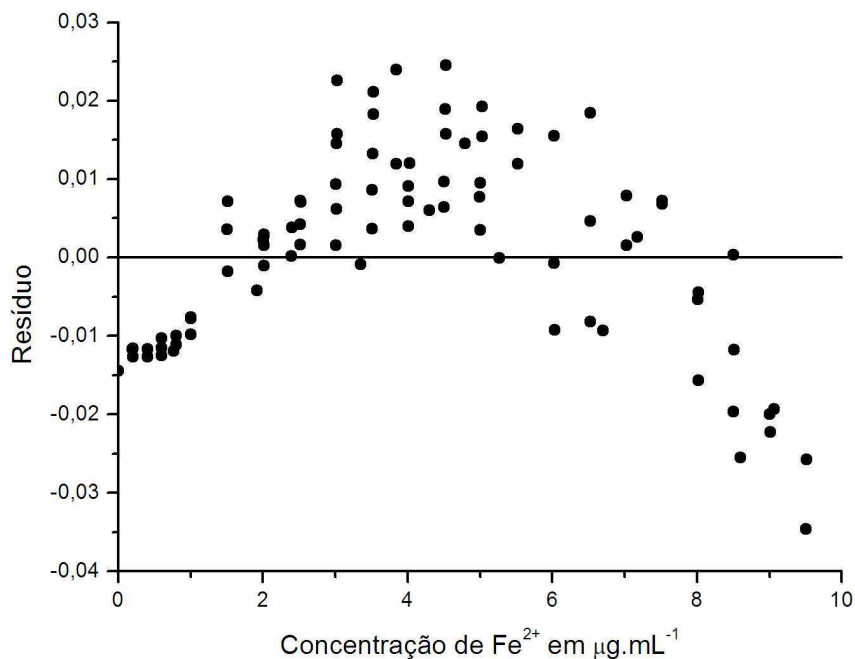


Figura 6: Dispersão dos resíduos para regressão linear na faixa de 0,0 – 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A forma da dispersão dos resíduos pode ser causada pela limitação da técnica espectrométrica. Em absorbâncias baixas, a potência radiante que atravessa a amostra é similar a potência que atravessa a referência e, conseqüentemente, a incerteza relativa é maior. Em absorbâncias altas, pouca radiação alcança o detector e a razão ruído-sinal aumenta. Por esse motivo, para determinações analíticas, as

medidas espectrofotométricas são mais confiáveis para absorvâncias na faixa de 0,4 a 0,9 unidades (OHLWEILER, 1968; HARRIS, 1999).

O uso da equação da reta ajustada no intervalo de 0,0 a 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para absorvâncias menores que 0,4 resultaria em erros relativos superiores a 5% na determinação da concentração de Fe^{2+} . Nesses casos, devem ser usados os parâmetros da regressão linear para o intervalo de 0,0 a 5,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (tabela 9).

Tabela 9: Dados da regressão linear e análise de variância da relação absorvância do complexo versus concentração de Fe^{2+} no intervalo de 0,0 – 5,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Regressão linear : $Y = A + B * X$

Parâmetro	Valor	Erro	$t_{\text{calculado}}$	$p(t_{\text{cal.}} > t_{\text{tab}})$
A	0,00263	0,00133	1,98211	0,05157
B	0,19974	0,00043	463,08761	< 0.0001

R	R^2	R^2 ajustado	Erro padrão da regressão	N
0,99984	0,99969	0,99968	0,00616	69

Tabela ANOVA

Item	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Modelo	1	8,12889	8,12889	214450,13578
Resíduo	67	0,00254	$3,79057 \times 10^{-5}$	
Total	68	8,13143		

$$p(F_{\text{cal.}} > F_{\text{tab.}}) \rightarrow < 0.0001$$

O coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do complexo $[\text{Fe}(\text{Fen})_3]^{2+}$ em $\lambda_{\text{max}} = 508,8$ nm pode ser estimado como sendo o coeficiente angular da relação entre a absorvância em 508,8 nm e a concentração do complexo em mol.L^{-1} . Considerando que 1 mol de Fe^{2+} corresponde a 1 mol do complexo, o valor encontrado para $\epsilon_{508,8}$ foi de $(1,084 \pm 0,003) \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. A concentração de Fe^{2+} em mol.L^{-1} pode ser estimada usando a relação $C = \text{ABS}/(\epsilon_{508,8} \times b)$, onde b é o comprimento do caminho ótico e ABS é a absorvância corrigida (absorvância da amostra – absorvância do branco).

Por se tratar de uma proposta de método para quantificar analitos não específicos, a inferência para a regressão tornar-se-ia um excesso estatístico desnecessário. Se não fosse o caso, a faixa de concentração deveria ser alterada para que a variância da resposta em torno da reta ajustada fosse a mesma em qualquer ponto. Essa propriedade, conhecida como homoscedasticidade, é uma das necessárias para a aplicação da inferência para regressão (BARROS NETO, 2002; MOORE, 2000).

Assim, a regressão linear por mínimos quadrados pode ser seguramente usada para descrever a relação entre a absorvância do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ e a concentração de íons Fe^{2+} nas seguintes condições:

$$\text{Absorvância entre 0,0 e 1,1: } \text{ABS} = 0,002 + 0,1997 \times [\text{Fe}^{2+}] \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{Absorvância entre 0,0 e 2,0: } \text{ABS} = 0,014 + 0,1942 \times [\text{Fe}^{2+}] \quad (\text{Eq. 3})$$

3 REDUÇÃO DE ÍONS Fe^{3+} POR SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS

As estruturas químicas das substâncias testadas estão apresentadas na figura 7. Os dados obtidos dos procedimentos descritos nas seções 7.1 e 7.2 da Metodologia estão apresentados nas figuras 10, 11 e 12, onde as concentrações de Fe^{2+} foram estimadas com o uso das equações (2) e (3).

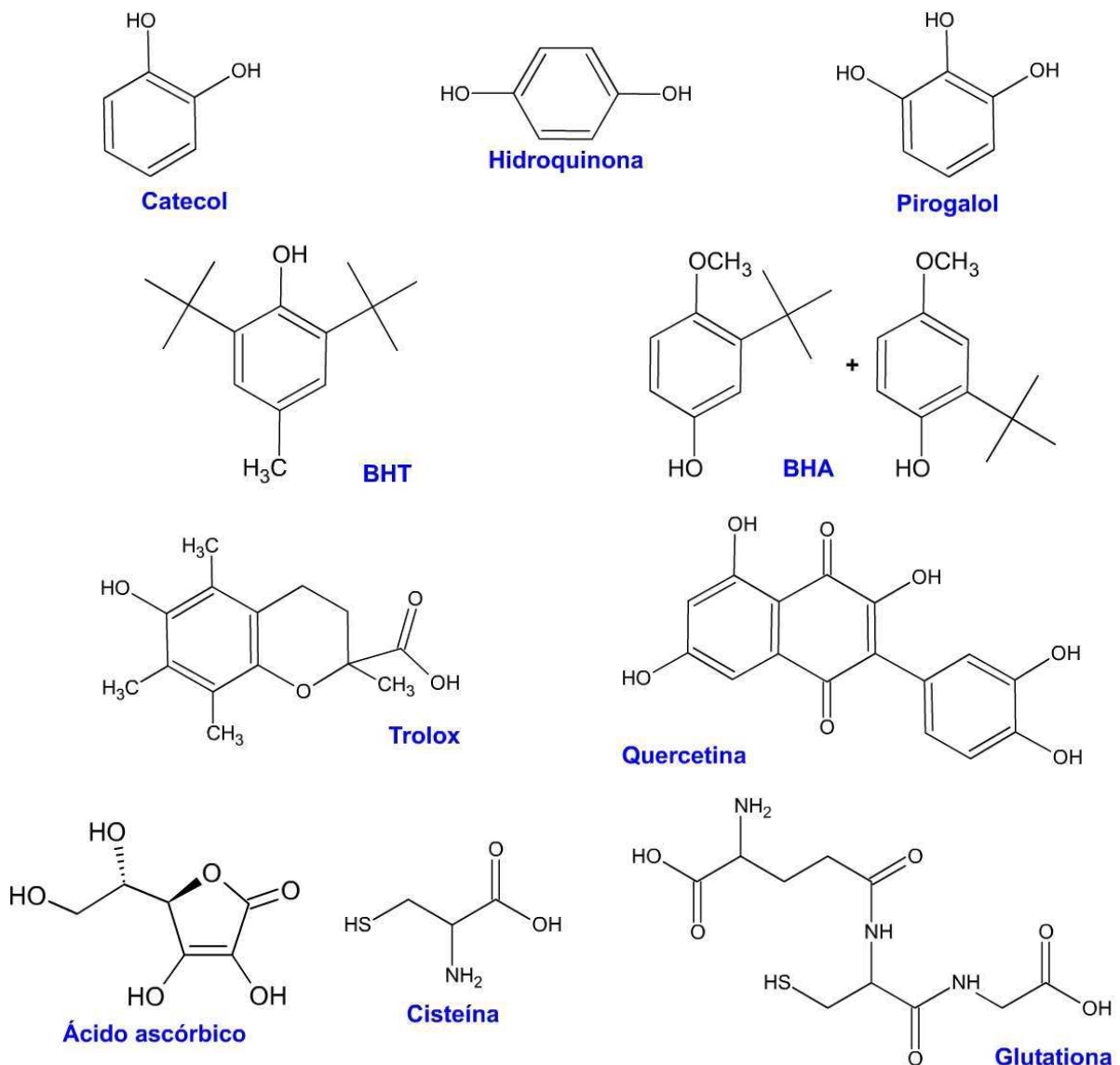


Figura 7: Estruturas químicas das substâncias orgânicas usadas como redutores de íons Fe^{3+} .

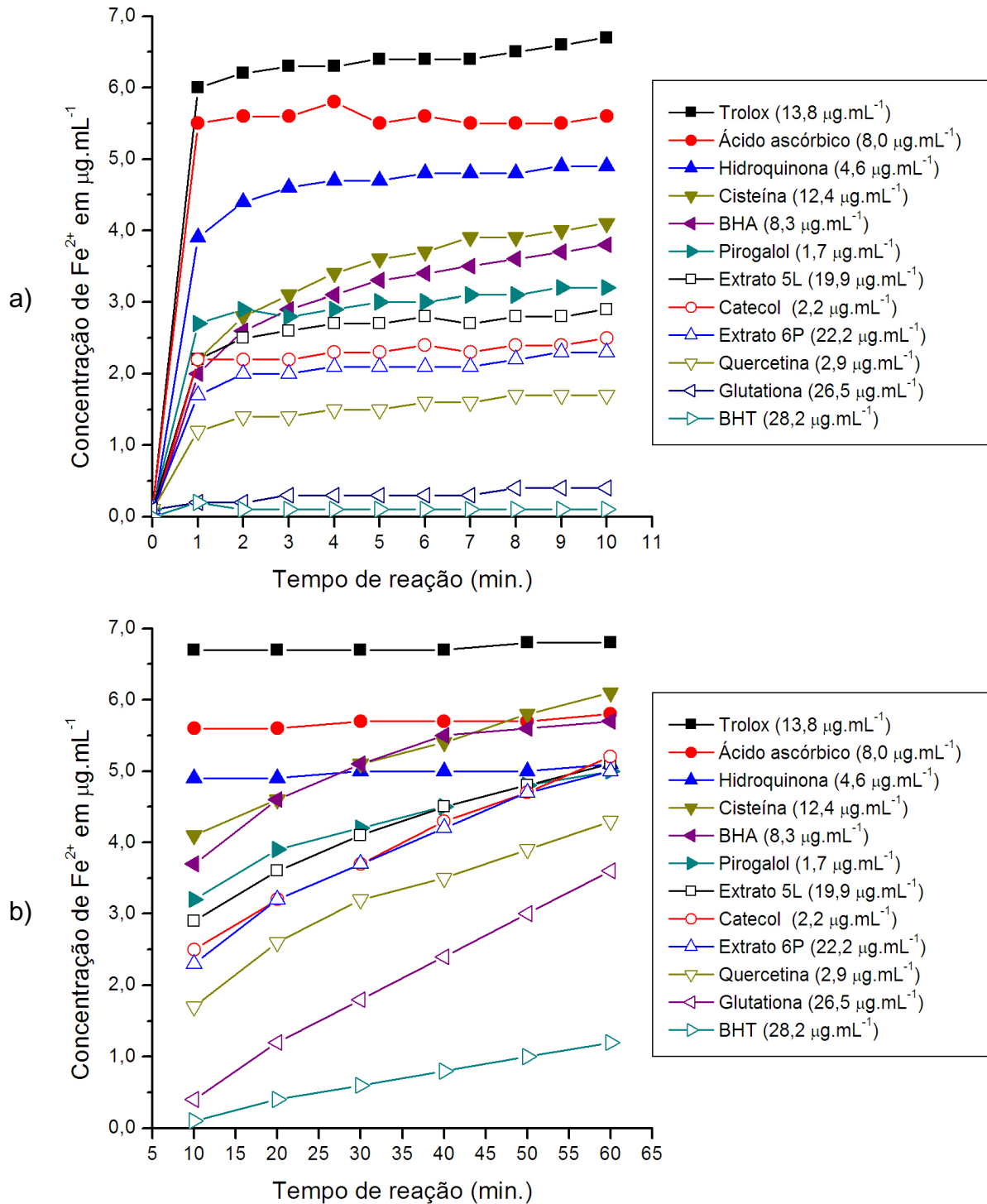


Figura 8: Redução de íons Fe^{3+} por substâncias orgânicas em função do tempo em duas etapas: a) na ausência de 1,10-fenantrolina durante os primeiros 10 minutos; b) na presença de 1,10-fenantrolina durante os 50 minutos restantes.

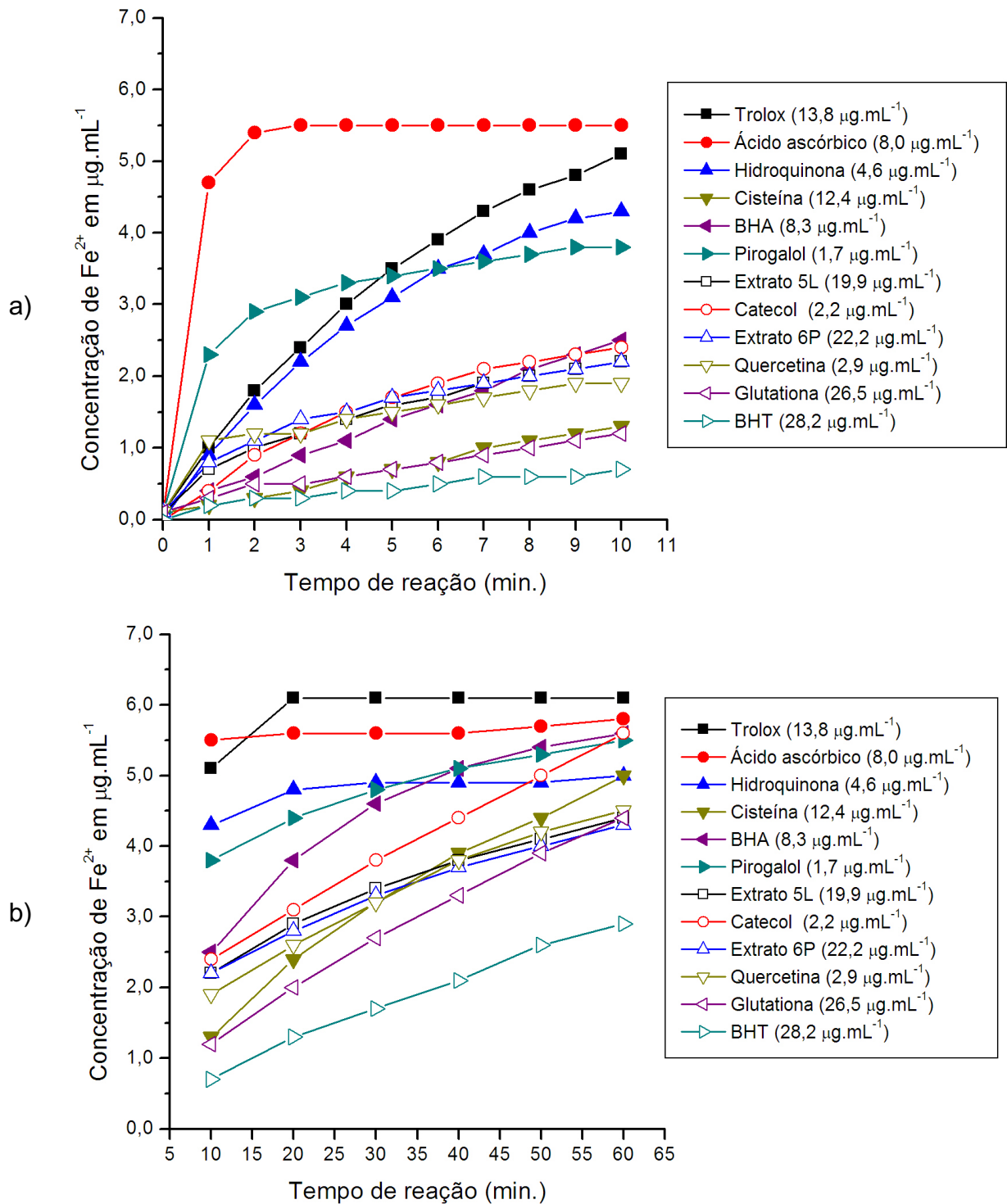


Figura 9: Redução de íons Fe^{3+} por substâncias orgânicas em função do tempo na presença de 1,10-fenantrolina: (a) durante os primeiros 10 minutos; b) durante os 50 minutos restantes.

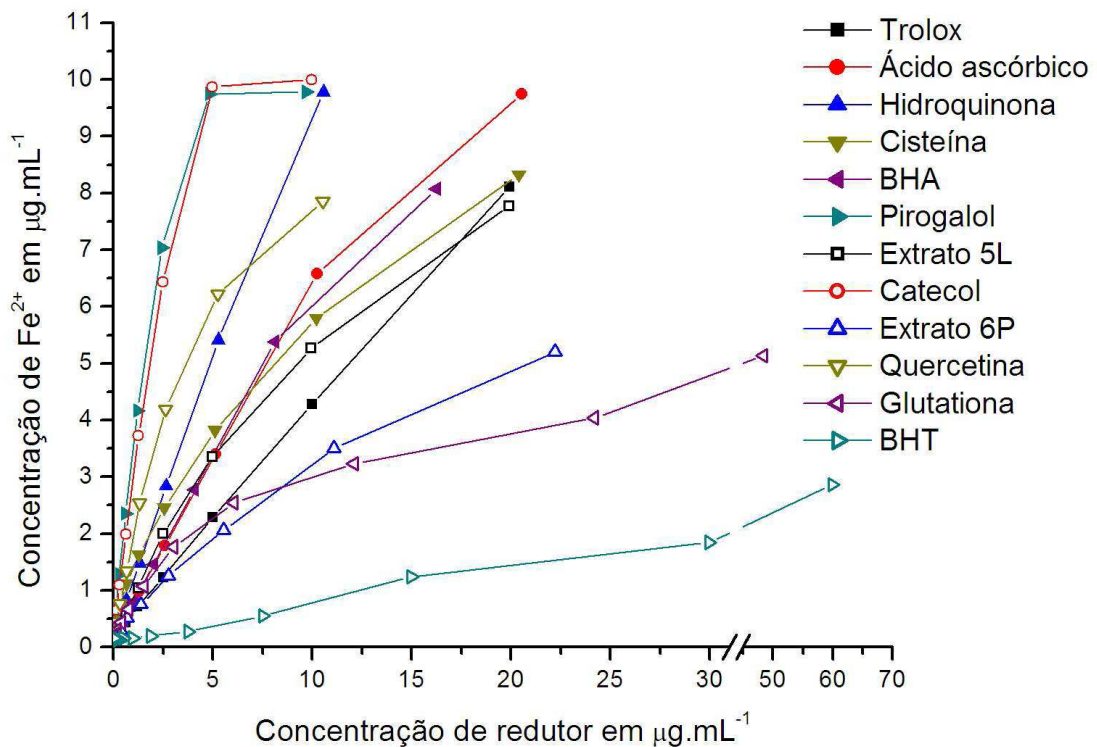


Figura 10: Redução de Fe³⁺ em função da concentração de redutor.

As reações de oxi-redução entre íons Fe³⁺ e as substâncias testadas na ausência de 1,10-fenantrolina (figura 8a) foram conduzidas em meio ácido (HCl 0,5%), uma vez que a solução padrão de Fe³⁺ contém HCl 1% e a diluição dos reagentes foi de 1:1. Essa característica pode contribuir favoravelmente para as reações de oxi-redução dependentes de íons H⁺.

As substâncias glutaciona e BHT não apresentaram significativa capacidade para reduzir íons Fe³⁺ na ausência de 1,10-fenantrolina. Pode-se dizer que os obstáculos à transferência de elétrons envolvendo complexos metálicos estão relacionados, em parte, com a possibilidade de acesso e energia de ativação. As reações de oxi-redução envolvendo complexos metálicos em solução ocorrerão somente quando os reagentes estiverem em contato estereoquímico adequado, por coordenação direta ou através de sistema conjugado. Além disso, as reações não

devem produzir grande variação na esfera de coordenação do metal (BASOLO, 1967; ORGEL, 1970). Portanto, a hidroxila fenólica do BHT não se coordenaria com o metal por conta do impedimento estérico dos grupos *terc*-butílicos (figura 7), e assim, a transferência de elétrons torna-se praticamente improvável. No caso da glutationa, existem vários pontos de coordenação com estrutura semelhante ao ligante etilenodiamina, os quais coordenar-se-iam com os íons Fe^{3+} , desfavorecendo o contato direto entre os íons Fe^{3+} e o grupo redutor sulfidril (-SH).

As reações com as demais substâncias apresentaram conversões entre 5,9 e 1,1 μg de Fe^{3+} no primeiro minuto e, rapidamente, alcançaram o limite de 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ durante o tempo restante. Para as reações com BHA e cisteína, a taxa de conversão limite foi alcançada após 5 minutos. As misturas reacionais contendo Fe^{3+} e as substâncias catecol, pirogalol, quercetina, e cisteína apresentaram coloração e desprendimento de calor. Esse fato reforça o argumento de que a transferência de elétrons é facilitada quando o reagente coordena o íon metálico.

A adição de 1,10-fenantrolina após 10 minutos de reação entre íons Fe^{3+} e redutor (figura 8b) não alterou a quantidade de íons Fe^{2+} para as substâncias Trolox, ácido ascórbico e hidroquinona nos 50 minutos restantes. Ou seja, essas reações são rápidas e completas na presença de íons Fe^{3+} . Para as outras substâncias, houve um aumento na taxa de conversão entre 0,3 e 0,9 $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ e, após 50 minutos, as mesmas apresentaram valores entre 0,1 e 0,6 $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$. Os extratos 5L e 6P tiveram resultados diferentes na primeira etapa, mas ao final da reação, a quantidade de Fe^{2+} produzida foi semelhante. Nesses casos, a presença de 1,10-fenantrolina contribui para a redução de Fe^{3+} , até mesmo para as substâncias BHT e

glutaciona. Uma possível explicação seria o uso do sistema conjugado do ligante 1,10-fenantrolina como intermediador na transferência de elétrons.

Uma outra alternativa seria o mecanismo proposto por Bhattacharyya (2007) para explicar a oxidação do ácido ascórbico pelo complexo binuclear $[(\text{H}_2\text{O})(\text{fen})_2\text{FeOFe}(\text{fen})_2(\text{H}_2\text{O})]^{4+}$ (figura 11). Nessa proposta, o ácido ascórbico substitui uma molécula de água da primeira esfera de coordenação de um dos núcleos metálicos. Em seguida, outra molécula do redutor é oxidada pelo Fe(III) não substituído, usando um grupo ligante como ponte para a transferência de elétrons. Por fim, o ácido ascórbico ligado ao Fe^{3+} é oxidado e o complexo é decomposto. Segundo Bhattacharyya, os complexos binucleares de ferro com o grupo ponte O^{2-} têm recebido atenção da área bioinorgânica por servirem de modelos para sistemas biológicos como hemeritinas (proteínas de transporte de oxigênio em organismos marinhos), metil-monoxigenases (hidroxilação de alcanos) e ribonucleotídeo redutases (síntese de DNA).

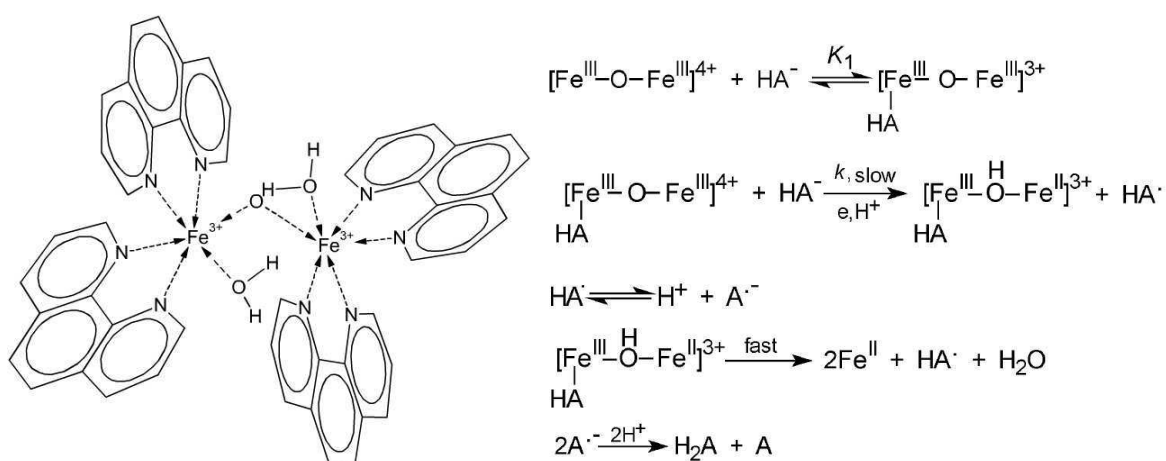


Figura 11: Estrutura do complexo binuclear μ -oxo-bis[aquobis(1,10-fenantrolina)ferro(III)] e proposta de mecanismo para oxidação de ácido ascórbico (HA).

O resultado da reação de oxi-redução conduzida inicialmente na presença de 1,10-fenantrolina (figura 9) difere do obtido na reação em duas etapas para algumas substâncias. A formação de Fe^{2+} nas diferentes condições reacionais para os tempos de 10 e 60 minutos estão apresentados na figura 14. A oxidação do ácido ascórbico não foi influenciada pelas condições testadas. No caso das substâncias hidroquinona e BHA, a oxidação foi mais rápida na ausência de 1,10-fenantrolina nos 10 primeiros minutos. Porém, a quantidade de íons Fe^{2+} em 60 minutos de reação foi apenas 2% maior que da reação em etapa única. Trolox, cisteína e os extratos 5L e 6P reduziram mais íons Fe^{3+} nas condições da reação em duas etapas. Por outro lado, as substâncias pirogallol, BHT, glutathione e quercetina reduziram mais íons Fe^{3+} quando o mesmo se encontrou coordenado com o ligante 1,10-fenantrolina.

A redução de Fe^{3+} em função da concentração de redutor (figura 10), usando o procedimento em duas etapas, apresentou três grupos de substâncias: (1) substâncias que em pequena concentração reduzem uma quantidade grande de íons Fe^{3+} , por exemplo, pirogallol, catecol, quercetina e hidroquinona; (2) substância que, em concentrações altas, reduzem quantidades pequenas de Fe^{3+} , como por exemplo, o BHT; (3) substâncias com razão $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{redutor}]$ entre 0,5 e 1,0.

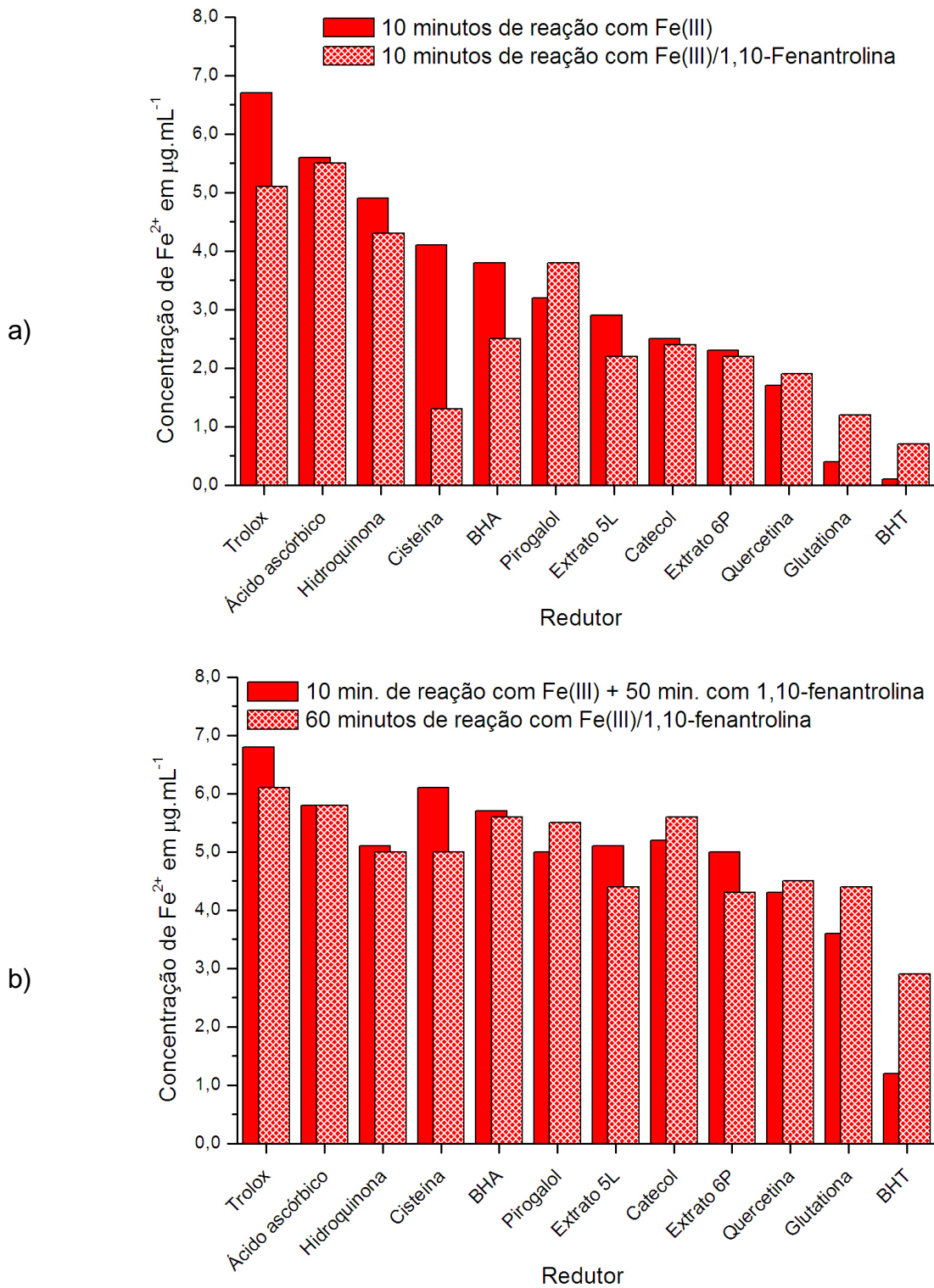


Figura 12: Formação de Fe^{2+} em diferentes condições reacionais: a) 10 minutos; b) 60 minutos.

A tabela 10 resume os parâmetros da reta ajustada na faixa linear de cada substância. Os valores de R^2 indicam que as regressões lineares descrevem cerca de 99% dos casos para cada faixa determinada. Os coeficientes lineares em torno de 0,2 μg de Fe^{2+} dão uma perspectiva do limite de detecção do método proposto, o qual está discutido com detalhes mais adiante (seção 4). Pirogalol, catecol, quercetina e cisteína apresentaram capacidade redutora elevada em estreita faixa de concentração. Em contraste, o BHT é quase inerte à oxidação por Fe^{3+} nas condições testadas (0,06 μg de Fe^{2+} produzido por 1 μg de redutor). É provável que o impedimento espacial da hidroxila fenólica pelos grupos *terc*-butílicos diminua a probabilidade de interação com o íon metálico. As demais substâncias apresentaram razoável capacidade redutora em amplas faixas de concentração.

Tabela 10: Parâmetros da regressão linear entre concentração de Fe^{2+} e concentração de redutor

Redutor	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Coef. Angular ($\mu\text{g}_{\text{Fe(II)}}\cdot\mu\text{g}^{-1}_{\text{redutor}}$)	Coef. Linear ($\mu\text{g}_{\text{Fe(II)}}$)	R^2	N
Pirogalol	0,04 – 0,61	3,62	0,16	0,99889	5
Catecol	0,08 – 1,25	2,82	0,21	0,99976	5
Quercetina	0,08 – 1,32	1,81	0,16	0,99973	5
Cisteína	0,08 – 0,64	1,41	0,23	0,99290	4
Hidroquinona	0,2 – 5,3	0,999	0,16	0,99986	6
Extrato 5L	0,2 – 2,5	0,735	0,16	0,99945	5
BHA	0,3 – 8,1	0,644	0,153	0,99994	6
Ácido ascórbico	0,3 – 10,3	0,626	0,170	0,99997	6
Glutationa	0,2 – 1,51	0,58	0,21	0,99716	4
Trolox	0,3 – 19,9	0,398	0,23	0,99967	7
Extrato 6P	0,7 – 11,1	0,29	0,39	0,99632	5
BHT	1,9 – 29,9	0,059	0,08	0,99927	4

Multiplicando os coeficientes angulares da tabela 10 por $MM_{\text{reductor}}/MM_{\text{Fe}}$ obtêm-se a razão molar da reação (tabela 11), onde MM_{reductor} e MM_{Fe} são as massas molares do reductor e do Fe, respectivamente.

Tabela 11: Razão molar para a reação em duas etapas em determinada faixa de concentração do reductor

Redutor	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	$n_{\text{Fe}} / n_{\text{reductor}}$
BHT	1,9 – 29,9	0,2
Trolox	0,3 – 19,9	1,8
Hidroquinona	0,2 – 5,3	2,0
BHA	0,3 – 8,1	2,1
Ácido ascórbico	0,3 – 10,3	2,1
Cisteína	0,08 – 0,64	3,1
Glutationa	0,2 – 1,51	3,2
Catecol	0,08 – 1,25	5,6
Pirogalol	0,04 – 0,61	8,2
Quercetina	0,08 – 1,32	10,9

Na condição de equilíbrio essa razão expressa a estequiometria da reação, em caso contrário, apenas a quantidade Fe^{2+} formada na presença de uma determinada quantidade de reductor em um tempo t de reação. De acordo com os resultados apresentados na figura 8b, apenas as reações com hidroquinona, ácido ascórbico, BHA e Trolox atingiram a condição de equilíbrio no intervalo de 60 minutos. As razões molares para essas reações foram de aproximadamente 2 moles de Fe^{2+} formado por 1 mol de reductor, concordando com os valores teóricos. Os valores esperados para cisteína e glutaciona seriam de 1 mol de Fe^{2+} formado por 1 mol de reductor. Os valores em torno de 3 indicam oxidação além do grupo sulfidril

(-SH), talvez do grupo amino, semelhante ao que ocorre com aminoácidos na presença de ácido nitroso (CONN, 1980; ROBERTS, 1977). Os valores das razões molares para as reações com pirogallol, catecol e quercetina indicam graus de oxidação elevados. Essas substâncias têm, em comum, hidroxilas fenólicas em configuração *orto* e *meta*, o que permitiria a formação de semiquinonas radiculares e posterior dimerização (figura 13). Os dímeros formados poderiam ser oxidados para formar sistemas conjugados (ROBERTS, 1977).

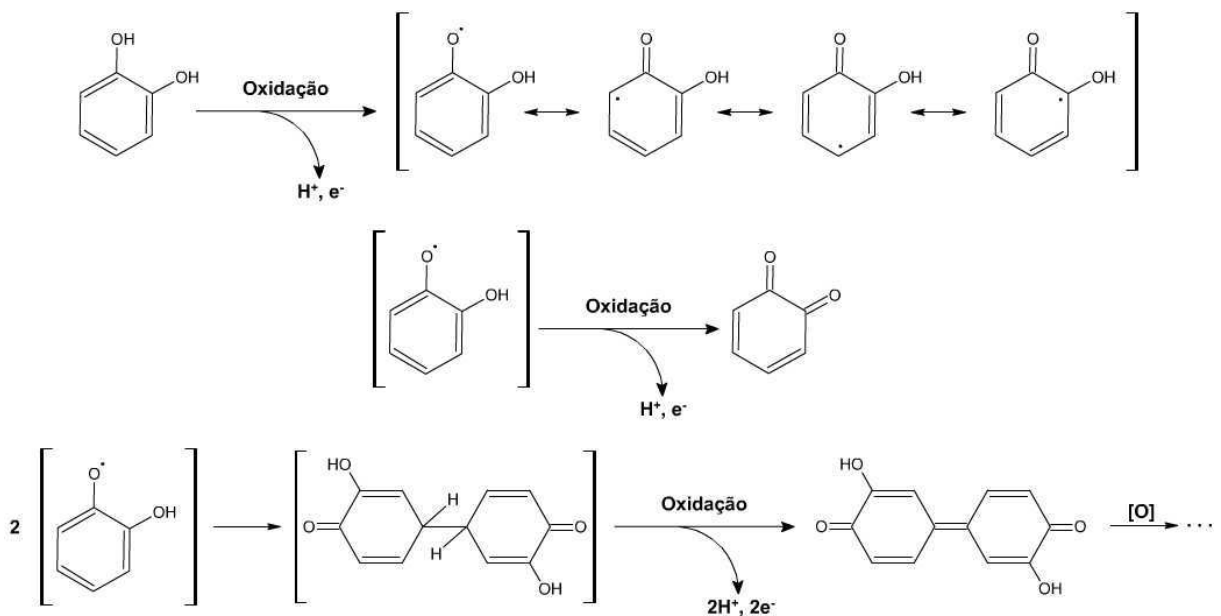


Figura 13: Oxidação e dimerização de fenóis.

De um modo geral, a reação conduzida em duas etapas (10 minutos de oxidação com Fe^{3+} + 50 minutos de oxidação na presença de 1,10-fenantrolina) mostrou-se adequada para a maioria das substâncias testadas. A primeira etapa envolve o contato direto entre a substância orgânica e o íon Fe^{3+} , enquanto que na segunda etapa o contato pode ser direto, pela substituição do ligante aquo do complexo binuclear, e/ou indireto, com o ligante 1,10-fenantrolina como intermediário na transferência de elétrons. Apenas hidroquinona, Trolox e ácido ascórbico

reagiram completamente, indicando reação de oxi-redução rápida. A condição de equilíbrio para as outras substâncias, incluindo os extratos, pode ser obtida em menor tempo com a diminuição da concentração do redutor. Um maior tempo de oxidação na presença de 1,10-fenantrolina também pode ser adotado, mas a quantificação será mais demorada.

4 LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção de um analito pode ser quimicamente definido como a concentração que produz um sinal instrumental significativamente diferente do branco ou linha de base. Esse limite é calculado usando a seguinte equação:

$$\text{L.D.} = (\text{concentração média dos brancos}) + 3 \cdot (\text{desvio padrão}) \quad (\text{Eq. 4})$$

O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito que pode ser determinado com aceitável precisão e exatidão, e numericamente representado por:

$$\text{L.Q.} = (\text{concentração média dos brancos}) + 10 \cdot (\text{desvio padrão}) \quad (\text{Eq. 5})$$

Um outro termo usado é o limite de decisão, que pode ser definido como a concentração do analito em que concentrações menores pertencem a distribuição normal do valor do branco com probabilidade β . Esse limite pode ser calculado por:

$$\text{L.d.} = x + z \cdot s \quad (\text{Eq. 6})$$

onde z é o valor da concentração do branco padronizado com probabilidade β (obtido de uma tabela de probabilidades normais padronizadas), x é a concentração média dos brancos e s é o desvio padrão.

Para estabelecer os limites de detecção e quantificação foram usados 51 brancos independentes preparados durante o processo de validação. As concentrações de Fe^{2+} foram estimadas com o uso da equação (2) e os dados estão resumidos na figura 14.

Média e desvio padrão das absorvâncias = $0,032 \pm 0,003$ ($n = 51$)
 Concentração média de Fe^{2+} = $0,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$
 Desvio padrão estimado = $0,02 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($n = 51$)
 Limite de decisão (L.d.) = $0,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\beta = 0,95 \rightarrow z = 1,645$)
 Limite de detecção (L.D.) = $0,20 \mu\text{g.mL}^{-1}$
 Limite de quantificação (L.Q.) = $0,31 \mu\text{g.mL}^{-1}$

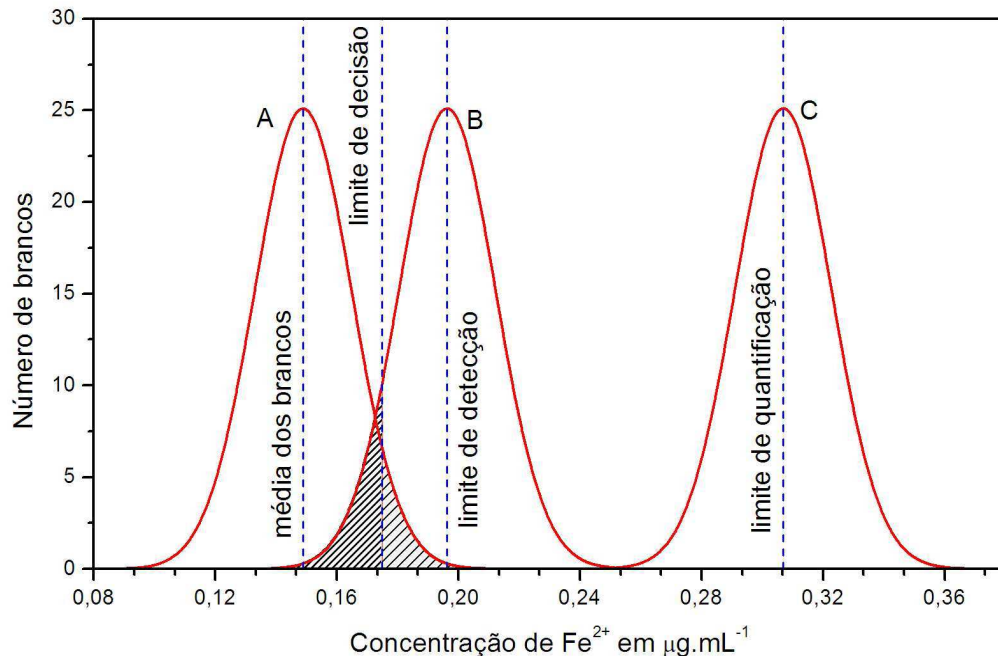


Figura 14: Limites de detecção e quantificação do método expressos em unidades de concentração de Fe^{2+} . As curvas A, B e C são curvas de distribuição normal. A área preenchida mais densa equivale a 9,0% e a menos densa equivale a 5%.

Para facilitar a referência às distribuições normais com média μ e desvio padrão σ , estas foram denotadas abreviadamente por $N(\mu;\sigma)$. A curva A é a distribuição normal da concentração dos brancos $N(0,149;0,016)$. O limite de decisão (L.d.) calculado para $\beta = 0,95$ é de $0,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Isso significa que uma concentração menor que L.d. faz parte da distribuição normal do branco com probabilidade de 95%. A curva B é a distribuição normal $N(0,196;0,016)$ do limite de detecção (L.D.). A área sob a curva B à esquerda de L.d. indica que somente 9,0% das observações do limite de detecção são significativamente iguais ao branco. Como o valor de L.D. = $0,196 \mu\text{g.mL}^{-1}$ praticamente não corta a curva A, este é uma boa estimativa da menor concentração de Fe^{2+} detectada nas condições do método. Distribuições normais com média menor que o limite de quantificação (L.Q.) e desvio padrão $0,016 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentam intercessões com as curvas B e A, sendo L.Q. = $0,307 \mu\text{g.mL}^{-1}$ uma boa estimativa para a menor concentração de Fe^{2+} que pode ser quantificada nas condições do método proposto.

5 PRECISÃO E EXATIDÃO

A precisão de reprodutibilidade para o método proposto considerou a variabilidade desde a pesagem dos extratos até a quantificação de Fe^{2+} (tabela 12). As concentrações dos extratos estão na forma de intervalos por causa da variação na massa medida de cada amostra.

Aparentemente, não existe relação entre a reprodutibilidade e a concentração dos extratos testados. Sendo assim, a reprodutibilidade expressa como desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) variou entre 0,5% a 4,9%. Analisando o quociente $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{Redutor}]$ em função da concentração, observa-

se que as soluções em menor concentração apresentaram maior capacidade redutora.

Tabela 12: Reprodutibilidade do método para diferentes concentrações de extrato

Extrato	Concentração	$[\text{Fe}^{2+}]/[\text{Redutor}]$ ($\mu\text{g}_{\text{Fe(II)}} \cdot \mu\text{g}^{-1}_{\text{redutor}}$)	CV (%)	N
5L	1,99 ± 0,04	0,63 ± 0,01	2,3	3
	2,99 ± 0,06	0,60 ± 0,02	3,1	3
	3,98 ± 0,08	0,58 ± 0,02	3,9	3
	4,98 ± 0,11	0,56 ± 0,01	2,4	3
	9,96 ± 0,21	0,49 ± 0,01	2,0	3
6P	2,10 ± 0,04	0,34 ± 0,02	4,9	2
	3,15 ± 0,06	0,32 ± 0,01	2,9	2
	4,20 ± 0,08	0,304 ± 0,001	0,5	2
	5,26 ± 0,11	0,290 ± 0,003	1,0	2
	10,5 ± 0,2	0,253 ± 0,002	1,0	2

Nota: os intervalos estão representados na forma (média ± desvio padrão)

A avaliação da precisão de repetibilidade considerou em maior grau a variabilidade das últimas alíquotas do método. Os resultados apresentados na tabela 13 mostram que a repetibilidade expressa como CV variou de 0,5% a 3,3%. Esses valores foram semelhantes à reprodutibilidade. Portanto, pode-se dizer que a variabilidade das medidas é devida à etapa final do procedimento, principalmente das alíquotas das soluções de extrato. Solventes como acetona, etanol e metanol apresentam baixa tensão superficial, podendo, assim, causar diferenças nos volumes de alíquotas sucessivas. A precisão das medidas pode ser melhorada diminuindo, quando possível, a quantidade de solvente orgânico para solubilizar o extrato.

Tabela 13: Repetibilidade do método para diferentes concentrações de extrato

Extrato	Concentração	$[\text{Fe}^{2+}]/[\text{Redutor}]^{(1)}$ ($\mu\text{g}_{\text{Fe(II)}} \cdot \mu\text{g}^{-1}_{\text{reductor}}$)	CV (%)	N
4E	7,10	$0,205 \pm 0,003$	1,2	5
4I	6,94	$0,119 \pm 0,001$	1,2	5
4J	6,76	< L.Q.	-	5
5L	1,95	$0,66 \pm 0,02$	2,6	3
	2,92	$0,62 \pm 0,02$	3,2	3
	3,90	$0,609 \pm 0,008$	1,3	3
	4,87	$0,579 \pm 0,008$	1,3	3
	9,74	$0,501 \pm 0,005$	1,1	3
6P	2,13	$0,36 \pm 0,01$	3,3	3
	3,20	$0,33 \pm 0,01$	2,2	3
	4,26	$0,309 \pm 0,005$	1,5	3
	5,33	$0,296 \pm 0,003$	1,1	3
	10,7	$0,250 \pm 0,001$	0,5	3
7S	9,70	$0,248 \pm 0,005$	2,0	5
8T	6,52	$0,096 \pm 0,002$	2,2	5
8W	7,30	$0,0886 \pm 0,0006$	0,6	5
8X	7,52	$0,105 \pm 0,002$	2,0	5

(1) média \pm desvio padrão

Por se tratar de quantificações da capacidade redutora de extratos brutos, dificilmente será conhecido o valor verdadeiro de tal medida. Uma estimativa da exatidão do método foi feita com os dados da seção 7.2 da Metodologia para os redutores de referência que apresentaram estequiometria definida e reação completa. Os valores dos quocientes $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{reductor}]$ observados (tabela 14) diferiram dos valores teóricos por menos de 5%, para mais ou para menos.

Tabela 14: Discrepâncias do método com o oxidante Fe³⁺

Redutor	[Fe ²⁺]/[Redutor] ($\mu\text{g}_{\text{Fe(II)}} \cdot \mu\text{g}^{-1}_{\text{redutor}}$)		Discrepância (%)
	teórico	Observado	
Ácido ascórbico	0,634	0,626	-1,3
Hidroquinona	1,014	0,999	-1,5
BHA	0,620	0,644	3,9

Não faz sentido falar na capacidade redutora dos extratos sem relacionar com o oxidante usado. Portanto, a capacidade redutora vai depender do potencial eletroquímico do oxidante e do mecanismo reacional. O reagente DPPH• foi usado como oxidante alternativo ao Fe³⁺ por ser amplamente utilizado na estimativa da capacidade antioxidante em extratos vegetais (LIU, 2007; LUIS, 2006; MOLYNEUX, 2004). Os resultados apresentados na tabela 15 demonstram que o método proposto estima uma maior capacidade redutora quando comparado ao método usando DPPH•. O valor negativo estimado para o extrato 8T indica a presença de substâncias capazes de oxidar o reagente DPPH•. O extrato 4J foi mantido para a confirmação da baixa capacidade redutora, uma vez que a concentração de Fe²⁺ medida foi menor que o L.Q.

Portanto, pode-se dizer que o método proposto tem precisão aceitável, além de estimativas melhores para a capacidade redutora dos extratos quando comparadas com as estimativas obtidas pelo método usando DPPH•. O procedimento experimental estabelecido na seção 8.2 da Metodologia mostrou-se adequado para a quantificação da capacidade redutora de extratos vegetais.

Tabela 15: Comparação da capacidade redutora dos extratos usando os oxidantes Fe^{3+} e DPPH•

Extrato	Concentração	Capacidade redutora ⁽¹⁾ expressa como concentração equivalente de ácido ascórbico ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		Diferença ⁽²⁾
		Método com Fe^{3+}	Método com DPPH•	
4E	7,10	2,33 ± 0,03	2,35 ± 0,04	0,02
4I	6,94	1,33 ± 0,02	0,441 ± 0,009	-0,89
4J	6,76	0,182 ± 0,009	0,16 ± 0,01	-0,02
5L	4,87	4,50 ± 0,06	3,50 ± 0,01	-1,01
6P	5,33	2,54 ± 0,03	1,50 ± 0,06	-1,04
7S	9,70	3,82 ± 0,08	3,31 ± 0,09	-0,51
8T	6,52	0,99 ± 0,02	-0,07 ± 0,01	-1,05
8W	7,30	1,013 ± 0,007	0,08 ± 0,01	-0,94
8X	7,52	1,18 ± 0,03	0,12 ± 0,01	-1,06

(1) média ± desvio padrão; o número de amostras (N) é o mesmo da tabela 13;
 (2) média_{DPPH} – média_{Fe}.

6 EFEITO DA RADIAÇÃO UV

Com base na figura 15, pode-se dizer que radiação UV é responsável pela foto-redução do Fe^{3+} para ambos os comprimentos de onda testados. Após 80 minutos, praticamente todo o Fe^{3+} foi reduzido à Fe^{2+} .

Segundo Basolo (1967), complexos metálicos com intensa absorção na faixa do UV podem ter elétrons do ligante transferidos para o metal quando excitados. O espectro de absorção da mistura contendo Fe^{3+} e 1,10-fenantrolina, apresentado na seção 1 (figura 2), mostra uma cauda da banda de absorção na faixa do UV. Com isso, é possível que os ligantes 1,10-fenantrolina e μ -oxo (O^{2-}) possam estar envolvidos na foto-redução dos íon Fe^{3+} .

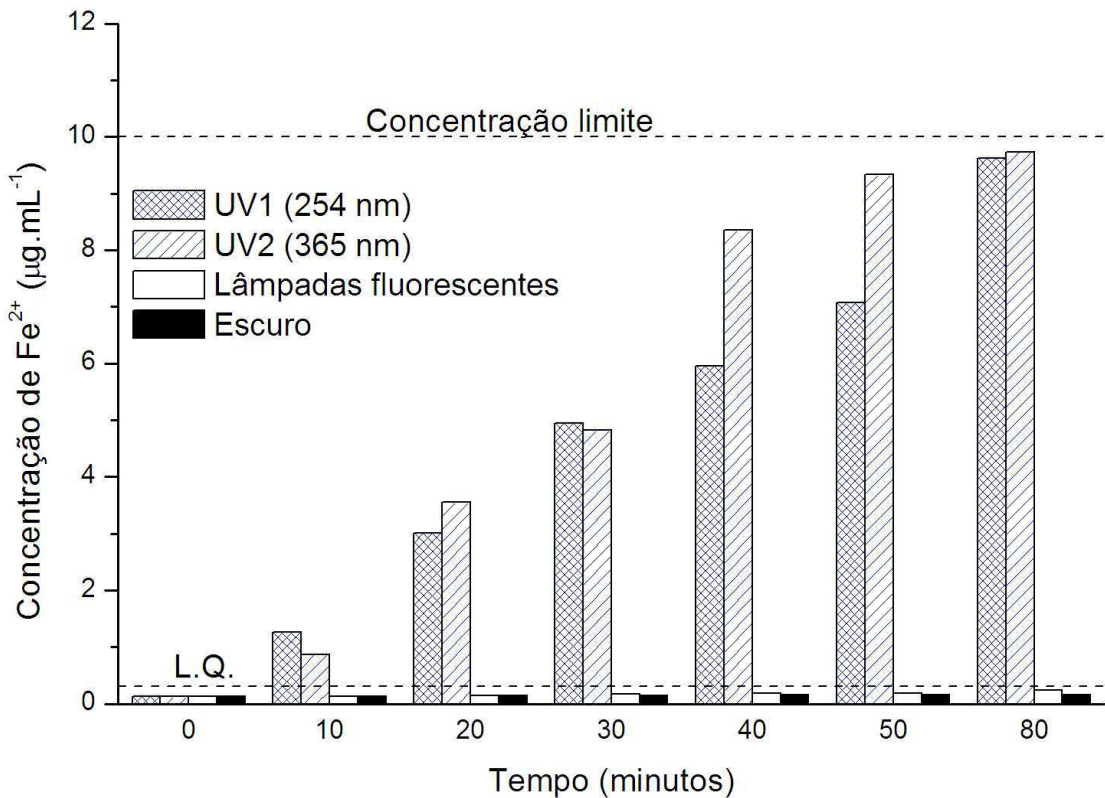


Figura 15: Efeito da radiação ultravioleta em soluções contendo Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 1,10-fenantrolina

O efeito da iluminação por lâmpadas fluorescentes foi menor, mas significativo; após 80 minutos a concentração de Fe^{2+} era o dobro da inicial e aproximadamente igual ao L.Q. Para reduzir esse efeito, a incidência direta de iluminação em soluções contendo Fe^{3+} , principalmente na presença de 1,10-fenantrolina, deve ser evitada quando possível.

Durante todo o processo de desenvolvimento e validação do método proposto, as quantificações foram feitas em uma ante-sala com separação de vidro usando a iluminação da sala ao lado. A eficácia dessa medida foi comprovada pela constância dos valores dos brancos durante o período de quantificação.

7 EFEITO DE SOLVENTE

As misturas contendo solvente e íons $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ não apresentaram absorção em 508,8 nm. Os resultados das demais soluções estão apresentados nas figuras 18 e 19. A água foi usada como solvente de referência e as concentrações de Fe^{2+} foram estimadas com o uso da equação 2 (seção 2). Os intervalos representam os intervalos de confiança de 95% para três medidas.

Para as soluções de $\text{Fe}^{3+}/1,10$ -fenantrolina, etanol, metanol, acetona e DMSO não apresentaram efeito significativo quando comparado com a água (figura 16). As soluções contendo esses solventes são representantes do branco com 95% de confiança, ou seja, a concentração de Fe^{2+} é menor que o limite de decisão (L.d. = $0,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

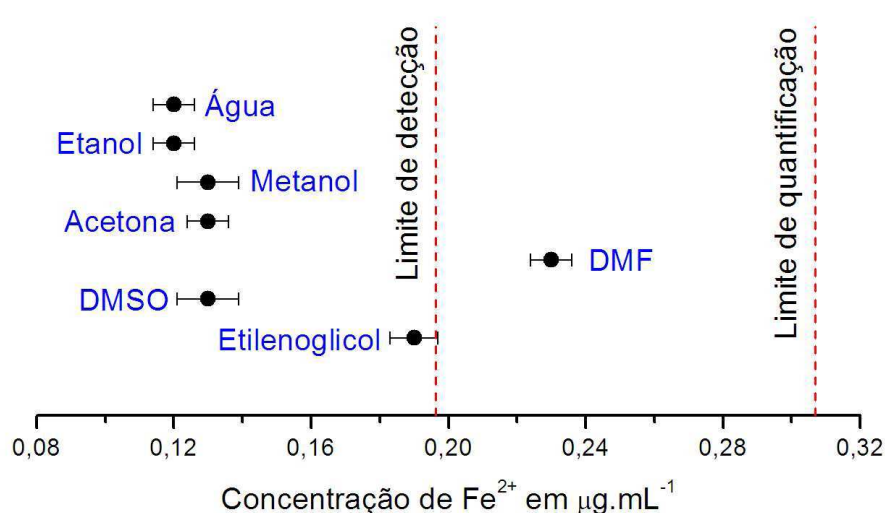


Figura 16: Efeito do solvente usado no preparo das amostras em soluções contendo Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 1,10-fenantrolina. Os intervalos de confiança são de 95% para 3 amostras.

Por outro lado, as soluções contendo DMF e etilenoglicol apresentaram concentrações de Fe^{2+} menor que o limite de quantificação (detectável, mas não

quantificável). Essas concentrações de Fe^{2+} podem ser reais, se o Fe^{3+} for reduzido, ou aparentes, se existir um complexo de Fe^{3+} /1,10-fenantrolina/solvente que absorve em 508,8 nm.

Para as soluções de Fe^{2+} /1,10-fenantrolina (figura 17), o solvente DMF mostrou um efeito maior que os demais quando comparado com água. O menor valor da concentração de Fe^{2+} indica que o DMF compete com o ligante 1,10-fenantrolina. Porém, a interferência não é significativa ao nível de 5% ($\alpha = 0,05$).

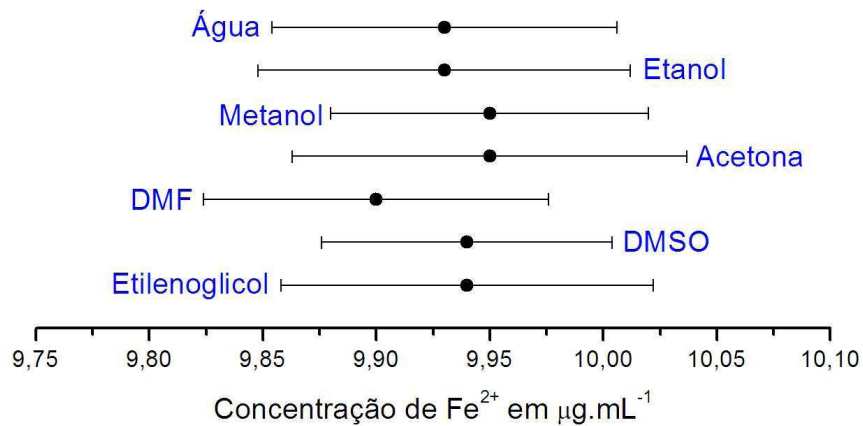


Figura 17: Efeito do solvente usado no preparo das amostras em soluções contendo Fe^{2+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 1,10-fenantrolina. Os intervalos de confiança são de 95% para 3 amostras.

Portanto, etanol, metanol, acetona, DMSO, DMF e etilenoglicol não interferem no desempenho do método nas condições testadas. A solubilização de extratos vegetais com os solventes e posterior diluição com água, quando possível, é uma boa opção no preparo das amostras. Como mencionado na seção 5, uma maior quantidade de água aumentaria a tensão superficial da solução, diminuindo o erro na retirada de alíquotas.

8 EFEITO DE LIGANTES PRESENTES NOS EXTRATOS

A figura 18 apresenta as absorvâncias em 508,8 nm de soluções contendo, inicialmente, Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), extrato e tampão acetato em $\text{pH} = 4,5$. Uma parte dos íons Fe^{3+} foi reduzida pelos extratos, com exceção do extrato 4J e 4I. Portanto, as possíveis interações envolveram os íons $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ e as substâncias nas formas oxidada e reduzida contidas nos extratos.

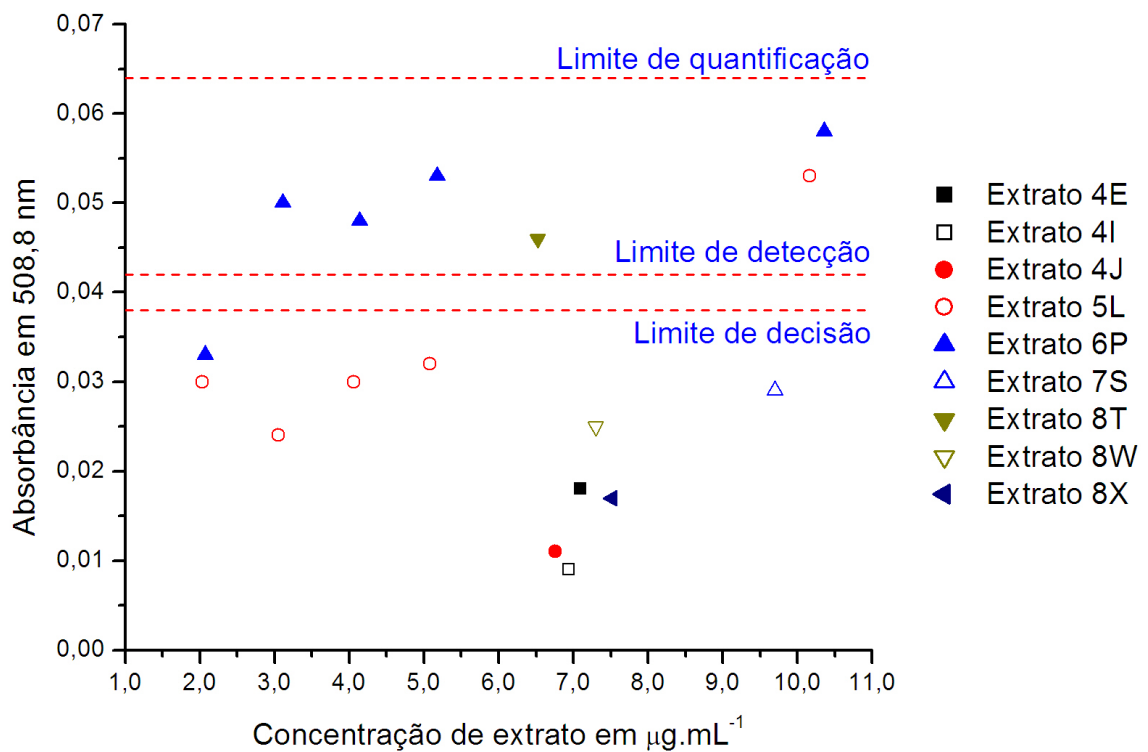


Figura 18: Efeito do extrato em soluções contendo, inicialmente, Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e tampão acetato.

Comparando os resultados com os parâmetros do método proposto, observa-se que a maioria das soluções testadas apresentou absorvâncias inferiores ao limite de decisão. Em outras palavras, tais soluções são semelhantes às soluções dos “brancos” com nível de confiança de 95%. As soluções contendo os extratos 6P

(3,0 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), 8T (6,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 5L (10,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram absorções compreendidos entre o L.D. e o L.Q.

Se essas absorções resultaram das interações entre espécies químicas oriundas dos extratos com íons $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, certamente, esse efeito seria minimizado, ou anulado, na presença de 1,10-fenantrolina por dois motivos: (1) valor alto da constante de estabilidade do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$; (2) excesso de 1,10-fenantrolina usado no método. Essas duas propriedades associadas favorecem a formação do complexo de interesse e, portanto, a presença de ligantes nos extratos testados não interferiria no método proposto.

9 EFEITO DE ÍONS

As soluções contendo o íon metálico e 1,10-fenantrolina não apresentaram absorbância expressiva em 508,8 nm. Os maiores valores foram de 0,006 e 0,010 unidades de absorbância para os íons Co^{2+} e K^+ , respectivamente (apêndice C, tabela C37).

Os resultados das soluções contendo Fe^{3+} , espécie iônica e 1,10-fenantrolina estão apresentados na figura 19. Os íons Co^{2+} , Mn^{2+} e Sn^{2+} reduzem íons Fe^{3+} em quantidades maiores que o limite de detecção, sendo o maior valor para o íon Co^{2+} . Por outro lado, íons fosfatos a 40,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ coordenam íons $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, resultando em complexos com absorbância maior que a absorbância correspondente ao limite de quantificação; tal efeito não é observado a 20,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As soluções com os demais íons apresentaram absorbâncias semelhantes ao branco (solução de referência).

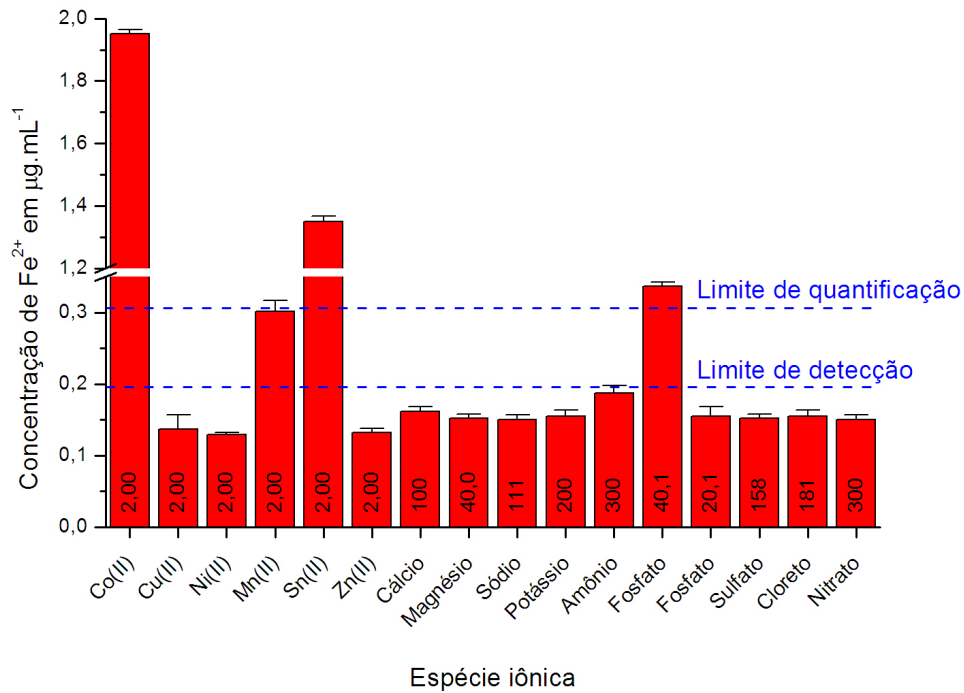


Figura 19: Efeito de íons em soluções contendo, inicialmente, Fe³⁺ (10,0 µg.mL⁻¹) e 1,10-fenantrolina. Os valores no interior das barras indicam a concentração do íon em µg.mL⁻¹ (IC_{95%} para 3 amostras).

As quantificações de Fe²⁺ na presença dos íons testados apresentaram médias no intervalo de concentração (IC_{95%}) da solução de referência (figura 20), com exceção do íon fosfato nas concentrações de 40,1 µg.mL⁻¹ e 20,0 µg.mL⁻¹.

A concentração de Fe²⁺ em torno de 10 µg.mL⁻¹ foi escolhida pelo motivo já descrito na seção 2. Nessa concentração, o complexo [Fe(fen)₃]²⁺ tem absorvância próxima de 2,0 unidades e a potência radiante que alcança o detector é baixa. Assim, a mínima interferência dos íons testados seria facilmente percebida.

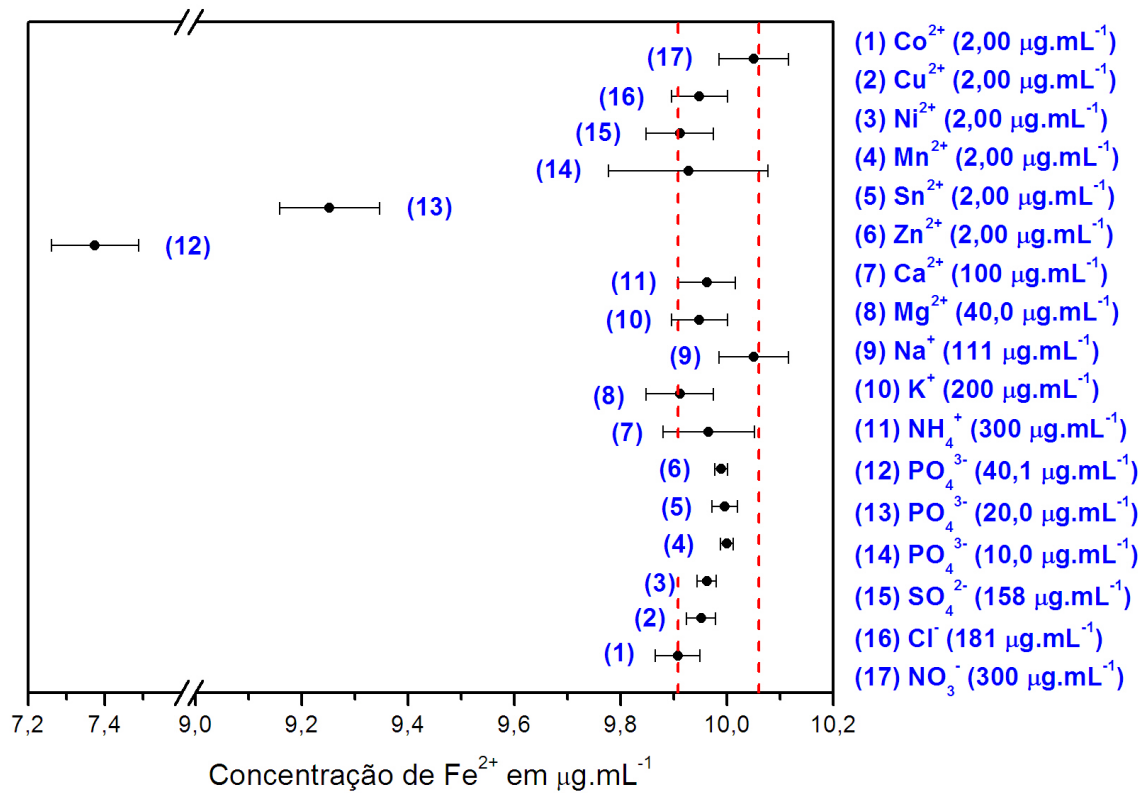


Figura 20: Efeito de íons em soluções contendo, inicialmente, Fe²⁺ (10,0 µg.mL⁻¹) e 1,10-fenantrolina. O espaço entre as linhas pontilhadas representa a concentração de referência no intervalo de confiança de 95%.

Pode-se afirmar que apenas íon fosfato é um potencial interferente em concentrações acima de 10 µg.mL⁻¹ nas condições testadas. Mas, em condições normais, a concentração desses íons na solução de extrato é muito inferior ao testado, e por isso, espera-se que nenhuma interferência seja observada.

10 APLICAÇÃO

Com base nos resultados mostrados na figura 21, o valor estimado para o extrato bruto 5L (*Minquartia guianensis*) é apenas 11% menor que o ácido ascórbico puro. No caso dos extratos 8W e 8T, pode-se inferir que a distribuição de espécies redutoras lipofílicas nas folhas e na raiz da amostra coletada de *Derris floribunda* é praticamente a mesma. Com relação aos extratos das folhas coletadas de um

espécime de *Pouroma villosa* (extratos 4E, 4I e 4J), pode-se dizer que a maioria das espécies redutoras é solúvel em metanol e água.

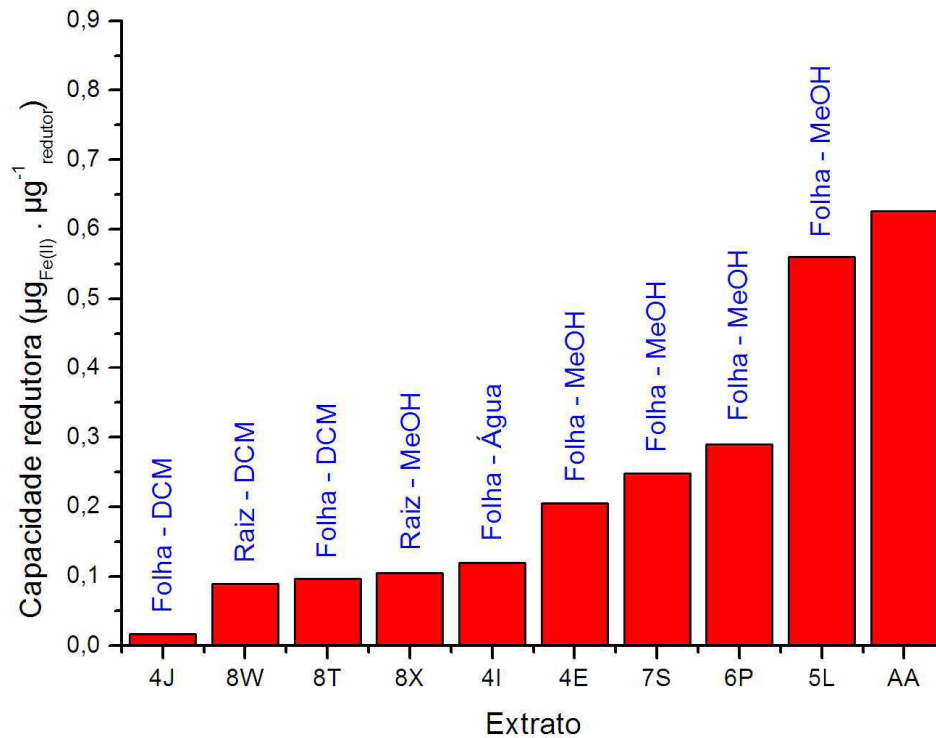


Figura 21: Capacidade redutora dos extratos testados e do ácido ascórbico (AA).

O método validado foi implantado no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) em meados de maio de 2007. Em um período de 1 mês e meio foram quantificados 287 extratos vegetais usando o método com Fe^{3+} e o método com DPPH•. Os resultados da capacidade redutora, expresso como concentração equivalente de ácido ascórbico, foram maiores para o método com Fe^{3+} do que para o método com DPPH• em 90% dos casos (figura 22).

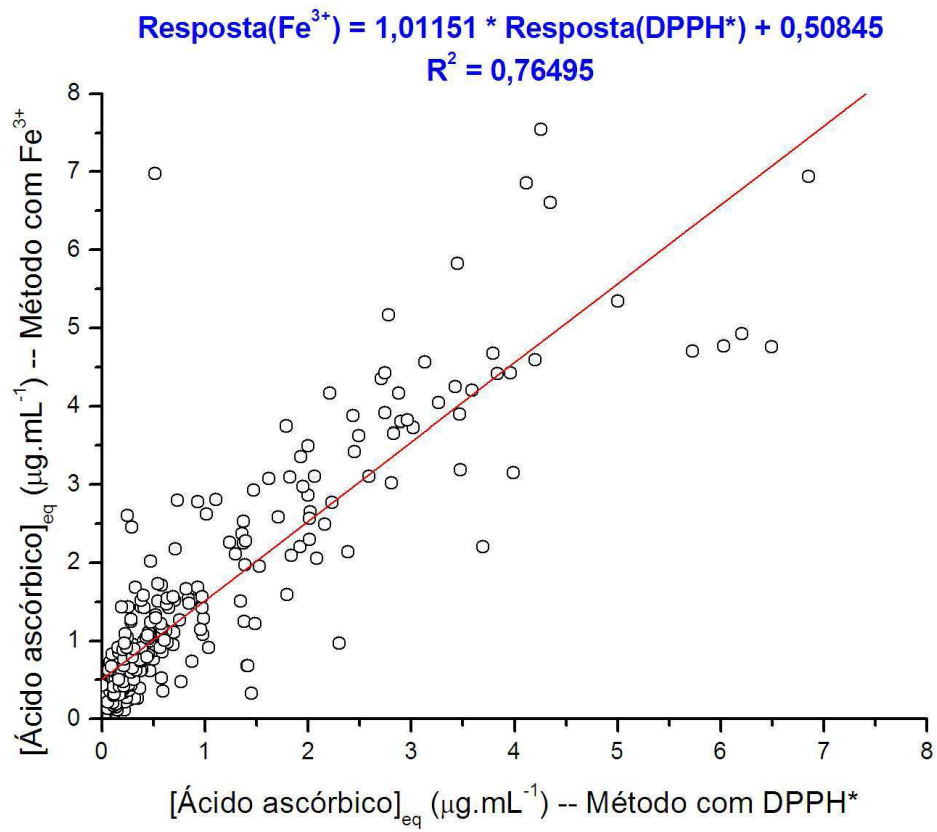


Figura 22: Correlação da capacidade redutora estimada pelos métodos com Fe^{3+} e DPPH•.

CONCLUSÃO

O método desenvolvido é definido como um método químico de quantificação indireta da capacidade redutora de extratos vegetais. Baseia-se na redução de íons Fe^{3+} por substâncias químicas contidas nos extratos e posterior quantificação de íons Fe^{2+} por técnica espectrofotométrica na região do visível usando o método adaptado do reagente 1,10-fenantrolina.

Em soluções aquosas contendo Fe^{2+} , Fe^{3+} e excesso de 1,10-fenantrolina, as espécies predominantes são os complexos $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ e $[(\text{H}_2\text{O})(\text{fen})_2\text{FeOFe}(\text{fen})_2(\text{H}_2\text{O})]^{4+}$. O complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ é estável e nas condições testadas tem absorção máxima em 508,8 nm com absortividade molar em torno de $(1,084 \pm 0,003) \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. O complexo $[(\text{H}_2\text{O})(\text{fen})_2\text{FeOFe}(\text{fen})_2(\text{H}_2\text{O})]^{4+}$ não interfere na quantificação do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$.

A quantificação de íons Fe^{2+} na forma do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ é linear na faixa de 0,2 a 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Até 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a reta ajustada obtida pelo método dos mínimos quadrados apresentou equação $\text{ABS} = 0,01444 + 0,19417 \times [\text{Fe}^{2+}]$ ($R^2 = 0,9994$); $\text{ABS} = 0,00263 + 0,19974 \times [\text{Fe}^{2+}]$ ($R^2 = 0,9997$) até 5,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Nas condições do método proposto, íons Fe^{3+} é capaz de oxidar substâncias com variada estrutura química, como: ácido ascórbico (vitamina); hidroquinona, catecol, pirogalol e quercetina (fenóis naturais); Trolox, BHA e BHT (fenóis usados como antioxidantes artificiais); cisteína (aminoácido); e glutathione (peptídeo). Resposta positiva para glutathione mostra vantagem do método proposto comparado ao método FRAP. O processo de oxidação estabelecido consiste em duas etapas: (1) reação com íons Fe^{3+} e (2) reação com íons Fe^{3+} na presença de 1,10-fenantrolina. O grau de oxidação e a linearidade variam de acordo com o mecanismo de reação. A presença dessas substâncias ou de substâncias similares, certamente, será detectada pelo método desenvolvido.

As etapas estabelecidas para a quantificação da capacidade redutora de extratos vegetais são:

(1) Preparo da curva de Fe^{2+} na faixa de 0,0 a 5,5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ou 0,0 a 10,0 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de acordo com a resposta dos extratos. Sugestão: 6 pontos incluindo o branco.

Procedimento: Em tubos de 1,5 mL, colocar alíquotas de uma solução padrão de Fe^{3+} (1.000,0 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) contendo 0,2 – 10 μg . Adicionar 160 μL de hidroxilamina 10%, seguido de 830 μL de 1,10-fenantrolina 0,25%. Após 15 minutos, medir a absorbância em λ_{max} . Relacionar a concentração de íons Fe^{2+} formados (supondo a redução total dos íons Fe^{3+}) com a absorbância do complexo usando um gráfico de dispersão e aplicar a regressão linear.

(2) Redução de íons Fe^{3+} usando os extratos vegetais.

Procedimento: Em tubo de 1,5 mL, colocar 10 μL da solução padrão de Fe^{3+} ($1000,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) seguido de 10 μL da solução de extrato (200 a 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Após 10 minutos, adicionar 980 μL de 1,10-fenantrolina 0,25% e homogeneizar a mistura. Medir a absorbância em λ_{max} após 1 hora. Estimar a concentração de Fe^{2+} produzido com o auxílio da relação descrita na etapa (1). Expressar a capacidade redutora dos extratos como $\mu\text{g}_{\text{Fe(II)}} \cdot \mu\text{g}^{-1}_{\text{Extrato}}$ dividindo a concentração de Fe^{2+} estimada pela concentração do extrato na mistura reacional.

O método desenvolvido e validado apresenta as seguintes características e limitações:

- Limite de decisão (L.d.) igual a $0,17 \mu\text{g Fe}^{2+} \cdot \text{mL}^{-1}$;
- Limite de detecção (L.D.) igual a $0,20 \mu\text{g Fe}^{2+} \cdot \text{mL}^{-1}$;
- Limite de quantificação (L.Q.) igual a $0,31 \mu\text{g Fe}^{2+} \cdot \text{mL}^{-1}$;
- Reprodutibilidade entre 0,5% e 3,9%;
- Repetibilidade entre 0,5% e 3,3%;
- A discrepância absoluta variou entre 1,3% e 3,9% para os seguintes redutores: ácido ascórbico, hidroquinona e BHA.
- Etanol, metanol, acetona e DMSO podem ser usados para dissolver os extratos vegetais. Etilenoglicol e DMF podem ser usados, mas podem coordenar com íons $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$;
- A coordenação dos íons $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ por ligantes presentes no extrato não interferem na quantificação do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$;
- Os íons Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , SO_4^{2-} , Cl^- e NO_3^- não interferem na quantificação do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$. O íon PO_4^{3-} interfere em concentrações maiores que $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;

- A radiação UV interfere no método convertendo íons Fe^{3+} em íons Fe^{2+} .

Pode-se, portanto, concluir que o método desenvolvido para quantificação da capacidade redutora de extratos vegetais mostrou-se adequado e de fácil execução. Mais estudos sobre o mecanismo de redução de íons Fe^{3+} na presença de 1,10-fenantrolina fazem-se necessários.

REFERÊNCIAS E OBRAS CONSULTADAS

- BARROS NETO, B. de; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. **Recomendações para calibração em química analítica - Parte I. Fundamentos e Calibração com um componente (calibração univariada)**. Química Nova, v. 25, n. 5, p. 856-865, 2002.
- BASOLO, F.; PEARSON, R. G. **Mechanisms of Inorganic Reactions: A Study of Metal Complexes in Solution**. Second Edition. New York: John Wiley & Sons, 1967.
- BASSETT, J.; DENNEY, R. C.; JEFFERY, G. H. *et al.* **Vogel: Análise Inorgânica Quantitativa**. Traduzido por Aída Espinola. Quarta edição. Rio de Janeiro: Guanabara, 1981. Tradução de: Vogel's Textbook of Quantitative Inorganic Analysis.
- BHATTACHARYYA, J.; DAS, S.; MUKHOPADHYAY, S. **Mechanistic studies on oxidation of L-ascorbic acid by an oxo-bridged diiron complex in aqueous acidic media**. Dalton Transactions, v. 12, p. 1214-1220, 2007.
- BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. **Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method**. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.
- BONNER, J.; Varner, J.E. **Plant Biochemistry**. Third Edition. New York: Academic Press, 1976.
- BUDOWSKI, P.; BONDI, A. **Autoxidation of carotene and vitamin A. Influence of fat and antioxidants**. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 89, n. 1, p. 66-73, 1960.
- CHEVION, S.; ROBERTS M. A.; CHEVION, M. **The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity**. Free Radical Biology and Medicine, v. 28, n. 6, p. 860-870, 2002.
- CONN, E. E.; STUMPF, P. K. **Introdução à bioquímica**. Traduzido por Lélia Mennucci sob supervisão de José Reinaldo Magalhães. 4 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1980. Tradução de: Outlines of Biochemistry.
- EURACHEM. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. Teddington: LGC, 1998. Disponível em: <www.eurachem.org/guides/valid.pdf>. Acesso em: 5 mar. 2005.

FURASTÉ, P. A. **Normas Técnicas para o Trabalho Científico**. 13.ed. Porto Alegre: 2005.

GUO, C.; YANG, J.; WEI, J. *et al.* **Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay**. Nutrition Research, v. 23, n. 12, p. 1719-1726, 2003.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. Third Edition. London: Chapman & Hall, 1998.

HARRIS, Daniel C. **Quantitative Chemical Analysis**. Fifth Edition. New York: Freeman, 1999.

HERNÁNDEZ, L.; HERNÁNDEZ, P.; RICA, M. *et al.* **Determination of Zeatin in plant extracts by square wave stripping polarography and differential pulse stripping polarography**. Analytica Chimica Acta, v. 315, n. 1-2, p. 33-39, 1995.

HU, M.; SKIBSTED, L. H. **Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (*Nelumbo nuficera*)**. Food Chemistry, v. 76, n. 3, p. 327-333, 2002.

HUSBANDS, M. J.; Scott, G. **Mechanisms of antioxidant action. The behaviour of sulphur dioxide in autoxidizing systems**. European Polymer Journal, v. 15, n. 3, p. 249-253, 1979.

KHOPDE, S. M.; PRIYADARSINI, K. I.; MOHAN, H. *et al.* **Characterizing the antioxidant activity of amla (*Phyllanthus emblica*) extract**. Current Science, v. 81, n. 2, p. 185-190, 2001.

LATHAM, J. L. **Cinética elementar de reação**. Traduzido por Mário Turi Cataldi. São Paulo: Edgard Blücher e Universidade de São Paulo, 1974. Tradução de: Elementary reaction kinetics.

LEE, J. D. **Química Inorgânica: um novo texto conciso**. Traduzido por Juergen Heinrich Maar. São Paulo: Edgard Blücher, 1980. Tradução de: A new concise inorganic chemistry.

LEONG, L. P.; SHUI, G. **An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets**. Food Chemistry, v. 76, p. 69-75, 2002.

LIU, X.; ARDO, S.; BUNNING, M. *et al.* **Total phenolic content and DPPH• radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa L.*) grown in Colorado**. LWT – Food Science and Technology, v. 40, n. 3, p. 552-557, 2007.

LUIS, J.C.; VALDÉS, F.; MARTÍN, R. *et al.* **DPPH radical scavenging activity of two flavonol glycosides from *Aconitum napellus* sp. *Lusitanicum***. Fitoterapia, v. 77, n. 6, p. 469-471, 2006.

MELLO, L. D.; HERNANDEZ, S.; MARRAZZA, G. *et al.* **Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor**. Biosensors and Bioelectronics, v. 21, n. 17, p. 1374-1382, 2006.

MILLER, J. C.; MILLER, J. N. **Statistics for Analytical Chemistry**: Ellis Horwood series in analytical chemistry. Chichester: Ellis Horwood, 1984.

MOLYNEUX, Philip. **The use of the stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity**. Songklanakarin J. Sci. Technol., v. 26, p. 211-219, 2004.

MOORE, D. S. **A Estatística Básica e Suas Prática**. Traduzido por Alfredo Alves de Farias. Rio de Janeiro: LTC, 2000. Tradução de: The Basic Practice of Statistics.

OHLWEILER, O. A. **Teoria e Prática da Análise Quantitativa Inorgânica**. São Paulo: Universidade de Brasília, 1968. 4v.

ORGEL, L. E. **Introdução à química dos metais de transição**. Traduzido por Tizue S. Nardi. São Paulo: Edgard Blücher e Universidade de São Paulo, 1970. Tradução de: An Introduction to Transition-Metal Chemistry.

PEYRAT-MAILLARD, M. N.; BONNELLY, S.; BERSSET, C. **Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection**. Talanta, v. 51, n. 4, p. 709-716, 2000.

PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; GARDANA, C. *et al.* **Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of *Ginkgo biloba* flavonol and *Camellia sinensis* catechin metabolites**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 23, n. 1, p. 223-226, 2000.

PRICE, J. A.; SANNY, C. G.; SHEVLIN, D. **Application of manual assessment of oxygen radical absorbent capacity (ORAC) for use in high throughput assay of "total" antioxidant activity of drugs and natural products**. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 54, n. 1, p. 56-61, 2006.

PRIOR, R. L.; CAO, G. **In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods**. Free Radical Biology and Medicine, v. 27, n. 11-12, p. 1173-1181, 1999.

RANAWEERA, R. P. R.; SCOTT, G. **Mechanisms of antioxidant action: Metal complexes as u.v. stabilisers in polyethylene**. European Polymer Journal, v. 12, n. 8, p. 591-597, 1976.

RAO, Garimella Visweswara; SRIDHAR, Yeleswarapu; HELA, Pamidipati Gayatri et al. **Kinetics and mechanism of substitution of bis(tptz)iron(II) by 2,20-bipyridine and 1,10-phenanthroline**. Transition Metal Chemistry, v. 24, p. 566-570, 1999.

ROBERTS, J. D.; CASERIO, M.C. **Basic Principles of Organic Chemistry**. 2nd edition. California: W. A. Benjamin, 1977.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. 4th ed. Belmont: Wadsworth Publishing, 1992.

SWICK, R. W.; BAUMANN, C. A. **Effect of certain tocopherols and other antioxidants on the utilization of β -carotene for vitamin A storage**. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 36, n. 1, p. 120-126, 1952.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K. *et al.* **Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts.** *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, n. 6-7, p. 669-675, 2006.

USE of antioxidants in preserving rubber. *Journal of the Franklin Institute*, v. 207, n. 1, p. 127, 1929.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; Moura, J. B. de F. *et al.* **Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação.** *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

WALCZAK, Mary M.; FLYNN, Nolan T. **Spectroelectrochemical study of the generation of tris-(1,10-phenanthroline) iron(II/III) from μ -oxo-bis[aquabis(1,10-phenanthroline) iron(III)].** *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 441, n. 1-2, p. 43-49, 1998.

WONG, Chi-Chun; LI, Hua-Bin; CHENG, Ka-Wing *et al.* **A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay.** *Food Chemistry*, v. 97, n. 4, p. 705-711, 2006.

APÊNDICE A – PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Todo material vegetal foi submetido à secagem ao ar livre, no caso de folhas, ou em estufa com circulação forçada (aproximadamente 50 °C), no caso de galhos e raízes, por um período de 2 a 3 dias. O material seco e moído (200 g) foi submetido à extração por solventes (diclorometano, metanol e água; 3 x 1 L) em ultra-som (20 min). Os extratos vegetais secos foram obtidos pela eliminação do solvente usando rota-evaporador; para os extratos aquosos foi usada a técnica de liofilização.

APÊNDICE B – PERFIL OXI-REDUTOR DE EXTRATOS VEGETAIS POR TÉCNICA DE VOLTAMETRIA CÍCLICA

As medidas foram realizadas no Departamento de Química Geral e Inorgânica no Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia sob a supervisão da Dra. Zênis Novais. Os seguintes instrumentos e materiais foram usados: um potenciostato/galvanostato marca Princeton Applied Research modelo 273A, acoplado a um microcomputador compatível (figura B1.b); uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos com capacidade de 5 mL, provida de tampa de teflon com cinco orifícios, onde foram inseridos os eletrodos e sistema de borbulhamento de argônio; um eletrodo de carbono vítreo com área de 0,082 cm² como eletrodo de trabalho; um fio de platina como eletrodo auxiliar; e um eletrodo de Ag/AgCl em NaCl 3 M como eletrodo de referência (figura B1.a).

Um procedimento para estudo eletroquímico de organometálicos em meio orgânico foi usado para as medidas. Foram testados 25 extratos para verificar picos ou bandas de oxidação, não sendo uma análise propriamente dita, pois variáveis como solventes, concentração do eletrólito (força iônica), pH e temperatura não foram otimizados e validados para os extratos usados.

As misturas testadas consistiam em 4,5 mL de acetonitrila, 120 mg de tetrafluoroborato de tetrabutilamônio e 0,500 mL de amostra com concentração em torno de 10 mg.mL⁻¹. Os voltamogramas (figuras B2, B3 e B4) foram obtidos com velocidades de varredura iguais a 50 e 100 mV.s⁻¹ após borbulhamento com fluxo constante de argônio por 5 minutos para a remoção de oxigênio; uma atmosfera saturada com o mesmo gás foi mantida durante todas as medidas.

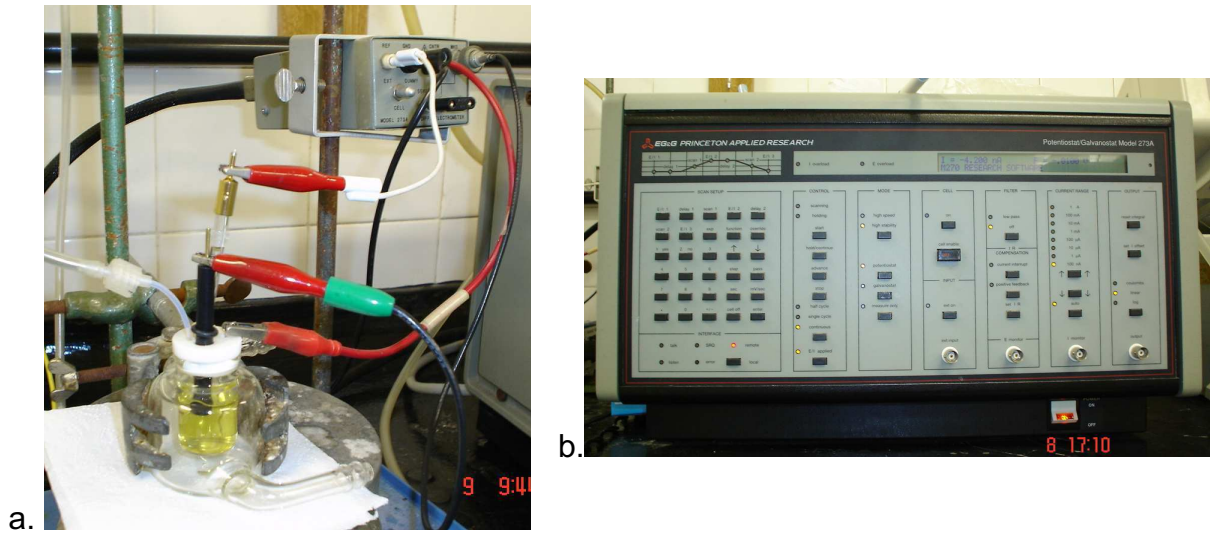


Figura B1: a. Célula eletroquímica; b. Potenciostato/galvanostato.

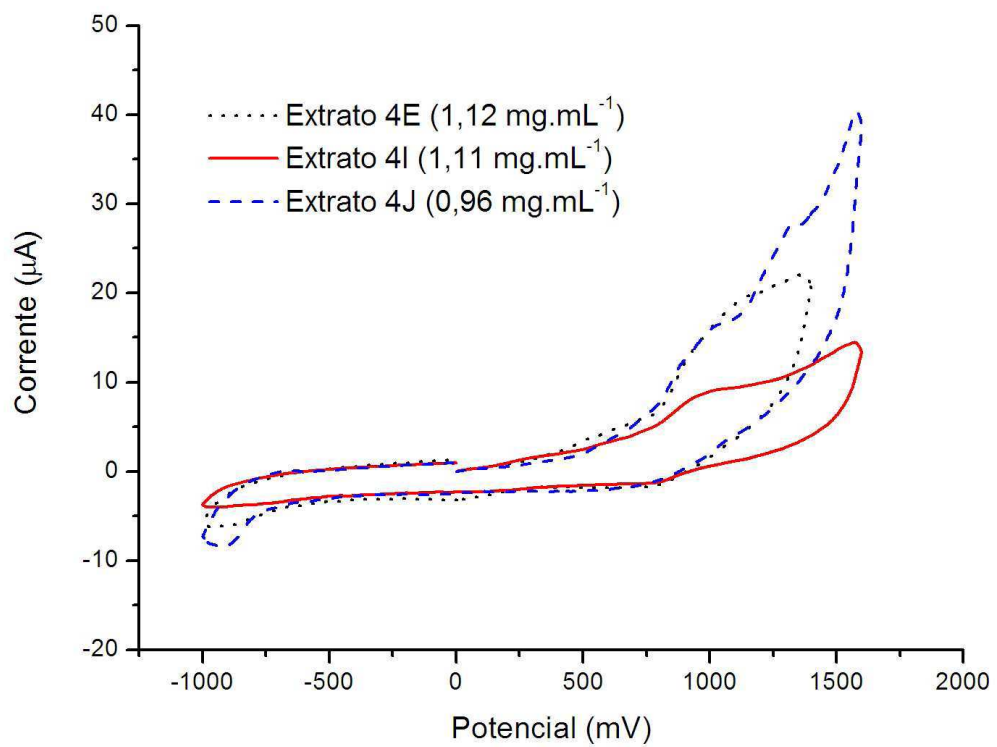


Figura B2: Voltamogramas dos extratos 4E, 4I e 4J.

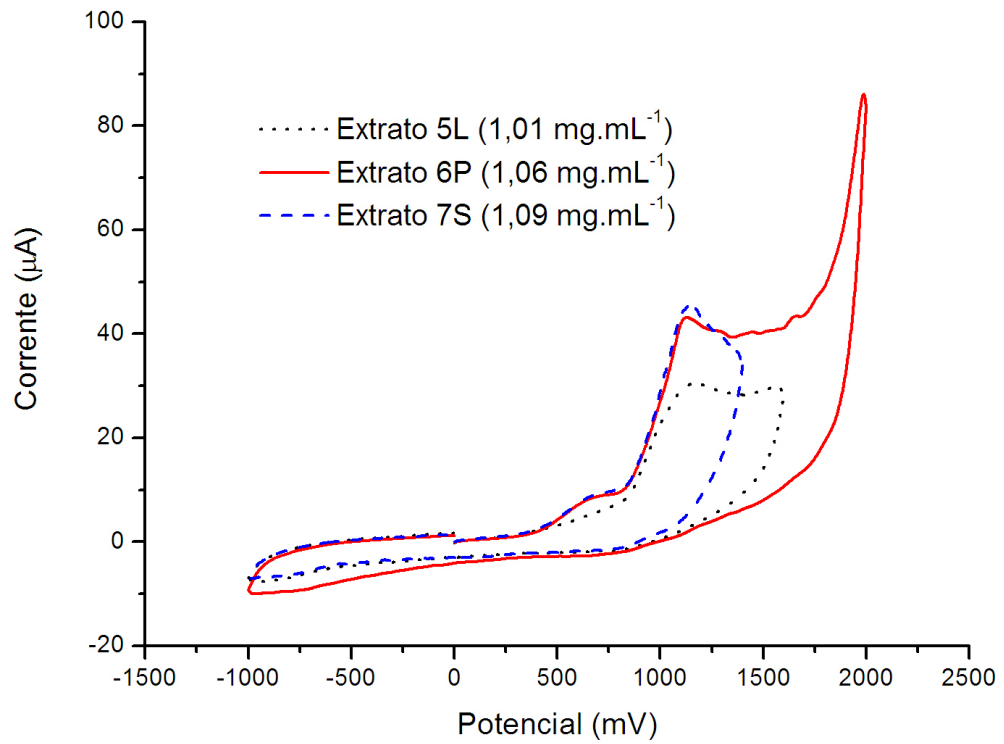


Figura B3: Voltamogramas dos extratos 5L, 6P e 7S.

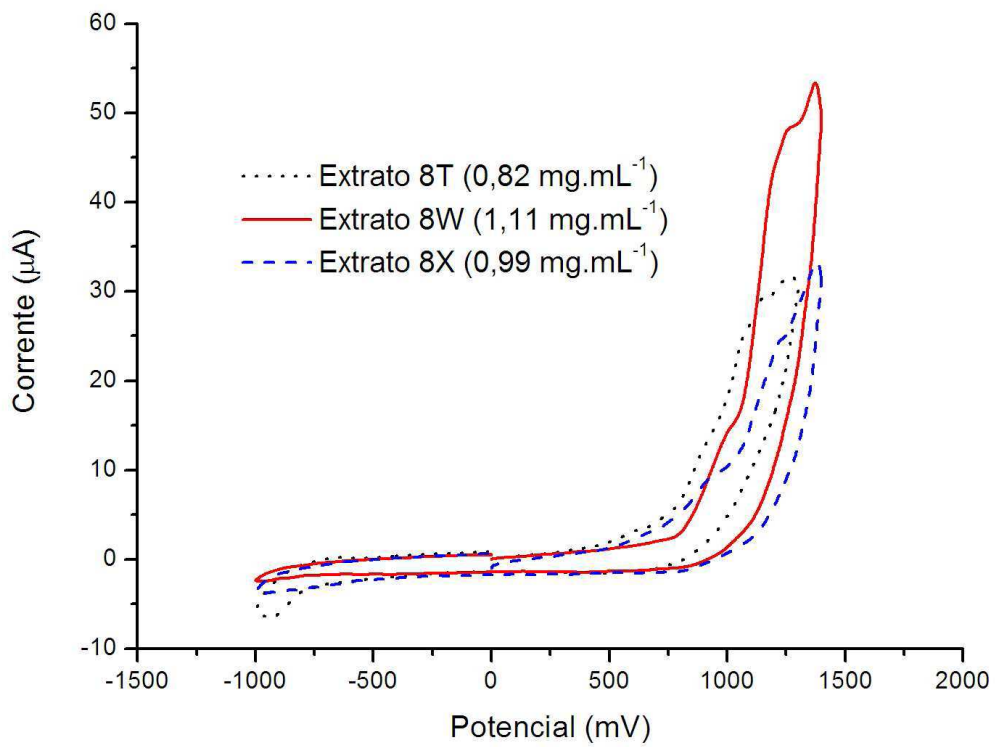


Figura B4: Voltamogramas dos extratos 8T, 8W e 8X.

**APÊNDICE C – DADOS OBTIDOS NO PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO E
VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO**

Tabela C.1: Linearidade do sistema – Seção 6.2 da Metodologia

Concentração de Fe ²⁺ (µg.mL ⁻¹)	Absorbância em 508,8 nm
0,000	0,005
0,001	0,004
0,002	0,004
0,004	0,004
0,006	0,005
0,008	0,004
0,010	0,005
0,020	0,007
0,038	0,008
0,056	0,011
0,071	0,014
0,086	0,016
0,12	0,021
0,21	0,047
0,42	0,087
0,83	0,167
1,24	0,246
1,64	0,325
2,04	0,405
4,00	0,786
7,69	1,492
11,1	2,100
14,3	2,526
17,2	2,763
23,8	2,873

Tabela C.2: Faixa de trabalho do sistema – Seção 6.3 da Metodologia

Concentração de Fe ²⁺ (µg.mL ⁻¹)			Absorbância em 508,8 nm		
Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0,00	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000
0,00	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000
0,19	0,20	0,20	0,040	0,042	0,041
0,40	0,40	0,40	0,081	0,080	0,081
0,60	0,60	0,60	0,120	0,121	0,119
0,76	0,80	0,80	0,151	0,159	0,160
1,00	1,00	1,00	0,199	0,201	0,201
1,51	1,51	1,51	0,311	0,306	0,315
2,01	2,01	1,92	0,407	0,407	0,383
2,02	2,02	2,02	0,405	0,409	0,409
2,40	2,52	2,52	0,485	0,511	0,511
2,51	2,40	2,52	0,504	0,480	0,507
3,02	3,01	3,01	0,606	0,601	0,608
3,02	3,02	3,02	0,617	0,615	0,624
3,51	3,35	3,51	0,704	0,664	0,700
3,52	3,52	3,52	0,717	0,711	0,720
3,84	4,03	3,84	0,772	0,808	0,784
4,01	4,01	4,01	0,797	0,800	0,802
4,51	4,51	4,30	0,899	0,896	0,855
4,53	4,52	4,53	0,918	0,911	0,909
5,00	5,00	5,00	0,995	0,992	0,989
5,03	4,79	5,03	1,010	0,960	1,006
5,27	5,53	5,52	1,038	1,104	1,098
6,03	6,03	6,03	1,176	1,200	1,184
6,53	6,53	6,52	1,300	1,274	1,286
7,02	7,02	6,70	1,386	1,380	1,306
7,52	7,52	7,17	1,482	1,482	1,410
8,01	8,02	8,02	1,564	1,568	1,556
8,50	8,50	8,52	1,646	1,666	1,656
9,01	9,00	8,60	1,742	1,742	1,658
9,07	9,51	9,51	1,756	1,826	1,836

Tabela C.3: Redução de Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por Trolox ($13,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia

Tempo (min.)	Absorbância em 508,8 nm	
	Procedimento A	Procedimento B
0	0,026	0,026
1	1,180	0,210
2	1,226	0,364
3	1,236	0,490
4	1,240	0,598
5	1,250	0,689
6	1,266	0,773
7	1,260	0,842
8	1,276	0,901
9	1,302	0,955
10	1,308	1,004
20	1,310	1,190
30	1,318	1,196
40	1,320	1,198
50	1,326	1,204
60	1,328	1,206

Tabela C.4: Redução de Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por ácido ascórbico ($8,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia

Tempo (min.)	Absorbância em 508,8 nm	
	Procedimento A	Procedimento B
0	0,025	0,025
1	1,082	0,923
2	1,100	1,058
3	1,102	1,086
4	1,142	1,088
5	1,090	1,088
6	1,104	1,090
7	1,086	1,088
8	1,092	1,088
9	1,090	1,088
10	1,102	1,092
20	1,110	1,098
30	1,118	1,104
40	1,124	1,110
50	1,126	1,128
60	1,132	1,132

Tabela C.5: Redução de Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por hidroquinona ($4,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia

Tempo (min.)	Absorbância em 508,8 nm	
	Procedimento A	Procedimento B
0	0,016	0,016
1	0,762	0,190
2	0,866	0,326
3	0,916	0,441
4	0,931	0,540
5	0,935	0,621
6	0,940	0,688
7	0,955	0,741
8	0,951	0,788
9	0,957	0,824
10	0,960	0,854
20	0,972	0,952
30	0,979	0,960
40	0,983	0,963
50	0,990	0,971
60	0,995	0,980

Tabela C.6: Redução de Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por cisteína ($12,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia

Tempo (min.)	Absorbância em 508,8 nm	
	Procedimento A	Procedimento B
0	0,028	0,028
1	0,432	0,056
2	0,554	0,077
3	0,612	0,100
4	0,665	0,125
5	0,705	0,150
6	0,735	0,175
7	0,763	0,201
8	0,780	0,226
9	0,797	0,251
10	0,812	0,276
20	0,912	0,475
30	0,999	0,635
40	1,072	0,773
50	1,138	0,875
60	1,202	0,981

Tabela C.7: Redução de Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por BHA ($8,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia

Tempo (min.)	Absorbância em 508,8 nm	
	Procedimento A	Procedimento B
0	0,023	0,023
1	0,410	0,086
2	0,515	0,137
3	0,577	0,184
4	0,618	0,234
5	0,647	0,280
6	0,678	0,327
7	0,700	0,370
8	0,712	0,414
9	0,735	0,454
10	0,748	0,497
20	0,899	0,755
30	1,010	0,909
40	1,078	1,006
50	1,106	1,066
60	1,118	1,100

Tabela C.8: Redução de Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por pirogalol ($1,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia

Tempo (min.)	Absorbância em 508,8 nm	
	Procedimento A	Procedimento B
0	0,037	0,037
1	0,539	0,460
2	0,568	0,573
3	0,567	0,619
4	0,584	0,655
5	0,597	0,679
6	0,600	0,700
7	0,610	0,719
8	0,619	0,733
9	0,632	0,748
10	0,631	0,761
20	0,762	0,864
30	0,835	0,942
40	0,894	0,999
50	0,946	1,044
60	0,988	1,086

Tabela C.9: Redução de Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por extrato 5L ($19,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia

Tempo (min.)	Absorbância em 508,8 nm	
	Procedimento A	Procedimento B
0	0,041	0,034
1	0,449	0,160
2	0,493	0,213
3	0,524	0,256
4	0,532	0,293
5	0,539	0,325
6	0,565	0,353
7	--	0,377
8	--	0,400
9	0,563	0,422
10	0,577	0,444
20	0,719	0,580
30	0,810	0,672
40	0,882	0,746
50	0,944	0,808
60	1,014	0,868

Tabela C.10: Redução de Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por catecol ($2,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia

Tempo (min.)	Absorbância em 508,8 nm	
	Procedimento A	Procedimento B
0	0,023	0,023
1	0,434	0,101
2	0,441	0,180
3	0,449	0,243
4	0,456	0,304
5	0,460	0,351
6	0,473	0,390
7	0,469	0,422
8	0,478	0,447
9	0,485	0,469
10	0,496	0,488
20	0,636	0,620
30	0,733	0,751
40	0,840	0,874
50	0,933	0,989
60	1,020	1,096

Tabela C.11: Redução de Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por extrato 6P ($22,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia

Tempo (min.)	Absorbância em 508,8 nm	
	Procedimento A	Procedimento B
0	0,034	0,034
1	0,351	0,167
2	0,395	0,236
3	0,401	0,283
4	0,419	0,315
5	0,419	0,343
6	0,431	0,363
7	0,429	0,384
8	0,448	0,403
9	0,459	0,416
10	0,455	0,433
20	0,630	0,559
30	0,736	0,652
40	0,836	0,730
50	0,918	0,793
60	0,984	0,850

Tabela C.12: Redução de Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por quercetina ($2,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia

Tempo (min.)	Absorbância em 508,8 nm	
	Procedimento A	Procedimento B
0	0,037	0,037
1	0,257	0,221
2	0,277	0,239
3	0,287	0,256
4	0,302	0,277
5	0,313	0,297
6	0,321	0,316
7	0,329	0,336
8	0,342	0,357
9	0,352	0,374
10	0,349	0,393
20	0,513	0,526
30	0,630	0,645
40	0,685	0,744
50	0,767	0,830
60	0,849	0,888

Tabela C.13: Redução de Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por glutatona ($26,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia

Tempo (min.)	Absorbância em 508,8 nm	
	Procedimento A	Procedimento B
0	0,026	0,026
1	0,060	0,077
2	0,053	0,103
3	0,063	0,121
4	0,065	0,140
5	0,066	0,156
6	0,069	0,175
7	0,070	0,195
8	0,087	0,211
9	0,088	0,231
10	0,095	0,251
20	0,243	0,404
30	0,368	0,532
40	0,481	0,655
50	0,596	0,765
60	0,704	0,864

Tabela C.14: Redução de Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por BHT ($28,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em função do tempo – Seção 7.1 da Metodologia

Tempo (min.)	Absorbância em 508,8 nm	
	Procedimento A	Procedimento B
0	0,010	0,010
1	0,034	0,061
2	0,032	0,067
3	0,030	0,079
4	0,030	0,089
5	0,020	0,098
6	0,023	0,111
7	0,017	0,122
8	0,021	0,132
9	0,016	0,139
10	0,018	0,154
20	0,073	0,258
30	0,124	0,354
40	0,163	0,431
50	0,205	0,514
60	0,238	0,575

Tabela C.15: Redução de Fe^{3+} em função da concentração de Trolox – Seção 7.2 da Metodologia

Concentração de redutor ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	Absorbância em 508,8 nm
19,920	1,622
9,960	0,858
4,980	0,460
2,490	0,249
1,245	0,145
0,623	0,090
0,311	0,061
0,156	0,046
0,078	0,038
0,039	0,034
0,019	0,032
0,010	0,040
0,005	0,037

Tabela C.16: Redução de Fe^{3+} em função da concentração de ácido ascórbico – Seção 7.2 da Metodologia

Concentração de redutor ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	Absorbância em 508,8 nm
20,520	1,950
10,260	1,318
5,130	0,682
2,565	0,360
1,283	0,197
0,641	0,117
0,321	0,073
0,160	0,054
0,080	0,042
0,040	0,039
0,020	0,035
0,010	0,036
0,005	0,034

Tabela C.17: Redução de Fe^{3+} em função da concentração de hidroquinona – Seção 7.2 da Metodologia

Concentração de redutor ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	Absorbância em 508,8 nm
10,560	1,956
5,280	1,084
2,640	0,570
1,320	0,298
0,660	0,168
0,330	0,098
0,165	0,066
0,083	0,048
0,041	0,045
0,021	0,036
0,010	0,037
0,005	0,031
0,003	0,033

Tabela C.18: Redução de Fe^{3+} em função da concentração de cisteína – Seção 7.2 da Metodologia

Concentração de redutor ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	Absorbância em 508,8 nm
20,400	1,666
10,200	1,160
5,100	0,766
2,550	0,494
1,275	0,328
0,638	0,226
0,319	0,145
0,159	0,098
0,080	0,065
0,040	0,051
0,020	0,041
0,010	0,039
0,005	0,031

Tabela C.19: Redução de Fe^{3+} em função da concentração de BHA – Seção 7.2 da Metodologia

Concentração de redutor ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Absorbância em 508,8 nm
16,240	1,616
8,120	1,078
4,060	0,558
2,030	0,294
1,015	0,161
0,508	0,096
0,254	0,070
0,127	0,046
0,063	0,039
0,032	0,035
0,016	0,032
0,008	0,033
0,004	0,030

Tabela C.20: Redução de Fe^{3+} em função da concentração de pirogalol – Seção 7.2 da Metodologia

Concentração de redutor ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Absorbância em 508,8 nm
9,680	1,956
4,840	1,950
2,420	1,408
1,210	0,836
0,605	0,473
0,303	0,259
0,151	0,149
0,076	0,088
0,038	0,061
0,019	0,045
0,009	0,040
0,005	0,034
0,002	0,033

Tabela C.21: Redução de Fe^{3+} em função da concentração de extrato 5L – Seção 7.2 da Metodologia

Concentração de redutor ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Absorbância em 508,8 nm
19,900	1,556
9,950	1,054
4,975	0,673
2,488	0,402
1,244	0,212
0,622	0,122
0,311	0,082
0,155	0,060
0,078	0,048
0,039	0,042
0,019	0,041
0,010	0,039
0,005	0,039

Tabela C.22: Redução de Fe^{3+} em função da concentração de catecol – Seção 7.2 da Metodologia

Concentração de redutor ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Absorbância em 508,8 nm
9,960	2,000
4,980	1,974
2,490	1,288
1,245	0,746
0,623	0,401
0,311	0,222
0,156	0,133
0,078	0,088
0,039	0,060
0,019	0,047
0,010	0,035
0,005	0,037
0,002	0,033

Tabela C.23: Redução de Fe³⁺ em função da concentração de extrato 6P – Seção 7.2 da Metodologia

Concentração de redutor ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Absorbância em 508,8 nm
22,200	1,042
11,100	0,703
5,550	0,414
2,775	0,254
1,388	0,153
0,694	0,106
0,347	0,063
0,173	0,050
0,087	0,042
0,043	0,040
0,022	0,039
0,011	0,038
0,000	0,038

Tabela C.24: Redução de Fe³⁺ em função da concentração de quercetina – Seção 7.2 da Metodologia

Concentração de redutor ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Absorbância em 508,8 nm
10,520	1,572
5,260	1,246
2,630	0,840
1,315	0,510
0,658	0,270
0,329	0,157
0,164	0,093
0,082	0,059
0,041	0,048
0,021	0,037
0,010	0,036
0,005	0,033
0,003	0,034

Tabela C.25: Redução de Fe^{3+} em função da concentração de glutatona – Seção 7.2 da Metodologia

Concentração de redutor ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Absorbância em 508,8 nm
48,400	1,028
24,200	0,810
12,100	0,648
6,050	0,511
3,025	0,356
1,513	0,217
0,756	0,137
0,378	0,089
0,189	0,063
0,095	0,047
0,047	0,041
0,024	0,034
0,000	0,036

Tabela C.26: Redução de Fe^{3+} em função da concentração de BHT – Seção 7.2 da Metodologia

Concentração de redutor ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Absorbância em 508,8 nm
59,880	0,574
29,940	0,371
14,970	0,250
7,485	0,112
3,743	0,058
1,871	0,042
0,936	0,034
0,468	0,035
0,234	0,031
0,117	0,032
0,058	0,030
0,029	0,034
0,000	0,034

Tabela C.27: Absorbância dos “brancos” – Seção 8.1 da Metodologia

Absorbância em 508,8 nm				
0,030	0,032	0,031	0,032	0,031
0,028	0,030	0,032	0,028	0,028
0,028	0,029	0,029	0,030	0,026
0,034	0,033	0,032	0,032	0,032
0,038	0,033	0,033	0,032	0,032
0,035	0,032	0,031	0,031	0,031
0,036	0,037	0,038	0,039	0,037
0,033	0,034	0,034	0,034	0,033
0,031	0,033	0,035	0,036	0,037
0,032	0,031	0,023	0,035	0,035
0,033				

Tabela C.28: Reprodutibilidade e repetibilidade do extrato 5L – Seção 8.2 da Metodologia

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			Absorbância em 508,8 nm				
5L ₁	5L ₂	5L ₃	5L ₁	5L ₂	5L ₃	5L ₃	5L ₃
0,0	0,0	0,0	0,036	0,034	0,034	0,034	0,033
2,0	2,0	1,9	0,289	0,289	0,288	0,289	0,299
3,0	3,0	2,9	0,390	0,404	0,386	0,403	0,407
4,1	4,0	3,9	0,491	0,502	0,505	0,510	0,516
5,1	5,0	4,9	0,592	0,585	0,592	0,601	0,606
10,2	10,0	9,7	1,007	1,013	1,003	1,008	1,022

Tabela C.29: Reprodutibilidade e repetibilidade do extrato 6P – Seção 8.2 da Metodologia

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			Absorbância em 508,8 nm				
6P ₁	6P ₂	6P ₃	6P ₁	6P ₂	6P ₃	6P ₃	6P ₃
0,0	0,0	0,0	0,036	0,034	0,034	0,034	0,033
2,0	2,0	1,9	0,289	0,289	0,288	0,289	0,299
3,0	3,0	2,9	0,390	0,404	0,386	0,403	0,407
4,1	4,0	3,9	0,491	0,502	0,505	0,510	0,516
5,1	5,0	4,9	0,592	0,585	0,592	0,601	0,606
10,2	10,0	9,7	1,007	1,013	1,003	1,008	1,022

Tabela C.30: Repetibilidade dos extratos – Seção 8.2 da Metodologia

Extrato	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ABS _{508,8} dos brancos	Absorbância em 508,8 nm				
5L	4,9	0,034	0,592	0,601	0,606	--	--
6P	5,3	0,036	0,349	0,356	0,357	--	--
4E	7,1	0,035	0,324	0,332	0,331	0,327	0,325
4I	6,9	0,035	0,199	0,202	0,204	0,202	0,204
4J	6,8	0,033	0,058	0,058	0,060	0,058	0,060
7S	9,7	0,031	0,504	0,511	0,508	0,523	0,526
8T	6,5	0,032	0,157	0,159	0,158	0,159	0,164
8W	7,3	0,031	0,164	0,162	0,162	0,163	0,163
8X	7,5	0,023	0,180	0,186	0,182	0,183	0,188

Tabela C.31: Quantificação da capacidade redutora dos extratos usando o método com DPPH• – Seção 8.3 da Metodologia

Extrato	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ABS ₅₁₇ dos brancos	Absorbância em 517 nm				
5L	4,9	0,958	0,532	0,530	0,530	--	--
6P	5,3	0,956	0,786	0,780	0,771	--	--
4E	7,1	0,928	0,653	0,639	0,645	0,642	0,643
4I	6,9	0,929	0,885	0,884	0,885	0,887	0,885
4J	6,8	0,940	0,930	0,931	0,933	0,932	0,929
7S	9,7	1,080	0,680	0,674	0,674	0,690	0,660
8T	6,5	1,055	1,074	1,073	1,076	1,076	1,077
8W	7,3	1,063	1,065	1,065	1,067	1,062	1,065
8X	7,5	1,065	1,063	1,063	1,061	1,060	1,061

Tabela C.32: Curva de ácido ascórbico usando o método com Fe^{3+} – Seção 8.3 da Metodologia

Concentração de redutor ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	Absorbância em 508,8 nm
0,00	0,034
0,32	0,073
0,64	0,117
1,28	0,197
2,57	0,360
5,13	0,682
10,3	1,318

Tabela C.33: Curva de ácido ascórbico usando o método com DPPH• – Seção 8.3 da Metodologia

Concentração de redutor ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	Absorbância em 517 nm
0,00	0,941
0,88	0,849
1,75	0,742
3,50	0,512
5,26	0,289

Tabela C.34: Efeito da radiação UV – Seção 8.4.1 da Metodologia

Tempo de exposição (min.)	Absorbância em 508,8 nm			
	254 nm	365 nm	Lâmpadas fluorescentes	Escuro
0	0,029	0,028	0,028	0,028
10	0,255	0,176	0,028	0,028
20	0,604	0,712	0,031	0,031
30	0,991	0,965	0,037	0,031
40	1,193	1,671	0,039	0,033
50	1,415	1,867	0,040	0,033
80	1,925	1,947	0,050	0,035

Tabela C.35: Efeito do solvente – Seção 8.4.2 da Metodologia

Solvente	Absorbância em 508,8 nm					
	Solução de Fe ³⁺ (10,0 µg.mL ⁻¹)			Solução de Fe ²⁺ (10,0 µg.mL ⁻¹)		
Água (referência)	0,025	0,027	0,026	1,956	1,930	1,943
Etanol	0,026	0,025	0,027	1,942	1,956	1,928
Metanol	0,028	0,029	0,026	1,959	1,935	1,947
Acetona	0,028	0,029	0,027	1,931	1,961	1,946
DMF	0,049	0,050	0,048	1,923	1,936	1,949
DMSO	0,026	0,028	0,029	1,945	1,956	1,934
Etilenoglicol	0,041	0,039	0,039	1,931	1,959	1,945

Tabela C.36: Efeito de ligantes presentes nos extratos – Seção 8.4.3 da Metodologia

Extrato	Concentração (µg.mL ⁻¹)	Absorbância em 508,8 nm
4E	7,1	0,018
4I	6,9	0,009
4J	6,8	0,011
	2,0	0,030
	3,0	0,024
5L	4,1	0,030
	5,1	0,032
	10,2	0,053
	2,1	0,033
	3,1	0,050
6P	4,1	0,048
	5,2	0,053
	10,4	0,058
7S	9,7	0,029
8T	6,5	0,046
8W	7,3	0,025
8X	7,5	0,017

Tabela C.37: Efeito de íons – Seção 8.4.4 da Metodologia

Íon / Referência	Conc. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Absorbância em 508,8 nm						
		Íon metálico + Fen	Solução de Fe^{3+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$)			Solução de Fe^{2+} ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$)		
Referência	-	-	0,032	0,027	0,031	1,966	1,940	1,953
Co^{2+}	2,00	0,006	0,391	0,391	0,395	1,940	1,930	1,944
Cu^{2+}	2,00	0,003	0,034	0,028	0,028	1,952	1,944	1,944
Ni^{2+}	2,00	0,001	0,028	0,029	0,028	1,948	1,946	1,952
Mn^{2+}	2,00	0,003	0,061	0,062	0,066	1,954	1,956	1,958
Al^{3+}	2,00	0,002	0,027	0,027	0,028	1,954	1,966	1,946
Sn^{2+}	2,00	0,001	0,270	0,271	0,276	1,960	1,952	1,954
Zn^{2+}	2,00	0,002	0,028	0,029	0,030	1,954	1,956	1,952
Ca^{2+}	100	0,000	0,036	0,034	0,035	1,958	1,958	1,932
Mg^{2+}	40,0	0,000	0,034	0,033	0,032	1,946	1,944	1,926
Na^+	111	0,000	0,032	0,034	0,032	1,976	1,968	1,954
K^+	200	0,010	0,034	0,032	0,035	1,948	1,954	1,936
NH_4^+	300	-	0,038	0,042	0,040	1,952	1,956	1,938
PO_4^{3-}	40,1	-	0,070	0,071	0,069	1,466	1,445	1,428
PO_4^{3-}	20,1	-	0,035	0,035	0,031	1,829	1,807	1,797
PO_4^{3-}	10,0	-	-	-	-	1,969	1,939	1,918
PO_4^{3-}	5,01	-	-	-	-	1,971	1,947	1,929
SO_4^{2-}	158	-	0,034	0,033	0,032	1,946	1,944	1,926
Cl^-	181	-	0,034	0,032	0,035	1,948	1,954	1,936
NO_3^-	300	-	0,032	0,034	0,032	1,976	1,968	1,954

ANEXO A – DESCARTE DE RESÍDUOS CONTENDO 1,10-FENANTROLINA

O reagente 1,10-fenantrolina não deve ser descartado diretamente ao esgoto. Se existir um sistema de descarte de resíduos orgânicos, este deverá ser usado. O procedimento descrito a seguir tem como objetivo oxidar o reagente antes de ser descartado, o qual é discutido em *Prudent Practices in the Laboratory: Handling and Disposal of Chemicals*, publicado pela National Academy of Sciences.

1. Acidifique a solução de fenantrolina com um volume igual de H₂SO₄ 1,5 M.
2. Adicione lentamente uma quantidade suficiente de KMnO₄ 0,2 M de modo que a relação molar permanganato/fenantrolina seja de 20:1. Se ferro estiver presente, uma quantidade adicional de permanganato será necessária para oxidar o Fe²⁺ que se encontrar em solução. Mantenha em constante agitação durante 12 horas. Se a cor púrpura desaparecer, adicione mais permanganato para assegurar a oxidação.
3. Neutralize a solução com bicarbonato de sódio.
4. Adicione bissulfito de sódio ou sulfito de sódio até que a cor púrpura desapareça.
5. Deixe a solução em repouso e despeje o líquido claro na pia com água em excesso. Descarte o sólido marrom no lixo regular.