



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
Centro de Ciências e Qualidade dos Alimentos

BRUNA GAIGHER

**MODELO DE DIGESTÃO *IN VITRO*/CÉLULAS CACO-2 PARA
ESTIMAR A BIODISPONIBILIDADE DO FERRO EM FORMULAÇÕES
CONTENDO Fe-PEPTÍDEOS**

CAMPINAS

2019

BRUNA GAIGHER

**MODELO DE DIGESTÃO *IN VITRO*/CÉLULAS CACO-2 PARA
ESTIMAR A BIODISPONIBILIDADE DO FERRO EM FORMULAÇÕES
CONTENDO Fe-PEPTÍDEOS**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.*

Aluna: Bruna Gaigher

Orientadora: Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Bruna Gaigher e orientada pela Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco.

CAMPINAS

2019

**O presente trabalho foi realizado com apoio das Agência (s):
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
Nº do proc.: 2016/12660-3 e Nº do proc.: 2017/17554-0 e
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.**

Ficha Catalográfica
Biblioteca do Instituto de Tecnologia de Alimentos
Elaborado por: Lucilene Paulina da Silva – CRB 8/8507

G137m Gaigher, Bruna.

Modelo de digestão *in vitro* / células caco-2 para estimar a biodisponibilidade do ferro em formulações contendo Fe-peptídeos. Bruna Gaigher / Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. - Campinas, SP: ITAL, 2019.

77 f.

Orientador: PhD. Maria Teresa Bertoldo Pacheco.

1. Fe-peptídeo. 2. Ativo microencapsulado. 3. Bioacessibilidade. 4. Células caco-2. 5. Dialisabilidade. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA). II. Gaigher, Bruna. III. Título.

Título em inglês: *In vitro* digestion model / Caco-2 cells for estimating iron bioavailability in formulations containing Fe-peptides

Key-words: Fe-peptide, hydrolyzate, bioaccessibility, whey.

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco, Dra. Maria Elisa Caetano Silva Abreu, Dr. Marcelo Antônio Morgano.

Data da Defesa: 28/06/2019

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Bruna Gaigher, aprovada pela Comissão Julgadora em 28 de Junho de 2019.

Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco
CCQA/ ITAL (Presidente)

Dra. Maria Elisa Caetano Silva Abreu
CCQA/ ITAL (titular)

Dr. Marcelo Antônio Morgano
CCQA/ ITAL (titular)

Dra. Fabiana Andrea Barrera Galland
(suplente)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista à minha família, principalmente ao meu pai e minha tia Mara.

E à minha mãe que me guia sempre para o melhor caminho e estará eternamente nos meus pensamentos.

Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento da pesquisa (Projeto 2016/12660-3) e a concessão da bolsa TT-3 (Projeto 2017/17554-0). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço ao apoio de cada pessoa que cruzou o meu caminho durante esta jornada, ao carinho e generosidade de todas estas que me ajudaram a concretizar meus objetivos e a ser uma pessoa melhor a cada dia. Hoje só tenho a agradecer à Deus por todos os anjos que apareceram no meu caminho.

À Profa. Dra. Maria Teresa, pela orientação, apoio e amizade. Obrigada por todo conhecimento compartilhado, pela oportunidade e confiança.

Ao pessoal do Laboratório do CCQA do ITAL. Obrigada por todos os ensinamentos, auxílio, companhia, almoços, cafés, choros e risadas! Às amigas verdadeiras que levarei para minha vida.

Agradeço à Magali e Rosana, pela paciência e apoio de sempre no laboratório.

À Raquel, por todo conhecimento compartilhado e flexibilidade para a realização das análises.

À Profa. Solange Cadore, pela concessão da parceria com o laboratório de química da UNICAMP.

Agradeço ao Vitor e à Dra. Emanuelli do Nascimento da Silva, do departamento de química da UNICAMP, pela generosidade, apoio e conhecimentos compartilhados.

A toda minha família, principalmente ao meu pai e minha tia Mara, por estarem sempre por perto.

Às meninas do ballet, pelas risadas e descontração nos momentos difíceis.

Às meninas de João Pessoa, por todos os momentos de conhecimento e diversão compartilhados.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que me dedicaram afeto, energia positiva, torceram e contribuíram para que a concretização deste trabalho fosse possível!

“Das pedras do rio às irmãs estrelas; das árvores aos insetos; dos quatro elementos ao Pai Céu. Estamos todos relacionados. Somos todos integrantes do círculo infinito da consciência. Somos todos parte de um Todo infinito que se manifesta de forma singular em cada um de nós. Eu reverencio o Eu e o Sagrado que residem em você”. **Mitakuye Oyasín**

RESUMO

O ferro constitui um dos elementos traço essencial da nutrição humana. Dado ao elevado percentual de indivíduos deficientes em ferro, tem ocorrido grande interesse no estudo do potencial de novos peptídeos quelantes de metais, os quais, ao serem disponibilizados como suplementos alimentares apresentem estabilidade e biodisponibilidade do mineral. Este projeto teve como objetivo avaliar a bioacessibilidade e biodisponibilidade do ferro complexado à peptídeos (ativo), das micropartículas contendo ativo e das formulações contendo as micropartículas. Os peptídeos de baixo peso molecular foram obtidos a partir das proteínas do soro de leite hidrolisadas com alcalase[®]. Para compor o ativo foram estudadas diferentes proporções de peptídeos para ferro, para a formação de complexos Fe-peptídeo, assim como o material de parede. As micropartículas foram obtidas pela técnica de *spray drying* tendo como material de parede a maltodextrina e a polidextrose. As misturas secas para bebidas, contendo micropartículas com complexos de Fe-peptídeos, foram elaboradas nos sabores de tangerina, morango e chocolate. Todos os complexos, micropartículas e formulações foram caracterizadas e avaliadas quanto à bioacessibilidade e biodisponibilidade do ferro *in vitro*, segundo métodos de solubilidade, dialisabilidade e cultura de células (Caco-2). Foi selecionada a proporção de 10:1 de peptídeo: ferro, pois apresentou desempenho desejável no processo de disponibilizar o mineral para os diferentes ensaios de bioacessibilidade (93 % de Fe solúvel, 89% de Fe solúvel após digestão; 49% de Fe dialisado) e biodisponibilidade (56 %). O complexo Fe-peptídeo apresentou maior solubilidade (39,12%), bioacessibilidade (19,84 %) e biodisponibilidade (34,85 %) que o sal de sulfato ferroso (10,17%;12,86%; 9,72%, respectivamente). Foi testada a otimização do método de ARGYRI et al, 2009 através da adaptação do método da digestão de MINEKUS et al (2014) para o sistema de ARGYRI et al (2009) que ratificou os resultados obtidos pelo método de digestão de ARGYRI, para as diferentes proporções avaliadas neste estudo. O método de ARGYRI se mostrou preditivo para absorção do ferro para o modelo celular com linhagens de Caco-2. A presença de ácido ascórbico e cítrico nas formulações de tangerina e morango contribui para a absorção do ferro segundo os resultados obtidos para a

bioacessibilidade (36,76 %; 29,98 %, respectivamente) e estimativa de biodisponibilidade do mineral (80,53%; 84,13% respectivamente). O sabor chocolate mostrou desfavorável a disponibilização do ferro (14,31% Fe dialisado e 33,63% biodisponível), provavelmente devido a presença do cacau e goma para prover a consistência viscosa característica da bebida. Tanto as micropartículas como as formulações foram efetivas em disponibilizar o ferro.

Palavras-chave: Fe-peptídeo; ativo microencapsulado; bioacessibilidade; Células caco-2, dialisabilidade.

ABSTRACT

Iron is one of the essential trace elements of human nutrition. Given the high percentage of iron-deficient individuals, there has been great interest in the study of the potential of new metal chelating peptides, which, when made available as food supplements, present stability and bioavailability of the mineral. This project aimed to evaluate the bioaccessibility and bioavailability of the complexed iron to peptides (active), the microencapsulated active and the microcapsules containing the active added to formulations. Low molecular weight peptides were obtained from whey proteins hydrolyzed with alcalase[®]. To compose the active, different proportions of iron peptides were studied for the formation of Fe-peptide complexes, as well as the wall material. The microparticles were obtained by the spray drying technique having as a wall material maltodextrin and polydextrose. Three flavors of dry beverage mixtures containing microparticles with Fe-peptide complexes were prepared. The formulations were elaborated with tangerine, strawberry and chocolate flavors. All complexes, microcapsules and formulations were characterized and evaluated for bioavailability and bioavailability of iron in vitro, according to methods of solubility, dialysability and cell culture (Caco-2), respectively. The 10: 1 ratio of peptide: iron was selected because it presented a desirable performance in the process of making the mineral available for bioaccessibility assays (93 %; 89%; 49%) and bioavailability assays (56 %). The microencapsulation process of the Fe-peptide complex presented higher solubility (39,12%), bioaccessibility (19,84 %) and bioavailability (34,85 %) than the ferrous sulfate salt (control sample) for the three assays (10,17%;12,86%; 9,72% respectively). The adaptation of the digestion method of Minekus et al (2014) to the system of ARGYRI et al (2009) ratified the results obtained by the ARGYRI

digestion method, for the different proportions evaluated in this study. The ARGYRI method was shown to be predictive of iron uptake into the cell model with Caco-2 strains. The presence of ascorbic and citric acid in mandarin and strawberry formulations contributes to the absorption of iron according to the results obtained for the bioaccessibility (36,76 %; 29,98 %, respectively) and estimation of mineral bioavailability (80,53%; 84,13% respectively) The chocolate flavor showed unfavorable availability of the iron (14,31% dialysed and 33,63% bioavailable), probably due to the presence of cocoa and gums to provide the viscous consistency characteristic of the beverage. Both the microparticles and the formulations were effective in making the iron available.

Key words: Fe-peptide; microencapsulated active; bioaccessibility; bioavailability; Caco-2 cell, dialysability

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo principal.....	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Ferro.....	4
3.2. Anemia Ferropriva.....	4
3.3. metabolismo do ferro.....	6
3.4 Formas do ferro na dieta e biodisponibilidade.....	8
3.5 Hidrolisados de soro de leite	10
3.6 Peptídeos como agentes carreadores de ferro.....	11
3.7. Microencapsulação de complexos Fe- peptídeos	15
3.8. Técnica de spray dryer	18
3.9. Definição de bioacessibilidade e biodisponibilidade do ferro	19
3.9.1. Solubilidade	21
3.9.2. Dialisabilidade.....	22
3.9.3. Cultivo Celular	23
3.10. Facilitadores e inibidores da absorção do ferro	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. MATERIAL	25
4.1.1 Matéria prima	25
4.1.1.1. Ingredientes das formulações.....	26

4.1.2	Reagentes e soluções.....	26
4.2.	MÉTODOS.....	26
4.2.1.	Caracterização da matéria-prima, hidrolisado, fração <5 kDa, formulações contendo Fe-peptídeos.....	27
4.2.1.1.	Determinação de proteína total	27
4.2.1.2.	Determinação de umidade.....	28
4.2.1.3.	Perfil de aminoácidos totais e livres.....	28
4.2.2.	Hidrolise enzimática do isolado de soro de leite e fracionamento.....	30
4.2.3.	Perfil de aminoácidos por eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE).....	30
4.2.4.	Grau de hidrólise.....	31
4.2.5.	Definição da proporção de peptídeos: ferro para síntese de complexos Fe-peptídeos.....	30
4.2.6.	Avaliação da capacidade ligante dos peptídeos.....	32
4.2.6.1.	Determinação do ferro.....	32
4.2.7.	Complexação do Fe-peptídeo.....	33
4.2.8.	Formulação das micropartículas pela técnica de <i>spray dryer</i>	33
4.2.9.	Elaboração das formulações.....	34
4.2.10.	Bioacessibilidade do ferro	35
4.2.10.1.	Solubilidade do ferro	35
4.2.10.2.	Dialisabilidade do Fe	41
4.2.11.	Estimativa da biodisponibilidade do ferro.....	44
4.2.12.	Análise estatística	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1.	Caracterização da matéria-prima.....	49
5.2.	Caracterização do perfil aminoacídico do hidrolisado com enzima Alcalase.....	50
5.3.	Eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE) dos hidrolisados de IPS...52	
5.4.	Obtenção dos complexos Fe-peptídeos e ensaios de bioacessibilidade.....	53
5.4.1.	Otimização das condições de obtenção do complexo.....	53
5.4.2.	Capacidade ligante dos peptídeos pelo método DE LA HOZ et al. (2014a) modificado.....	55

5.4.3. Dialisabilidade e estimativa da biodisponibilidade dos complexos Fe-peptídeos nas diferentes proporções peptídeos: ferro.....	57
5.5. Otimização da obtenção das micropartículas contendo os complexos Fe-peptídeo e ensaios de bioacessibilidade.....	61
5.5.1. Produção das micropartículas contendo Fe-peptídeos.....	61
5.6. Estudo do comportamento das micropartículas.....	63
5.7. Estudo das formulações: ensaios de bioacessibilidade e estimativa da biodisponibilidade.....	63
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

°C – Graus Celsius

Caco-2 - Células do epitélio do cólon humano

CaCl₂ (H₂O)₂ – Cloreto de cálcio

cm² - Centímetros quadrados

Co²⁺- Cobalto

CO₂ – Gás carbônico

Cu²⁺ - Cobre

DAB- 4-Dimetilaminobenzaldeído

Dcytb - Citocromo b duodenal

DI - Diâmetro interno

DMEM – Meio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

DMT-1- Transportador de metal divalente

D-PBS- Tampão (Dulbecco Phosphate Buffered Saline)

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EROS- Espécies reativas de oxigênio

FeCl₂ - Cloreto ferroso

Fe³⁺- Ferro férrico

Fe²⁺ - Ferro ferroso

Fe-heme- Ferro heme

Fe-peptídeos – Complexos de ferro e peptídeos

Fe-P- Ferro-peptídeo

FePP - Pirofosfato férrico

Fe-S - Ferro-enxofre

FeSO₄ – Sulfato ferroso

g- gramas

g- Força G

GH- Grau de hidrólise

h- Horas

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

Hb- Hemoglobina

HCl – Ácido clorídrico
HCP1- Proteína heme transportadora 1
HFE- Proteína da hemocromatose
HPCE - Eletroforese capilar de alta performance
HPLC - Cromatógrafo líquido de alta eficiência
HPS- Hidrolisados proteicos de soro de leite
HT-29- Células do epitélio do cólon humano
IMAC - Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados
ICP OES- Espectrômetro de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente
IPS- Isolado se soro de leite
IRP-1, IRP-2 - Proteína reguladora de ferro
IU – Unidade internacional
kDa- quilodaltons
KCl – Cloreto de potássio
KH₂PO₄ – fosfato de potássio
kV – quilovolts
kW- quilowatts
LLC-PK1 - células suínas do epitélio do rim
M- Molar
m- metros
µg - micrograma
mbar - milésimos de bar
min- minutos
mL- mililitro
mM- milimols
MDCK células caninas
Mn²⁺ - Manganês
MgCl₂(H₂O)₆- cloreto de magnésio
MHz – Mega hertz
mOsm – milliosmol
NEAA- Non-Essential Amino Acids
nm. – nanômetros
NaCl – cloreto de sódio

NaHCO₃- bicarbonato de sódio
NaOH – hidróxido de sódio
(NH₄)₂CO₃- carbonato de amônio
NRAMP2 – do inglês: Natural resistance-associated macrophage protein 2
Nu: núcleo
OMS: Organização Mundial da Saúde
p/p- peso por peso
PNDS- pesquisa nacional de demografia e saúde
PNSF programa nacional de suplementação de ferro
PITC- fenilisotiocianato
PaO₂ - pressão parcial de oxigênio arterial
RDC Nº 259 – Resolução da Diretoria Colegiada
RF – radiofrequência
ROS – do inglês: Reactive oxygen species - espécies reativas de oxigênio
Rpm- rotações por minuto
s- segundos
SLC11A2- do inglês: Solute Carrier Family 11 Member 2.
TER - do inglês: Transepithelial Electrical Resistance- resistência elétrica transepitelial
T-84- células do epitélio do cólon humano
TfR: receptor da transferrina.
V/cm – volt por centímetro
v/v – volume por volume
WHO- Organização mundial da saúde
Zn²⁺ -Zinco

1. INTRODUÇÃO

O ferro é um micronutriente essencial para o metabolismo orgânico e sua deficiência é observada de forma mais acentuada em mulheres em idade fértil e crianças. A organização mundial da saúde (OMS) estima que um terço da população mundial seja anêmica, sendo a maioria por deficiência de ferro (DE BENOIST et al., 2008).

A deficiência de ferro pode representar risco de morte para mulheres anêmicas e seus filhos durante o período pré-natal, comprometer o desenvolvimento físico e mental de crianças com prejuízo na capacidade de aprendizagem (SZARFAC, 2010; ZHANG; GHOSH; ROUAULT, 2014) com reflexos na fase adulta, onde manifestam redução na capacidade de trabalho físico e produtividade dos trabalhadores manuais (REN et al., 2011).

Os custos gerados pela anemia por deficiência de ferro devido à perda da produtividade física têm sido calculados por volta 0.57% do produto interno bruto em países de baixa e média renda (WHO, 2016). Tendo em vista que 800 milhões de crianças e mulheres estejam afetadas pela anemia, sua redução se tornou alvo de prioridade para nutrição global projetada para 2025 pela Organização Mundial de Saúde. Principalmente em países de baixa renda, onde a prevalência de anemia continua a ser elevada (WHO, 2016).

A pesquisa nacional de demografia e saúde (PNDS) da criança e da mulher de 2006 apresentou que a prevalência de deficiência de ferro entre crianças menores de 5 anos no Brasil é de 20,9%, o equivalente à aproximadamente 3 milhões de crianças brasileiras. O nordeste, sudeste e sul são as regiões que apresentaram as maiores prevalências, correspondentes a 25,5%, 22,6% e 21,5% respectivamente. A região norte (10,4%) e centro-oeste (11,0%) apresentaram as prevalências mais baixas, provavelmente devido à escassez de dados provenientes dessas regiões. Porém, outros estudos realizados em alguns nichos de diferentes locais apresentaram prevalência de anemia em crianças superior a 50% (SPINELLI et al., 2005; JORDÃO; BERNARDI; BARROS FILHO, 2009; VIEIRA et al., 2007).

A fortificação de alimentos se refere à adição de elementos traços e vitaminas aos produtos alimentícios. Esta prática tem como objetivo de melhorar a sua qualidade nutricional e mesmo tempo proporcionar algum benefício, com o mínimo de risco à saúde da população. Embora a fortificação seja considerada relativamente simples para prevenir a deficiência de minerais (HURREL, 2002) e adotada em muitos países, ainda é um grande desafio para indústria alimentícia. Em relação ao ferro, as dificuldades são referentes à biodisponibilidade do mineral, estabilidade oxidativa e também alterações sensoriais dos alimentos (CAETANO-SILVA et al., 2015).

No Brasil foram adotadas duas grandes ações: 1) a fortificação obrigatória de farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico; e 2) a efetivação do programa nacional de suplementação de ferro (PNSF) para crianças e gestantes (Brasil, 2013). O PNSF distribui gratuitamente nos postos de saúde o sal de ferro, principalmente na forma de sulfato ferroso. Contudo, o ferro quando ingerido na forma de sal, apresenta baixa biodisponibilidade, pode promover a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e ainda causar irritações na mucosa gástrica (MOETY et al., 2017)

Para superar esse obstáculo técnico, muitos estudos têm apresentado os compostos de ferro insolúvel, pouco solúvel ou fortemente quelados (EDTA), como mais apropriados para serem utilizados pela indústria, uma vez que apresentam sua reatividade química reduzida. No entanto, para que ocorra a absorção efetiva de ferro inorgânico são necessárias tanto a solubilidade como a disponibilidade química. Neste contexto, os transportadores orgânicos de ferro são considerados os compostos mais adequados por oferecer um equilíbrio dessas propriedades (PRENTICE et al., 2017).

Os hidrolisados produzidos a partir de diferentes fontes de proteína alimentares geram pequenos peptídeos, os quais combinados com oligoelementos formam complexos que podem ser diretamente absorvidos no intestino delgado (WANG; HUANG; JIANG, 2013). Em relação às fontes de peptídeos, estudos demonstram que os peptídeos gerados a partir da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite, apresentam algumas ações fisiológicas e por isso são denominados peptídeos bioativos. Dentre as ações dos peptídeos

encontra-se a capacidade de se ligar a minerais e servir como carreadores dos mesmos (GAUCHERON, 2000; KIM et al., 2007; DE LA HOZ et al., 2014b).

Peptídeos gerados a partir das proteínas do soro de leite tem sido apontado como eficientes quelantes de ferro e, portanto, promissores ingredientes na elaboração de suplementos minerais, para uso no tratamento da anemia ferropriva (ZHOU et al., 2012; DE LA HOZ et al., 2014b). Assim, considerando que a recomendação da suplementação oral de ferro vem sendo consolidada como uma das intervenções que podem efetivamente reduzir a prevalência da anemia ferropriva (WHO, 2016) e em resposta às dificuldades atuais desta suplementação, este projeto visa avaliar a biodisponibilidade in vitro deste mineral, em micropartículas contendo o complexo e adicionadas a misturas secas para bebidas, desenvolvidas a partir de complexos Fe-peptídeos sorolácteos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar a bioacessibilidade e biodisponibilidade do ferro em formulações secas para bebidas contendo micropartículas carreadoras do complexo de Fe-peptídeos, obtidos a partir de hidrolisados fracionados de proteínas de soro de leite.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a matéria prima quanto à composição química.
- Obter o hidrolisado de proteínas de soro de leite com a enzima Alcalase[®] em condições pré-estabelecidas.
- Realizar o fracionamento em ultrafiltração para obter a fração de peptídeos menores que 5 kDa.
- Sintetizar os complexos de Fe-peptídeos soro lácteos.
- Avaliar a melhor proporção entre os compostos peptídeo:ferro que apresentem melhor solubilidade e dialisabilidade in vitro.
- Obter as micropartículas de complexos Fe-peptídeos pela técnica de spray dryer.

- Avaliar a bioacessibilidade e a biodisponibilidade *in vitro* do ferro em 03 etapas:
 - 1°- Complexos Fe-peptídeos (ativo)
 - 2°- Micropartículas contendo ativo
 - 3°- 03 tipos de formulações secas para compor uma bebida hidrossolúvel.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Ferro

O ferro é um elemento traço indispensável para a vida celular. Como constituinte heme participa da hemoglobina, mioglobina, citocromos (proteínas da membrana que contêm grupos heme e transportam elétrons) e síntese de enzimas, sendo essencial para respiração celular, função mitocondrial e produção de energia. Como cofator ferro-enxofre [Fe-S], o ferro é essencial para o grupo prostético de muitas enzimas envolvidas em diversos processos celulares, como respiração e proliferação celular, reparação de DNA e ainda na síntese de ferro heme (COZZOLINO, 2009; CAETANO-SILVA et al., 2015; CAMASCHELLA, 2017).

Adultos saudáveis contêm de 4 a 5 g de ferro no organismo, sendo que aproximadamente 65% está presente na hemoglobina, 30-35 % armazenado no fígado como ferritina e 1-2 % na forma de grupos ferro-enxofre ou heme em centros catalíticos de numerosas enzimas e complexos proteicos (ABBASPOUR; HURRELL; KELISHADI, 2014; ZHANG; GHOSH; ROUAULT, 2014).

A deficiência de ferro está associada à fadiga, síndrome das pernas cansadas e picamalácia em adultos, retardo no crescimento e desenvolvimento em neonatos com redução da capacidade de aprendizado e anormalidades comportamentais em adolescentes (AUERBACH; ADAMSON, 2017; ZHANG; GHOSH; ROUAULT, 2014).

3.2 Anemia ferropriva

A anemia é definida como um estado em que ocorre a baixa concentração de hemoglobina no sangue em consequência da carência de um ou mais nutrientes essenciais, independente da origem destas carências. A anemia por deficiência de ferro corresponde a um longo período de balanço negativo entre a quantidade de ferro biologicamente disponível e a necessidade orgânica deste mineral (WHO, 2001).

Parte da deficiência de ferro que causa a anemia é atribuída a fatores como: baixa ingestão deste mineral, absorção reduzida devido à presença de fitatos ou compostos fenólicos no alimento, alguns estágios de vida onde os requerimentos de ferro são especialmente elevados, como o crescimento e a gravidez (HURREL, 2002), baixo nível socioeconômico e educacional, presença de infestações endêmicas (malária, ascaridíase, helmintoses, protozooses intestinais), além da relação com hemorragias diversas, como as atribuídas à traumas ou melena, hematêmese, hemoptise, menstruações, partos ou por múltiplas gestações (BRASIL, 2014).

As gestantes têm maior risco de desenvolver a deficiência de ferro e anemia por deficiência de ferro pelo aumento do requerimento fisiológico deste mineral nesta fase, que é difícil de ser suprido apenas pela dieta, além da perda sanguínea que pode ocorrer durante o parto. A anemia pode causar menor ganho de peso durante a gestação, maiores riscos de partos prematuros, placenta prévia, hemorragias, ruptura prematura de membranas, pré-eclâmpsia, eclâmpsia, sepses pós-natal, além de maior risco de morte, menor desempenho laboral, fadiga, fraqueza e dispneia, assim como maiores complicações para o feto como baixo peso ao nascer, prematuridade, mortalidade natal, anemia neonatal, falha do desenvolvimento pela anemia e pobre desenvolvimento intelectual (NORONHA; KHASAWNEH, 2012).

Em relação aos recém-nascidos, todos têm um declínio da sua hemoglobina (Hb) ao nascer pelo aumento da PaO₂ (pressão parcial de oxigênio arterial) e da saturação da Hb após o nascimento. Para o recém-nascido de baixo peso (menos de 1.500 g) e para os prematuros, o risco é agravado pela grande frequência de retiradas de amostras de sangue para exames, menor sobrevida

das hemácias e crescimento muito acelerado, além de apresentarem menores reservas de ferro e pela incapacidade de regular a absorção de ferro pelo trato gastrointestinal (TAYLOR; KENNEDY, 2013). Já o recém-nascido a termo, sem ingestão suficiente de ferro, provavelmente ficará numa condição anêmica quando terminarem seus estoques de ferro, após três meses de depleção, correspondendo aos seis ou nove meses de vida (BRASIL, 2014). A ingestão insuficiente de ferro pode estar relacionada à alimentação prolongada e exclusiva de leite materno que pode ocasionar deficiências de ferro e outros micronutrientes e anemia (PASRICHA et al., 2011).

Sendo assim, segundo WHO (2015), uma meta prioritária na nutrição global projetada para 2025 é a redução da anemia em mulheres e crianças principalmente em países de baixa renda, onde a prevalência de anemia persiste elevada.

3.3. Metabolismo do ferro

O papel do ferro nos processos fisiológicos gira em torno da capacidade do metal de existir em dois estados de oxidação [férico (Fe^{3+}) e ferroso (Fe^{2+})]. Esta propriedade química do ferro está implícita à sua capacidade de participar em reações de oxirredução (transferência de elétrons), o que também leva ao seu potencial de toxicidade, caso não seja adequadamente utilizado por células e tecidos (GULEC; ANDERSON; COLLINS, 2014).

Ao mesmo tempo em que a deficiência de ferro acarreta consequências para todo o organismo, sendo a anemia a manifestação mais relevante, por outro lado, o acúmulo ou excesso de ferro é extremamente nocivo para os tecidos (GROTTO, 2008). O ferro livre promove a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) que são tóxicas e degradam proteínas, lipídeos e DNA (ZHANG; GHOSH; ROUAULT, 2014).

A regulação da absorção deste mineral, portanto, é de extrema significância para a manutenção da homeostase do ferro (PRENTICE et al., 2016). Ao contrário da maioria dos nutrientes essenciais, não existe nenhum mecanismo excretor ativo para o ferro, embora pequenas quantidades sejam perdidas através da esfoliação da pele e das células gastrointestinais, na bile e na urina. Os níveis de ferro do corpo são, portanto, controlados principalmente por

modulação da absorção de ferro no duodeno e no jejuno proximal, o que permite que a absorção seja precisamente combinada com perdas não reguladas (GULEC; ANDERSON; COLLINS, 2014).

Os mecanismos que regulam a absorção de ferro permitem um aumento ou diminuição da absorção de acordo com a demanda fisiológica (GULEC; ANDERSON; COLLINS, 2014). Os dois mecanismos que mantem a homeostase do ferro são: intracelular, de acordo com a quantidade de ferro presente na célula, e o outro sistêmico, no qual a hepcidina tem papel de destaque (ANTUNES, 2016).

A hepcidina é um peptídeo sintetizado e secretado por várias células, sendo os hepatócitos seu principal sítio de produção (ANTUNES, 2016). A principal ação desse peptídeo é controlar o ferro plasmático, em que uma alta expressão de hepcidina diminui o ferro plasmático, enquanto sua baixa expressão aumenta a concentração de ferro circulante (ANTUNES, 2016). Portanto, sua função é bloquear a absorção intestinal de ferro e inibir a liberação de ferro das reservas (GULEC; ANDERSON; COLLINS, 2014).

O mecanismo, pelo qual o peptídeo hepcidina exerce influência na homeostase do ferro, ocorre através da sua ligação à proteína denominada ferroportina. Esta proteína está presente na membrana celular de macrófagos, enterócitos, hepatócitos e sinciciotrofblastos placentários, impedindo a saída de ferro das células. Após a formação do complexo hepcidina-ferroportina, há sinalização para redução da saída do ferro, na qual o ferro é internalizado e posteriormente degradado nos lisossomas (PREZA et al., 2013). Vale ressaltar que a ferroportina é o único poro por onde ocorre a saída de ferro das células. Embora a ferroportina seja um transportador de outros metais como manganês, zinco e cobalto, sua maior afinidade é com o ferro (ANTUNES; CANZIANI, 2016).

Em relação ao controle intracelular, a primeira barreira que o ferro encontra em seu trajeto através do trato gastrointestinal é a borda em escova na membrana apical do enterócito duodenal, que compreende a células absorventes especializadas do epitélio intestinal, envolvidas no transporte de ferro (MACKENZIE; IWASAKI; TSUJI, 2008; DONOVAN; ROY; ANDREWS, 2016).

O epitélio duodenal do intestino delgado é organizado em estruturas vilosas para maximizar sua área de superfície absorvente. Precursores de enterócitos

estão presentes em criptas nas bases das vilosidades, migrando para cima do eixo viloso à medida que se diferenciam. Extensões de membrana na superfície apical dos enterócitos formam uma borda em escova que aumenta a área de superfície disponível para a absorção. Os enterócitos maduros vivem por apenas 1-2 dias, e assim o ferro que se acumula dentro deles é perdido do corpo quando enterócitos senescentes são liberados no lúmen do intestino (DONOVAN; ROY; ANDREWS, 2016).

3.4. Formas do ferro na dieta e biodisponibilidade

A obtenção do ferro para utilização do organismo é proveniente de duas fontes principais, sendo uma delas a dieta e a outra a reciclagem de hemácias senescentes (GROTTO, 2008).

O ferro proveniente da dieta pode ser encontrado de duas formas: na forma heme e não heme. A forma heme está presente em alimentos de origem animal (hemoglobina, mioglobina), como carnes e vísceras, de elevada biodisponibilidade. A forma não heme está presente em alimentos de origem vegetal, como cereais e hortaliças escuras, apresenta absorção reduzida pelo fato de ser fortemente ligado a vários outros componentes da dieta (HURRELL, 2002; ABBASPOUR; HURRELL; KELISHADI, 2014).

Proteínas envolvidas na absorção de ferro, heme e não heme, residem na membrana do enterócito da borda em escova. A absorção do ferro heme proveniente da dieta ocorre através de um receptor de heme em membranas da borda em escova duodenal denominada proteína heme transportadora 1 (HCP1). Uma vez que o ferro heme da dieta (mioglobina ou hemoglobina) tenha entrado na célula epitelial do intestino, é provável que seja clivado pela enzima intracelular heme-oxigenase 1 para liberar ferro. Posteriormente, se associa ao mesmo local intracelular que o ferro não heme como ilustrado na Figura1 (DONOVAN; ROY; ANDREWS, 2016).

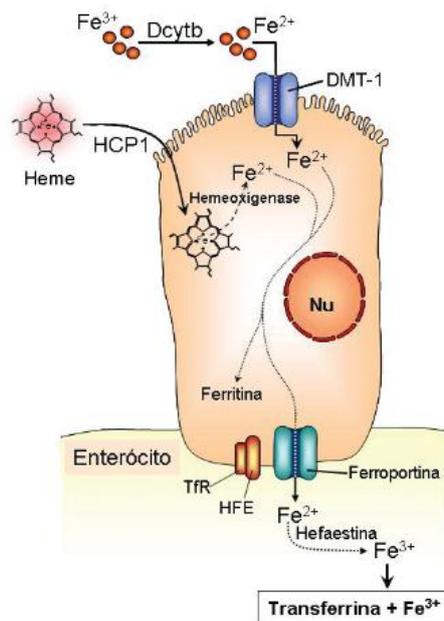


Figura 1- O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro. Legenda: Dcytb: ferredutase; DMT-1: transportador de metal divalente-1; HCP-1: proteína transportadora do heme-1; Nu: núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; TfR: receptor da transferrina. Fonte: GROTTTO, 2008.

A maior parte do ferro não heme da dieta está presente na forma férrica (Fe^{3+}). A biodisponibilidade de Fe^{3+} é muito reduzida, devido principalmente à falta de solubilidade no pH fisiológico do intestino. Por essa razão, os mamíferos desenvolveram um sistema de transporte eficiente baseado no transportador de metal divalente (DMT-1) (FABIANO, et al. 2018). O DMT-1 corresponde ao principal transportador envolvido na captação celular de ferro não heme, e é também conhecido como NRAMP2, DCT1 e SLC11A2. Como o próprio nome indica, o DMT1 transporta exclusivamente metais divalentes incluindo também Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} (DONOVAN; ROY; ANDREWS, 2016).

Com relação à biodisponibilidade de Fe^{3+} , sabe-se que em valores de pH superiores a 4 o íon Fe^{3+} forma espécies praticamente insolúveis (SALOVAARA; SANDBERG; ANDLID, 2002), sendo necessária a conversão luminal de Fe^{3+} para Fe^{2+} (DONOVAN; ROY; ANDREWS, 2016). Para esta conversão, estudos identificam uma enzima redutora na membrana da borda em escova denominada citocromo b duodenal (Dcytb). A Dcytb facilita a redução do ferro férrico via

transferência de elétrons do ascorbato intracelular e induz a absorção de ferro (GULEC; ANDERSON; COLLINS, 2014).

Portanto, para solubilizar o ferro ocorre redução enzimática de Fe^{3+} (férico) para Fe^{2+} (ferroso) e, quando na sua forma reduzida, o ferro é quelado. Este é então transportado para o interior da célula pelo transportador DMT-1. Subsequentemente, o ferro é transferido para o lado basolateral do enterócito, onde pode ser armazenado via ligação à ferritina (proteína responsável pelo armazenamento do ferro) ou atravessar a membrana e alcançar a circulação sistêmica (FABIANO et al., 2018).

Compostos que formam quelatos de baixa massa molecular, tais como o ácido ascórbico, açúcares e aminoácidos promovem a absorção do ferro (HURRELL, 2002).

3.5 Hidrolisados de soro de leite

O processo de hidrólise proteica consiste na clivagem química ou enzimática de moléculas de proteínas em pequenos peptídeos de tamanhos diversos e, eventualmente, em aminoácidos livres (ADLER-NISSEN, 1985).

A partir de 1940, os hidrolisados proteicos tiveram suas primeiras aplicações para finalidades médicas, usados na preparação de dietas especiais para alimentação enteral de bebês e manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas intactas. Contudo, foi na década de 70 que ocorreu um crescimento expressivo nos métodos de preparação e uso de hidrolisados proteicos, tanto para finalidades clínica e nutricional, como para a melhoria de propriedades funcionais tecnológicas e fisiológicas (PACHECO et al., 2005; CLEMENTE, 2000).

Várias tecnologias têm sido desenvolvidas para a produção de hidrolisados bioativos, principalmente tecnologias baseadas no uso de enzimas (LEDESMA et al., 2014). A hidrólise enzimática de proteínas é utilizada para modificar suas propriedades físico-químicas e funcionais, sem prejudicar seu valor nutritivo, contribuindo para melhorar as características de absorção intestinal (CARREIRA et al., 2011).

Alguns estudos destacam a funcionalidade das proteínas do soro de leite devido à presença de peptídeos bioativos, destacando aqueles com atividade

anti-hipertensiva, imunomodulatória, anticarcinogênica e carreadora de minerais (KIM; LIM, 2004; PACHECO; SGARBIERI, 2005). As diferentes atividades biológicas estão diretamente relacionadas à sequência dos aminoácidos presentes no fragmento peptídico, os quais são diversificados dependendo da especificidade de corte da enzima utilizada. Assim, se torna evidente, que o controle dos parâmetros hidrolíticos, que ocasionam modificações das proteínas constitui uma etapa importante na obtenção de produtos com qualidade nutricional elevada, propriedades funcionais desejáveis e características organolépticas agradáveis ao consumidor.

3.6 Peptídeos como agentes carreadores de ferro

Peptídeos quelantes de minerais têm a capacidade de aumentar a biodisponibilidade destes, uma vez que promovem a absorção do ferro mantendo-o solúvel, reduzindo o ferro férrico para ferro ferroso e promovendo o seu transporte através das membranas celulares intestinais (LI; JIANG ; HUANG, 2017).

A palavra quelato é oriunda do grego “chele” cuja tradução é pinça ou garra, devido à organização estrutural dos quelatos, que resultam do compartilhamento de elétrons entre um metal e um ligante (KRATZER; VOHRA, 1986).

Para formarem quelatos, os aminoácidos e peptídeos se ligam aos metais em mais de uma posição de sua estrutura, através de diferentes grupos funcionais, assegurando que o átomo de metal se torne parte de uma estrutura biologicamente estável, assim como organiza-se a molécula do grupo heme por exemplo (Figura 2). Aminoácidos e produtos da digestão proteica, tais como pequenos peptídeos, são excelentes ligantes por apresentarem no mínimo dois grupos funcionais (amino e hidroxila), permitindo a formação de uma estrutura em anel com o mineral (RUTZ; MURPHY, 2009).

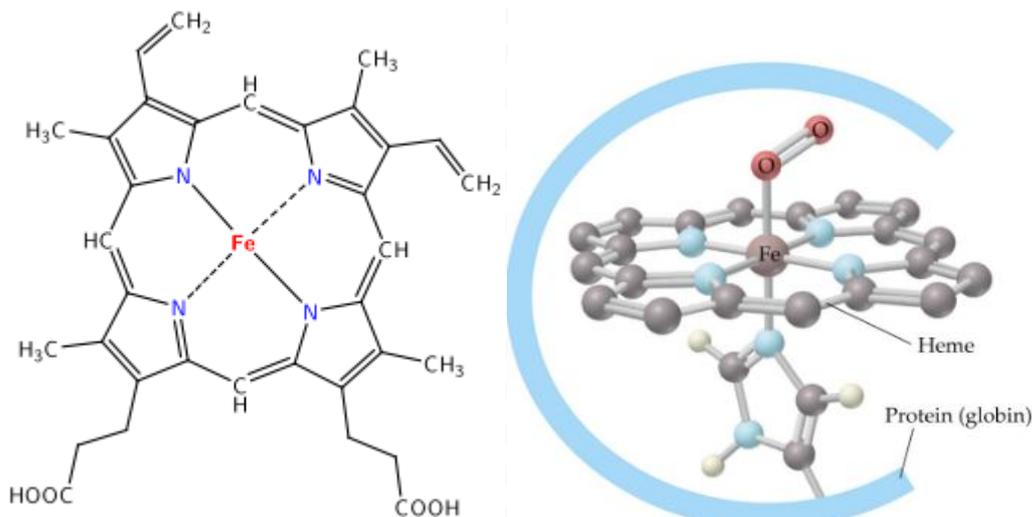


Figura 2- Estrutura do grupo heme. Fonte: (<https://patofisio.wordpress.com/2010/04/17/hemacias/>)

A hidrólise enzimática *in vitro* pode liberar peptídeos que são capazes de se ligar ao ferro, uma habilidade associada à aminoácidos específicos, como a histidina, lisina, cistina, ácido aspártico ou glutâmico (DE LA HOZ et al., 2014^a; OU et al., 2010; WU et al., 2012). Em geral, eles são aminoácidos com grupos funcionais capazes de formar ligações covalentes coordenadas.

O processamento de proteínas do soro de leite produz vários peptídeos bioativos que podem desencadear diversos efeitos fisiológicos no corpo humano, (MADUREIRA et al, 2010). Dentre estas ações biológicas, encontra-se a capacidade de se ligar à minerais e servir como carreadores dos mesmos (GAUCHERON, 2000; HURREL, 2002; KIM et al., 2007). Assim, estudos apontam estes peptídeos como eficientes quelantes de ferro e promissores ingredientes na elaboração de suplementos minerais para uso no tratamento da anemia ferropriva (KIM et al., 2007; ZHOU et al., 2012; DE LA HOZ et al., 2014b, CAETANO-SILVA et al., 2015).

Nove enzimas proteolíticas foram utilizadas por KIM et al. (2007) para hidrolisar as proteínas do soro de leite, com o objetivo de analisar a efetividade destes em quelar ferro. A capacidade quelante foi analisada mediante a solubilidade do ferro quelado, na qual os hidrolisados obtidos da hidrólise realizada com a enzima Alcalase[®] apresentaram a maior capacidade quelante (maior solubilidade do ferro) em relação aos derivados da hidrólise com as outras

enzimas. A reação de quelação foi realizada com pH ajustado para 5.0, o que indica a condição aniônica dos fragmentos proteicos hidrolisados, apresentando afinidade para ligar ao ferro.

Outro estudo realizado por ZHOU et al. (2012) avaliou a melhor condição de preparo de complexos de ferro com hidrolisados provenientes da β -lactoglobulina (proteína do soro de leite), além de caracterizar as transformações estruturais ocorridas da pré e pós quelação com ferro. Os resultados mostraram que os hidrolisados obtidos da β -lactoglobulina com a enzima Alcalase[®] apresentaram o rendimento mais alto de complexos com ferro utilizando a relação de 40:1 (proteína/ferro) e pH 7.0. Em relação às transformações estruturais, foi apresentado que alguns sítios de ligação amida foram alterados durante a quelação. Estas alterações mostraram que átomos de nitrogênio poderiam se ligar ao Fe^{3+} para formar ligações coordenadas por oferecer pares de elétrons, concluindo que os complexos de ferro formados com hidrolisados da β -lactoglobulina apresentam potencial para serem utilizados como suplementos de ferro.

DE LA HOZ et al. (2014 b) avaliou o índice de bioacessibilidade do ferro, em complexos Fe-peptídeos, utilizando peptídeos <5 kDa provenientes da hidrólise do isolado proteico de soro de leite com as enzimas pancreatina, alcalase[®] e flavourzyme[®]. Estes apresentaram estabilidade e solubilidade através da análise de dialisabilidade, na qual simula a digestão gastrointestinal *in vitro*. Os peptídeos <5 kDa apresentaram capacidade em quelar ferro independente da enzima utilizada para sua obtenção.

CAETANO-SILVA et al. (2015) utilizando as mesmas enzimas (Alcalase[®], pancreatina e flavourzyme[®]) para a hidrólise do isolado de soro de leite, avaliou a capacidade dos hidrolisados em se ligar ao ferro, utilizando como fonte de ferro o cloreto ferroso ($FeCl_2$) ou sulfato ferroso ($FeSO_4$). Para todos os hidrolisados, independente da enzima, as reações de complexação resultaram em elevada solubilidade em pH 7.0 comparadas ao controle (sem peptídeos). Porém, para isolar os peptídeos com afinidade ao ferro pelo sistema IMAC, foram utilizados apenas os hidrolisados obtidos da enzima pancreatina, uma vez que esta compreende à um sistema endógeno enzimático que libera pequenas quantidades de grandes peptídeos e grandes quantidades de pequenos peptídeos

como desejado para o estudo. Os hidrolisados da enzima pancreatina apresentaram capacidade em formar complexos de ferro com potencial para elevar sua biodisponibilidade e reduzir os efeitos pró-oxidantes.

Peptídeos com capacidade quelante de ferro foram obtidos pela hidrólise do isolado de soro de leite com as enzimas Alcalase[®], pancreatina e Flavourzyme[®]. Os hidrolisados < 5 kDa foram isolados por IMAC (cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados) e a sequência aminoacídica foi determinada por HPLC acoplado à espectrometria de massas. Este estudo apresentou a importância de caracterizar os peptídeos quelantes de ferro, uma vez que estas características ajudam a esclarecer a relação entre a estrutura e função dos peptídeos e a ação quelante de ferro, dando suporte à proposta do uso dos hidrolisados de soro de leite como ingredientes funcionais em tratamentos de suplementação de ferro (CRUZ-HUERTA et al., 2016; CAETANO-SILVA et al., 2017).

Pelo exposto acima é possível observar que ainda são poucos estudos que avaliam a bioacessibilidade e estimam a biodisponibilidade dos complexos de Fe-peptídeos, obtidos a partir dos hidrolisados proteicos de soro de leite (Tabela 1), e mais escassos ainda são os estudos que avaliam estes complexos em matrizes alimentícias.

Tabela1. Revisão bibliográfica de estudos realizados com peptídeos de soro de leite.

Autores	Enzimas	Maiores GH	Faixa de corte	Método de avaliação da capacidade quelante
Kim, et al (2007)	Esperase;Neutrase Papaina;Pepsina Protease; Tripsina Alcalase; Flavourzyme; Pancreatina	Pancreatina Alcalase Flavourzyme	-	Solubilidade do ferro ICP
Zhou, et al (2012)	Alcalase Neutrase Tripsina	Alcalase	10 kDa	Solubilidade do ferro ICP UV visível Espectro de fluorescência FTIR
De La Hoz, et al (2014)	Alcalase Flavourzyme Pancreatina	Alcalase	5 kDa	Solubilidade de ferro IMAC- FPLC Dialisabilidade in vitro ICP-OES
Caetano-Silva, et al (2015)	Alcalase Pancreatina, Flavourzyme	Pancreatina Alcalase Flavourzyme	5 kDa	Solubilidade de ferro IMAC- FPLC Dialisabilidade <i>in vitro</i> LC-MS/MS
Elvia Cruz-Huerta, et al(2016)	Alcalase, Pancreatina Flavourzyme	Alcalase Pancreatina Flavourzyme	5 kDa	IMAC- FPLC HPLC- MS/MS

16

Assim, a partir das condições que vêm sendo estudadas para obtenção de complexos de Fe-peptídeos, este projeto visou avaliar a bioacessibilidade e estimar a biodisponibilidade in vitro do ferro presente em formulações secas para bebida, contendo micropartículas como portadoras de complexos de Fe-peptídeos.

3.7. Microencapsulação de complexos Fe- peptídeos

Para combater a desnutrição de micronutrientes, três estratégias custo-efetivas podem ser aplicadas: fortificação de alimentos, enriquecimento de alimentos e suplementação de dieta (BRYSEWSKA et al., 2019). A fortificação de alimentos (adição de nutrientes aos alimentos, independentemente de esses nutrientes estarem originalmente presentes ou não nos alimentos) é frequentemente considerada como a abordagem mais eficaz de longo prazo, em termos de custo, para reduzir a deficiência de ferro (GERA, SACHDEV & BOY, 2012).

No entanto, a fortificação direta de alimentos com ferro é um desafio, pois pode resultar em alterações organolépticas indesejáveis na cor, odor e sabor dos alimentos (GAUCHERON, 2000). Além disso, o ferro pode interagir com componentes do produto (lipídios, fibras e proteínas), ocasionando redução de sua biodisponibilidade (HURRELL; EGLI, 2010).

Como exemplo da dificuldade de se encontrar o equilíbrio entre a estabilidade do composto de ferro e sua biodisponibilidade pode-se citar o sulfato ferroso que é solúvel em água e tem uma boa biodisponibilidade, porém induz mudanças inaceitáveis de cor ou sabor nos alimentos aos quais é adicionado (KIM et al. 2017). Em contraste, o pirofosfato férrico (FePP) não induz mudanças organolépticas significantes, mas apresenta baixa biodisponibilidade oriunda de baixa solubilidade em água (KLOOTS; DEN KAMP; ABRAHAMSE, 2004).

Portanto, encapsulamento de ferro pode ajudar a superar mudanças sensoriais indesejadas em alimentos enriquecidos, assim como, reduzir a interação do ferro com outros componentes alimentares, aumentando sua biodisponibilidade (GHARIBZAHEDI, JAFARI, 2017; GERA et al., 2012; ZLOTKIN et al., 2001). Estas características foram as motivações, que direcionaram o emprego do processo de microencapsulação para os complexos de Fe-peptídeos, antes de serem adicionados aos outros componentes da formulação desenvolvida para este trabalho.

A encapsulação pode ser definida como um processo que cria uma barreira, a partir de uma matriz ou cobertura polimérica, que envolve o componente ativo protegendo-o contra interações químicas e efeitos dos fatores ambientais, tais como, temperatura, pH, enzimas e oxigênio, permitindo também a liberação controlada do componente ativo (DIAS et al., 2017).

O conceito de microcápsula surgiu da configuração do modelo celular, na qual uma membrana envolve e protege o citoplasma com seus componentes e ao mesmo tempo exerce outras funções, como controlar a entrada e a saída de material na célula (SUAVE et al., 2006). Desta mesma maneira, a microcápsula consiste em uma camada de um agente encapsulante, geralmente um material polimérico que atua como um filme protetor, isolando a substância ativa (gotículas líquidas, partículas sólidas ou material gasoso) e evitando o efeito de sua exposição inadequada. Essa membrana, pode ser mais ou menos resistente, e se

desfaz sob estímulo específico, liberando a substância no local ou momento ideais (SUAVE et al., 2006; MOHAN et al., 2015).

Atualmente a encapsulação é aplicada em diversas áreas como na área de agricultura, alimentos, farmácia, biotecnologia e indústria têxtil. A indústria alimentícia, por exemplo, faz uso de produtos encapsulados como revestimento de corantes, saborizantes, vitaminas e outros ingredientes alimentares sensíveis, com o objetivo de aumentar a vida de prateleira destes (RAY, RAYCHAUDHURI, CHAKRABORT, 2016).

O ingrediente ativo denominado também como material do núcleo pode ser temporariamente ou permanentemente protegido por uma carapaça de um segundo material, denominado como material de encapsulamento ou de parede, ou membrana, cápsula, material carreador, fase externa, ou matriz (WANDREY, BARTKOWIAK, HARDING, 2009; FANG, BHANDRI, 2010; RAY, RAYCHAUDHURI, CHAKRABORT, 2016; PAULO; SANTOS, 2017).

As vantagens da encapsulação estão associadas à estabilização dos compostos bioativos, alcance do ativo aos níveis desejados, inibição da formação de compostos nocivos e indesejáveis em função das mudanças químicas com o tempo, e ainda com a ação de mascarar atributos sensoriais indesejáveis. As desvantagens associam-se com a estabilidade da matriz polimérica da cápsula e o desafio do processo de encapsulação (DIAS et al., 2017).

Os ingredientes bioativos assim como os ingredientes funcionais têm sido encapsulados para preservar a estabilidade durante o processamento de alimentos e armazenamento e em adição para evitar interações indesejáveis entre outros ingredientes presentes nas matrizes alimentícias que podem desencadear uma degradação mais rápida do produto e perda de algumas propriedades (LESME; MCCLEMENTS, 2009).

Dentre as muitas técnicas disponíveis para a encapsulação de componentes alimentícios, nenhuma foi considerada universal, como sendo aplicável para todos os componentes bioativos de alimentos. Isso ocorre devido à especificidade da estrutura molecular de cada componente bioativo (AUGUSTIN; HEMAR, 2009), que diferem quanto: ao peso molecular, polaridade, solubilidade e assim, necessitam de diferentes abordagens de encapsulamento (AUGUSTIN;

HEMAR, 2009; KAILASAPATHY, 2002; RAY, RAYCHAUDHURI, CHAKRABORT, 2016).

Como geralmente estes componentes bioativos estão em sua forma líquida, a maioria das tecnologias aplicadas são à base de secagem (RAY, RAYCHAUDHURI, CHAKRABORT, 2016). O objetivo principal da retirada da água é evitar um meio reacional propício para reações químicas, fenômenos físicos e proliferação microbiana (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010). A retirada da água também reduz o custo de armazenamento, transporte e manutenção de suas propriedades específicas como, por exemplo, solubilidade instantânea (CARMO; FERNANDES; BORGES, 2015).

Existem diferentes técnicas de secagem, tais como, pulverização, revestimento de cama fluida e congelamento (ZUIDAM; HENRICH, 2009; RAY, RAYCHAUDHURI, CHAKRABORT, 2016), sendo a mais usada a técnica de secagem por aspersão ou *spray drying* (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010).

3.8. Técnica de spray drying

A secagem por spray baseia-se na atomização de uma emulsão ou solução, onde as gotículas pulverizadas quando encontram ar quente, formam micropartículas, através de fenômenos termodinâmicos. As micropartículas são geralmente coletadas em um ciclone, e o ar sai do sistema com uma temperatura mais baixa e uma umidade mais alta. A secagem por pulverização é um sistema relativamente de custo reduzido, rápido e eficiente para a microencapsulação de componentes ativos, como óleos essenciais, corantes naturais, vitaminas e probióticos (GARTI; MCCLEMENTS, 2012). Os materiais encapsulantes mais comumente usados são proteínas, como proteínas lácteas e isolados de proteína vegetal, e polissacarídeos (gomas), como goma arábica, maltodextrina, amido modificado e inulina (DIAS et al., 2017).

Na microencapsulação de vitaminas, minerais, corantes e também gordura e óleos, o uso de polidextrose e maltodextrina como material de parede ganham destaque pelas características de formarem géis e atuarem como estabilizadores de alimentos (CHRONAKIS, 1998; GUPTA et al., 2015).

3.9. Definição de bioacessibilidade e biodisponibilidade do ferro

O termo bioacessibilidade expressa a quantidade do nutriente ingerido que apresenta potencial para estar disponível para absorção, é dependente apenas da digestão e da liberação da matriz alimentícia. Já biodisponibilidade é definido como a quantidade de nutrientes ingeridos que são absorvidos e estão disponíveis para funções fisiológicas. São dependentes da ingestão, liberados da matriz dos alimentos, absorvidos por células intestinais e transportados para células do organismo (Figura 3) (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012).

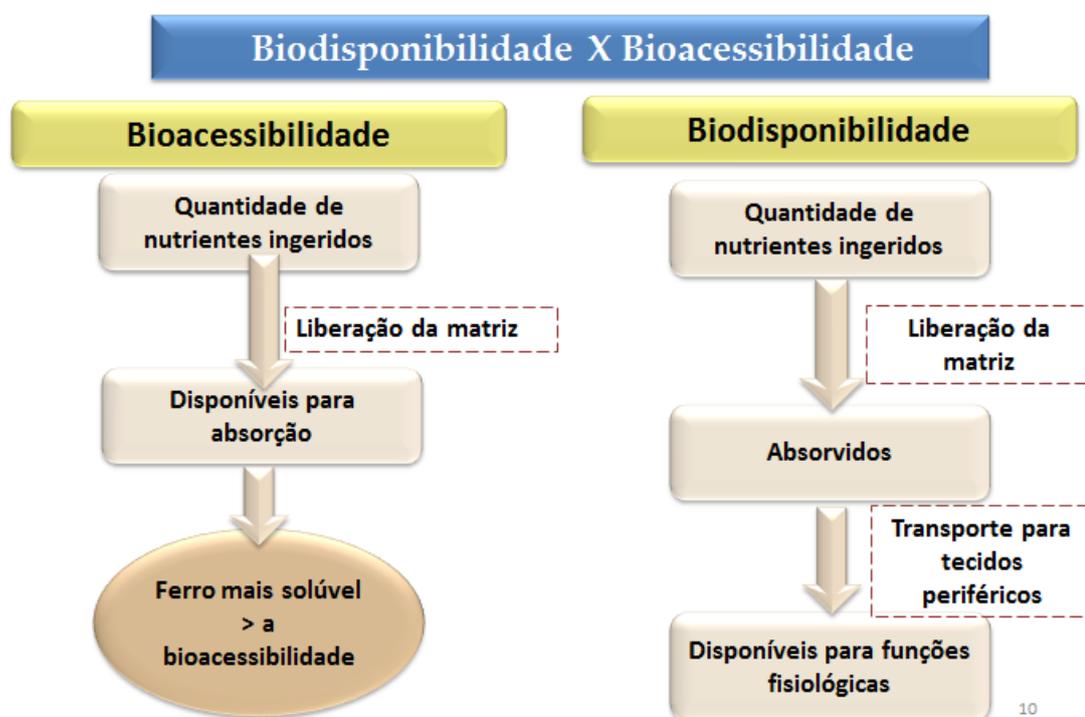


Figura 3. Esquema ilustrativo da principal diferença entre bioacessibilidade e biodisponibilidade.

A estimativa da biodisponibilidade *in vitro* dos minerais e dos oligoelementos dos alimentos envolvem a simulação de digestão gastrointestinal e fração mineral solúvel ou fração mineral dialisada através de uma membrana semipermeável com tamanho de poro específico (CAMARA et al., 2005). Como estes métodos medem apenas a quantidade de mineral disponível no trato gastrointestinal para absorção, são chamados de métodos de avaliação da bioacessibilidade (SALOVAARA; SANDBERG; ANDLID, 2002).

Para realizar a simulação da digestão in vitro através do método de MINEKUS et al (2014) se considera a passagem do alimento pelo trato gastrointestinal, o pH do ambiente, as enzimas que atuam, o tempo de permanência do alimento e as contrações da musculatura que são simuladas pela agitação. O intestino delgado tem aproximadamente 2-6 m e é dividido em três partes: duodeno, jejuno e íleo, que compreendem 5%, 50% e 45% do comprimento total, respectivamente (BALIMANE;CHONG; MORRISON, 2000). Aproximadamente 90% de toda a absorção no trato gastrointestinal ocorre na região intestinal e sua superfície possui dobras ou pregas (vilosidades e microvilosidades), aumentando a área para a digestão e absorção. As vilosidades aumentam a área superficial em até 30 vezes, e as microvilosidades em até 600 vezes. Na Tabela 2 abaixo são apresentados os segmentos gastrointestinais e algumas de suas características.

Tabela 2- Características físico-químicas do intestino humano e tempo de permanência do alimento nos diferentes seguimentos (adaptado de BALIMANE et al., 2000).

	Compartimento Digestório	Comprimento (cm)	Área Superficial (m ²)	Faixa de pH do meio	Permanência do Alimento (h)
	Cavidade Oral	-	0,1	6,5	-
	Esôfago	23 a 25	0,2	-	< 1,0
	Estômago	0,25	3,5	1,0 a 2,0	1,0 – 2,0
Intestino Delgado	Duodeno	35	1,9	0,5 – 0,75	4,0 – 5,5
	Jejuno	280	184	1,5 – 2,0	5,5- 7,0
	Íleo	420	276	5,0 – 7,0	7,0 – 7,5
	Cólon e reto	150	1,3	1,0 – 6,0	7,0 - 7,5

O segmento mais importante na absorção de ferro e outros nutrientes provenientes da alimentação é o intestino delgado (composto pelo duodeno, jejuno e íleo), composto por células de absorção denominada de enterócitos. As células deste segmento (enterócitos) encontram-se dispostas em monocamada, recoberta por duas membranas, uma voltada para a parte interna (basolateral) e outra para o lúmen intestinal (apical). Portanto, o processo de absorção ocorre

sempre no sentido da mucosa apical para a basolateral e além da absorção atuam como barreira, impedindo a entrada de enzimas digestivas, substâncias estranhas e patógenas (VAN CAMPEN; GLAHN, 1999).

Os resultados provenientes da digestão *in vitro* podem ser utilizados, como parâmetro relativo, para prever a biodisponibilidade, pois fornecem uma ótima base para estabelecer tendências, comparações e determinação de efeitos causados por diversos fatores, tanto da digestão como da dieta (CAMARA et al., 2005).

Idealmente a biodisponibilidade deveria ser determinada por métodos *in vivo*, com humanos. No entanto, tais estudos são difíceis, caros e podem fornecer dados limitados dependendo do estudo (CAMARA et al., 2005). Os ensaios realizados com animais são menos dispendiosos, porém são um pouco limitados em vista das incertezas, quanto às diferenças de metabolismo, entre animais e humanos (GARCIA; CASTRO, 2013). Assim, como alternativa aos estudos *in vivo* em humano e animais, a biodisponibilidade de minerais ou oligoelementos é estimada através de estudos *in vitro* que são mais rápidos, simples e menos dispendiosos (CAMARA et al., 2005).

3.9.1. Solubilidade

A bioacessibilidade *in vitro*, como estimativa da fração mineral liberada, também pode ser estimada através do ensaio de solubilidade. Nesta técnica, também ocorre simulação gastrointestinal, porém, somente a fração solúvel do mineral presente no alimento é avaliada (CÁMARA et al., 2005; SAHUQUILLO; BARBER; FARR, 2003). No estudo realizado por SAHUQUILLO e colaboradores (2003) foi estimada a bioacessibilidade de cálcio, ferro e zinco em três tipos de legumes empregando o modelo de digestão *in vitro* pelo método de solubilidade. Em 2005, CÁMARA et al., fizeram a avaliação da bioacessibilidade de minerais utilizando o método de solubilidade proposto por SAHUQUILLO et al. (2003), na qual pequenas modificações foram realizadas em relação a massa de amostra e volume das soluções de enzimas. Neste estudo os autores compararam os métodos *in vitro* de diálise e solubilidade e verificaram que não houve uma correlação significativa entre os métodos, o que significa que o mineral com maior valor para o ensaio de solubilidade não foi o que apresentou a maior porcentagem de diálise.

3.9.2. Dialisabilidade

A dialisabilidade consiste em uma técnica que simula a digestão gastrointestinal e que tem como objetivo determinar a quantidade de determinado elemento que atravessa a parede intestinal. Nesta técnica a parede é simulada pelo uso de uma membrana de diálise de porosidade entre 6 a 8 kDa (BENITO; MILLER, 1998; CÁMARA et al., 2005a; KISKINI et al., 2007; MILLER et al., 1981).

MILLER et al. (1981) deu início a esta técnica aplicando-a para estimar a bioacessibilidade de ferro em diversos tipos de refeições. Neste estudo uma alíquota da refeição era ajustada para pH 2,0, adicionava-se solução de pepsina, seguido da incubação a 37 °C durante 2h. Uma alíquota do digerido foi titulada com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) para conhecer o volume que preenchia a membrana de diálise e outras duas alíquotas foram adicionadas às membranas de diálise e incubadas novamente a 37 °C por 30min em pH 5,0 . Em seguida foram adicionados 5 mL de solução de pancreatina e extrato de bile e incubados por 2h a 37 °C. Após este período, as membranas foram lavadas com água e o conteúdo dialisado foi pesado e analisado. Alterações neste método foram feitos por KAPSOKEFALOU e MILLER (1991) que propuseram o uso de menor quantidade de amostra, menor quantidade de pepsina, diferente proporção de pancreatina e extrato de bile, além do uso de tampão PIPES dentro da membrana de diálise ao invés da solução de NaHCO₃.

O estudo realizado por ARGYRI et al. publicado em 2009 teve como objetivo melhorar a eficiência do método desenvolvido por MILLER et al (1981) e avaliar o emprego de volumes menores, tanto de amostras, como de reagentes para estimar concentrações de ferro biodisponível em alimentos empregando a digestão *in vitro*. O processo de diálise foi realizado empregando uma placa com seis poços, com um inserto onde foi inserido um anel para prender a membrana de diálise (Figura 4). Vários volumes de solução, alimentos líquidos e sólidos foram testados e ao final os resultados foram comparados com o método tradicional de MILLER et al. (1981) na qual os autores verificaram que a porcentagem de ferro dialisado em ambas as técnicas apresentaram resultados semelhantes.

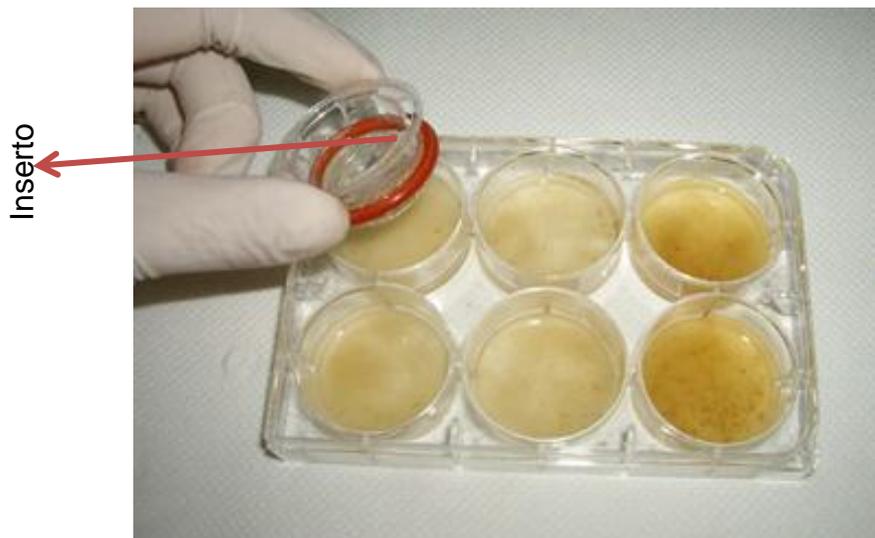


Figura 4- Placa de seis poços utilizada para o método de dialisabilidade (ARGYRI et al.,2009).

3.9.3. Cultivo Celular

As linhagens celulares mais utilizadas para avaliar o fluxo transcelular intestinal são as células Caco-2 , T-84, HT-29 do epitélio do cólon humano, MDCK células caninas do epitélio do rim e LLC-PK1 células suínas do epitélio do rim (BALIMANE.; CHONG; MORRISON, R.A., 2000).

As células Caco-2 consistem numa linhagem de células de adenocarcinoma que se diferenciam em enterócitos e que então apresentam similaridade aos enterócitos humanos. A combinação das células a um procedimento de digestão simulada constitui um modelo útil para prever a biodisponibilidade de ferro em alimentos (TAIT et al., 2005; ZHU et al., 2009). Essas células quando cultivadas passam por diferenciações espontâneas formando uma camada linear de células epiteliais polarizadas, que apresentam muitas características dos enterócitos (GLAHN et al., 1996). Dentre elas, expressam similarmente DMT1, receptor de transferrina (TfR) e proteína reguladora de ferro (IRP-1, IRP-2) (BRYCZEWSKA, 2018).

Os enterócitos do intestino delgado expressam várias proteínas carreadoras, nas membranas apical e basolateral, que permitem a passagem trans-epitelial de moléculas relevantes, do ponto de vista da luz intestinal para a circulação sanguínea. Portadores intestinais específicos para açúcares,

aminoácidos, di- e tripeptídeos, vitaminas, ácidos biliares, micronutrientes, incluindo metais pesados e nucléolos foram identificados e funcionalmente caracterizados em células Caco-2 (LI; JIANG; HUANG, 2017).

Além de estimar a solubilidade e absorção, este modelo também fornece uma estimativa do transporte do composto de interesse (PERALES et al., 2006). O emprego das células Caco-2 associada ao processo de digestão apresenta um grande avanço, quando comparado ao uso apenas da digestão *in vitro*, uma vez que permite verificar a absorção do nutriente após a digestão do alimento. O pH é controlado para ficar semelhante ao que ocorre ao longo da superfície de absorção do trato intestinal. MAHLER et al. (2009) compararam a biodisponibilidade do ferro empregando métodos de digestão *in vitro* associados a culturas de células Caco-2 e verificaram boa correlação com valores obtidos em estudo com humanos. HUR et al. (2011) também verificaram que resultados em ensaios *in vivo* (humanos) com *in vitro* (células Caco-2) apresentaram resultados concordantes.

3.10. Facilitadores e inibidores da absorção do ferro

A biodisponibilidade do ferro é afetada pela composição da dieta e pode ser o fator mais importante para adequação fisiológica deste mineral (ARGYRI et al, 2009). Uma variedade de fatores alimentares pode aumentar ou inibir a biodisponibilidade do ferro como, por exemplo, o ácido ascórbico, que é potencializador e fitatos de cereais ou estruturas polifenólicas de frutas e vegetais, que são inibidores da biodisponibilidade de ferro (PRENTICE et al., 2017).

Os polifenóis, tais como ácido fítico e taninos, encontrados em dietas à base de plantas inibem a absorção do ferro. Eles formam quelatos naturais com o mineral tornando-os estáveis antes ou durante a absorção epitelial, impedindo assim a passagem do ferro através do epitélio intestinal (ZHU et al, 2009), por formarem complexos insolúveis. A capacidade de um composto quelante manter o ferro em solução, ao contrário de precipitados de hidróxidos de ferro ou fitoterápico é de grande importância para absorção do ferro (SALOVAARA; SANDBERG; ANDLID, 2002).

O ácido ascórbico aumenta a biodisponibilidade do ferro ionizado gerado no estômago, impedindo que o Fe^{+2} se oxide a Fe^{+3} , uma vez que o Fe^{+2} é mais

solúvel ao pH do intestino delgado superior e mais biodisponível que o Fe^{+3} (GLAHN; LEE; MILLER, 1999; ZHU et al, 2009).

Em pH acima de 4, o Fe^{+3} torna-se insolúvel, o que dificulta a absorção intestinal, porém em combinação com o ânion dos ácidos orgânicos, o Fe^{+3} se torna acessível para a absorção, provavelmente porque demonstra maior solubilidade devido a quelação ao invés de um efeito gerado pela alteração de pH (SALOVAARA; SANDBERG; ANDLID, 2002).

Segundo GLAHN; LEE; MILLER (1999), a magnitude do efeito do ácido ascórbico na biodisponibilidade do ferro pode ser influenciada pela proporção de ácido ascórbico para ferro ionizado, sendo a biodisponibilidade do ferro maximizada na proporção equivalente a 1,6:1 (ácido ascórbico/ferro).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matéria prima

O isolado proteico de soro de leite, obtido da empresa Fonterra Cooperative Group Limited (São Paulo, Brasil).

4.1.1.1. Ingredientes das formulações

Os ingredientes presentes nas formulações estão descritos conforme legislação da ANVISA, RDC Nº 259, de 20 de setembro de 2002 (BRASIL, 2002) em ordem decrescente da respectiva proporção.

- **Micropartícula Fe-peptídeos**

Ingredientes: maltodextrina e polidextrose na proporção de (80:20 p/p) sulfato ferroso (10:1 peptídeos/Fe), ácido ascórbico na proporção de 1:1,6 (ácido ascórbico/Fe).

- **Formulação de tangerina**

Ingredientes: polidextrose, maltodextrina, micropartícula Fe-peptídeos, sacarose, goma xantana, ácido ascórbico, aroma tangerina, ácido cítrico, corante amarelo, aroma laranja, mascarador, sucralose, quelaia.

- **Formulação de morango**

Ingredientes: polidextrose, maltodextrina, micropartícula Fe-peptídeos, sacarose, ácido ascórbico, aroma morango, ácido cítrico, mascarador, aroma frutas vermelhas, corante primavera, dióxido de titânio, corante vermelho intenso, sucralose, queilaia.

- **Formulação de chocolate**

Ingredientes: polidextrose, maltodextrina, micropartícula Fe-peptídeos, mascarador, cacau, aroma chocolate, aroma creme, aroma baunilha, goma xantana, dióxido de titânio, sucralose.

4.1.2 Reagentes e soluções

As células Caco-2 (passagem 45) foram repicadas a partir de linhagens conservadas em nitrogênio líquido no laboratório do departamento de Química da UNICAMP.

- KCl (SIGMA- P5405)
- KH_2PO_4 (SIGMA- 7778-77-0)
- NaHCO_3 (SIGMA – S5761)
- NaCl (SIGMA-S7653)
- $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ (SIGMA-M8266)
- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (SIGMA-A9434)
- $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (SIGMA-C5670)
- NaOH (SIGMA- S8045)
- HCl (SIGMA- 30721)

4.2 MÉTODOS

A Figura 5 apresenta o fluxograma geral do projeto realizado.

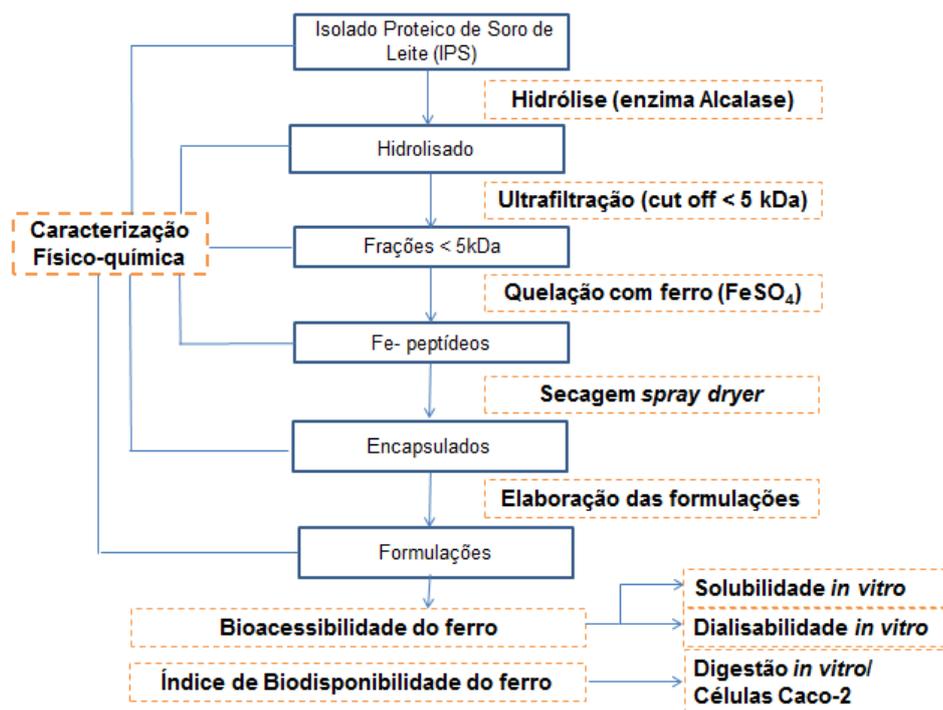


Figura 5- Fluxograma do desenvolvimento das principais etapas do projeto proposto, utilizando o sulfato ferroso como fonte de ferro.

4.2.1 Caracterização da matéria-prima, hidrolisado, fração <5 kDa, formulações contendo Fe-peptídeos

4.2.1.1. Determinação de proteína total

O teor de nitrogênio total das amostras foi determinado segundo método de micro- Kjeldahl descrito por LATIMER (AOAC, 2012). Foi utilizado o fator de 6,38 para cálculo de conversão do nitrogênio para proteína.

4.2.1.2. Determinação de umidade

A determinação de umidade foi realizada por gravimetria conforme descrito por LATIMER (AOAC, 2012), através da secagem em estufa ventilada e remoção da água por aquecimento. A massa do resíduo seco é determinada e a umidade é calculada pela diferença da massa do alimento antes e após a secagem.

4.2.1.3. Perfil de aminoácidos totais e livres

A determinação de aminoácidos totais da matéria prima e frações menores que 5kDa foi realizada por cromatografia em coluna de fase reversa em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC, marca SHIMADZU), de acordo com o método descrito por WHITE; HART; FRY., 1986; HAGEN; FROST; AUGUSTIN, 1989. A liberação dos aminoácidos individuais ocorre na hidrólise ácida com solução de ácido clorídrico 6 M e fenol. Após a hidrólise, é adicionado o ácido α -aminobutírico como padrão interno. Quando o ácido é eliminado por evaporação a vácuo, é realizada uma re-evaporação com solução de acetato de sódio, metanol e trietilamina. Após este procedimento é realizada a derivatização do hidrolisado com solução de metanol, água ultrapura, trietilamina e fenilisotiocianato (PITC). Os aminoácidos são então dissolvidos em diluente e são introduzidos na coluna. A fase móvel compreende aos eluentes A e B que contem acetato de sódio, acetonitrila, água ultrapura, EDTA dissódico.

Antes de iniciar a injeção das amostras, deve-se fazer uma injeção prévia do diluente para estabilização do equipamento, seguindo-se as mesmas condições de corrida usadas para as amostras. A separação dos aminoácidos individuais ocorre de acordo com as seguintes condições cromatográficas e o gradiente da fase móvel como mostrado na Tabela 3:

- Coluna de guarda: C18 (4 X 3,0 mm) ou Shim-Pack CLC G-ODS(4)
- Coluna analítica: LUNA C18 100 A 5 μ M 250 X 4,6 mm 00G-4252-EQ ou Shim-Pack CLC-ODS (M) C18 100 A 5 μ M 250 X 4,6 mm
- Fluxo dos eluentes (fase móvel): 1 mL/minuto a 50 °C
- Detector: DAD (arranjo de diodo), com detecção em 254 nm

- Nessas condições, a ordem de eluição dos aminoácidos é a seguinte: Ácido Aspártico, Ácido Glutâmico, Serina, Glicina, Histidina, Arginina Treonina, Alanina, Prolina, Padrão Interno (AAAB), Tirosina, Valina, Metionina, Cistina 1, Cistina 2, Cistina 3, Isoleucina, Leucina, Fenilalanina e Lisina.
- A identificação dos picos dos compostos é feita através de comparação com os tempos de retenção obtidos nos padrões injetados.

Tabela 3. Tempo de eluição e gradiente dos eluentes (A e B) da fase móvel.

Tempo (minutos)	Gradiente	
	Eluente A (%)	Eluente B (%)
5,00	95,00	5,00
10,00	77,50	22,50
11,80	68,00	32,00
20,00	40,00	60,00
23,00	0,00	100,00
35,99	0,00	100,00
36,00	95,0	5
40,00	95,0	5
45,00	“stop”	“stop”

A identificação dos aminoácidos foi realizada por comparação com padrão externo (Pierce, PN 20088), e para a quantificação foi utilizado o padrão interno ácido α -aminobutírico (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), de acordo com WHITE; HART; KRY (1986) e HAGEN; FROST; AUGUSTIN (1989). Para determinação dos aminoácidos livres, os aminoácidos foram extraídos em solução ácida (HCl 0,1M) com agitação por 30 minutos. Uma alíquota do filtrado foi derivatizada seguindo o mesmo método dos aminoácidos totais (exceto a hidrólise ácida).

A determinação de triptofano foi feita após hidrólise enzimática com pronase (40°C/22-24h), seguido de reação colorimétrica com 4-dimetilaminobenzaldeído (DAB) em 10,55 mol / L de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e leitura a 590 nm. O teor de triptofano foi calculado a partir de uma curva padrão de L-triptofano (SPIES, 1967).

4.2.2 Hidrólise enzimática do isolado de soro de leite e fracionamento

As condições de reação para obtenção dos hidrolisados proteicos de soro de leite (HPS) foram selecionadas de trabalhos anteriores do nosso grupo (DE LA HOZ et al., 2014b), onde foi realizado a otimização.

O isolado proteico foi diluído em água (10%) e nesta solução foi adicionada a enzima alcalase[®] de acordo com as condições ótimas de atividade enzimática:

- pH: 8,0
- Proporção E/S (enzima/substrato): 1,0
- Temperatura (°C): 60°C

Em sequência o hidrolisado foi fracionado em sistema de ultrafiltração Pellicon[®] (Millipore, Bedford, MA, EUA) com membrana de corte molecular de 5 kDa.

Parte do hidrolisado ultrafiltrado foi liofilizado para ser utilizado para as análises da capacidade ligante dos peptídeos e outra parte congelada para a síntese das micropartículas.

4.2.3. Perfil de aminoácidos por eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE)

O método de eletroforese capilar foi utilizado para obter o perfil eletroforético dos hidrolisados. Os hidrolisados proteicos de soro de leite (HPS) foram analisados num sistema de eletroforese capilar de Alta eficiência (HPCE), marca Agilent Technologies (Alemanha), com detector UV e arranjo de diodos, HP Chem Station para controle do sistema, análise e coleta de dados. As condições de operação do equipamento foram: Capilar de sílica fundida (Agilent Technologies, DE, Alemanha) de 40 cm de comprimento, 50µm de DI (diâmetro interno) e como eletrólito de caráter básico foi usada uma solução tampão de borato 20 M pH 9,3.

As condições da corrida eletroforética utilizadas foram:

- Concentração da amostra: 5mg/ml
- Temperatura do capilar: 25 ° C
- Separação por voltagem de 15 kV entre os eletrodos
- Polaridade positiva (injeção no eletrodo positivo ânodo)
- Injeção da amostra por pressão de 50 mbar durante 4 s
- A detecção por absorção no UV e comprimento de onda de 200nm.
- O tempo de duração da corrida foi de 15 minutos para cada amostra.

Para cada corrida de amostra se fez um pré e um pós-condicionamento do capilar.

- Pré-condicionamento: lavagem com NaOH 0,1 M durante 2 min; água ultra-pura por 2 min e eletrólito base tampão borato 50 mM por 3 min, usando uma pressão de 990 mbar.
- Pós-condicionamento: Lavagem com água ultra-pura durante 3 min seguida de lavagem com solução base tampão borato 20 mM por 2 min , sempre com pressão de 990 mbar.

4.2.4. Grau de hidrólise

O grau de hidrólise (GH) foi calculado de acordo com a equação 1 descrita por ADLER-NISSEN (1986). Neste método, o GH é proporcional à base de consumo solicitada para a preservação do pH constante durante a hidrólise.

$$GH(\%) = B \times Nb \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{MP} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

onde: GH (%) = grau de hidrólise; B = consumo de base em mL; Nb = normalidade da base; $1/\alpha$ = média de grau de dissociação do grupo α -NH₂; MP = massa da proteína em g; h_{tot} = número total de ligações peptídicas no substrato proteico - 8,8 para proteína do soro de leite.

4.2.5 Definição da proporção de peptídeo:ferro (p/p) para síntese de complexos

Para a definição da melhor proporção de peptídeos: ferro (p/p) a ser utilizada para a síntese dos complexos (Fe-peptídeo) foi realizado a avaliação da

capacidade ligante em diferentes proporções peptídeo: ferro (p/p) 5:1; 10:1; 20:1 e 40:1.

4.2.6. Avaliação da capacidade ligante dos peptídeos

Análise realizada para avaliar a capacidade ligante do ferro em função da solubilidade do mesmo, segundo método DE LA HOZ et al.(2014a) com algumas modificações. Foi introduzida a centrifugação (5000 g x 20 min a 25 °C) ao final da reação de complexação, anterior a determinação do ferro.

A fração do hidrolisado <5 kDa na concentração de 1% (p / v) em teor de proteína (N x 6,38) teve o pH ajustado para 5.5 e misturada com ferro proveniente do FeSO₄ (s) na proporção de 0,1% Fe (p / v), ambos em solução aquosa. A incubação foi realizada em banho-maria com agitação por 30 min a 40 °C seguida de centrifugação (5000 g / 20 min, 25°C). O teor de ferro no sobrenadante foi determinado por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). O fluxograma do procedimento está representado na Figura 6.

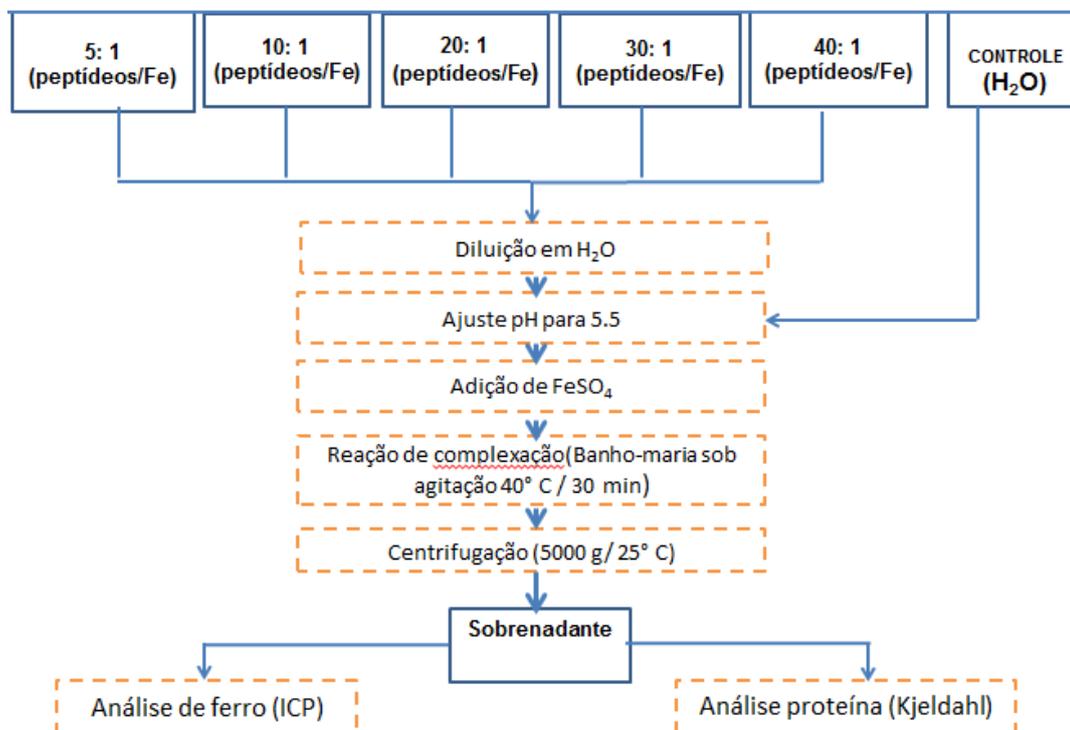


Figura 6- Fluxograma do procedimento para análise da capacidade ligante dos peptídeos com Fe segundo método DE LA HOZ, 2014^a.

4.2.6.1. Determinação de ferro

O teor de ferro da amostra e nos produtos da reação de quelação foi determinado segundo método descrito por PRICE e ROOS (1969) e modificado por MORGANO; QUEIROZ; FERREIRA (1999). O conteúdo de ferro foi quantificado usando um espectrômetro de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente (ICP OES) (modelo 5100 VDV ICP OES, Agilent Technologies, Tóquio, Japão), equipado com uma fonte de radiofrequência (RF) de estado sólido de 27 MHz e spray nebulizador usando argônio como plasma (pureza de 99,996 % - Air Liquid, SP, Brasil). As condições otimizadas de operação foram: potência do plasma 1,20 kW; fluxo do argônio auxiliar 1,0 L min⁻¹, fluxo de nebulização 0,7 L min⁻¹, número de replicata 3; tempo de estabilização e leitura 14 s e comprimento de onda de leitura para o ferro de 259,940 nm. Para quantificação foi construído uma curva de calibração a partir dos padrões analíticos (tritsol, Merck, Damstadt, Alemanha).

4.2.7. Complexação do Fe-peptídeo

Após a definição da melhor proporção a ser utilizada para a síntese dos complexos Fe-peptídeos, a complexação destes foi realizada segundo método descrito por KIM et al, 2007 com pequenas modificações (DE LA HOZ et al. 2014 a) adicionada de ácido ascórbico na proporção 1,6:1,0 (p/p) em relação ao ferro (GLAHN; LEE; MILLER, 1999). Estes complexos juntamente com a adição de ácido ascórbico foram denominados como “ATIVO” na formulação das micropartículas.

4.2.8. Formulação das micropartículas pela técnica de *spray drying*

A reação de complexação dos peptídeos com ferro foi realizada de acordo com KIM et al, 2007a.

O ativo foi seco com a adição de maltodextrina e polidextrose na proporção de 80:20 (p/p), como agentes de parede. A análise de dialisabilidade *in vitro* foi utilizada como parâmetro de seleção dos materiais de parede em estudos anteriores do nosso grupo de estudo.

Os materiais de parede foram dispersos na solução aquosa contendo ferro-peptídeo (Fe-P) com o auxílio de um agitador mecânico (Lab Egg/ IKA, Staufen,

Alemanha) até total dispersão. As misturas foram preparadas com sólidos totais de 40 g / 100 g, compreendendo a soma do material de parede (77 g/ 100 g) e ativo (23 g / 100 g)

As soluções de material de parede e ativos foram submetidas à secagem por *spray drying* para formação das micropartículas. O equipamento utilizado foi de escala laboratorial (BÜCHI, modelo B-290) com orifício para passagem da amostra na atomização de 0,7 mm. Condições de operação: temperatura de entrada de 140 °C e de saída em torno de 78 °C; pressão de ar de aproximadamente 50 mbar; aspiração de 100 % da potência do aspirador; vazão de ar de 500 L/h.

As micropartículas foram avaliadas quanto ao percentual de recuperação do ativo no material seco através da determinação do conteúdo de ferro na solução seca e liberação do ativo para absorção, através dos métodos de bioacessibilidade *in vitro*. O Conteúdo de ferro nas partículas foi determinado pelo método descrito no item 4.2.6.1.

O rendimento de processo foi determinado como sendo a razão entre a quantidade de sólidos recolhidos ao final do processamento e a quantidade de sólidos presentes na mistura antes de entrar no secador. O cálculo foi feito através da seguinte equação:

$$RS (\%) = \frac{\text{Peso coletor cheio} - \text{Peso coletor vazio}}{\text{Sólidos Totais}} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

Onde, RS corresponde ao rendimento de secagem.

4.2.9. Elaboração das formulações

As micropartículas contendo o ativo foram utilizadas para a elaboração de três formulações. Foram utilizados saborizantes, açúcar e aromatizante para compor um sachê que ofereça 14 mg de ferro por dose, que é a quantidade recomendada de ingestão diária para um adulto, segundo as DRIS (do inglês: Dietary references intake - ingestão diária recomendada) estabelecidas pelo Instituto de Medicina dos Estados Unidos, em conjunto com a agência de saúde do Canada (PADOVANI et al., 2006).

Os métodos utilizados para a avaliação da bioacessibilidade e biodisponibilidade estão descritos na Figura 7.

Bioacessibilidade:

- Avaliação da capacidade ligante dos peptídeos (DE LA HOZ et al , 2014^a)
- Avaliação da solubilidade do ferro (PERALES et al, 2005)
- Avaliação da dialisabilidade do Fe (ARGYRI et al, 2009)

Estimativa de biodisponibilidade:

- Modelo de digestão e células Caco-2 (PERALES et al, 2005)

Figura 7. Métodos para avaliação da bioacessibilidade e biodisponibilidade do Fe.

Bioacessibilidade do ferro

Para avaliação da fração solúvel de minerais que apresenta potencial de absorção no lúmen intestinal foram utilizados dois métodos: 1) **Método da solubilidade *in vitro***, o qual simula a digestão gastrointestinal em relação ao tempo, temperatura, pH e enzimas (gástricas e duodenais, sais biliares), sendo que ao final do processo o digerido é centrifugado e é verificado o teor de ferro solúvel no sobrenadante (MINEKUS et al., 2014). 2) **Método da dialisabilidade *in vitro***, onde além da simulação gastrointestinal se utiliza uma membrana de porosidade específica (6 a 8 kDa) que simula a parede intestinal. Foi utilizado o método proposto por ARGYRI e colaboradores (2009), que permite realizar a análise com uma quantidade reduzida de amostra. O cálculo de % dialisabilidade do Fe das amostras é obtida através da fórmula:

$$\% \text{ Fe dialisável} = \frac{\text{Fe dial} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \times \text{vol total}}{\text{Fe total inicial (mg)}} \times 100$$

onde:

$$\text{Fe dial (mg/mL)} = \frac{\text{mg Fe no dial}}{\text{Volume do dialisado}} = \frac{\text{Fe} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{mL}} \right) \times \text{fator}}{\text{Volume do dialisado}}$$

- *Volume do dialisado*: pesagem da massa do dialisado (conteúdo acima da membrana no inserto) expresso em mL; *fator*: 0,1 (caso seja utilizado balão volumétrico de 10 mL na diluição do dialisado para a análise de Fe por ICP); *Fe total inicial*: 0,0224 mg (quantidade utilizada por ARGYRI et al, 2009 nos ensaios realizados).

4.2.9.1. Solubilidade do ferro

A solubilidade do ferro após a digestão *in vitro* é uma medida indicativa da bioacessibilidade do mineral em estudo.

Para realizar a digestão *in vitro* foi utilizado dois métodos (PERALES et al., 2005 e MINEKUS et al., 2014) em função do tipo de amostra. A digestão pelo método de Perales, não contempla a digestão oral (salivar) pela enzima amilase. A digestão *in vitro* por MINEKUS et al (2014) foi necessária para avaliação da solubilidade nas amostras das formulações, uma vez as matrizes analisadas continham ingredientes mais complexos que as amostras contendo apenas os complexos Fe-peptídeos.

- **Digestão *in vitro* pelo método de PERALES et al, 2005.**

O método de PERALES et al, 2005 foi utilizado neste trabalho para definição da melhor proporção de peptídeos/Fe a ser utilizada para a síntese das micropartículas.

Uma quantidade de cada amostra contendo 0,72 mg de Fe, foi diluída em 30 mL de água deionizada ajustada para pH 2.0 com 6 mol/L de HCl, e foi estabilizado por 15 min, com reajustes de pH quando necessário. Uma alíquota de solução de pepsina foi adicionada às amostras (0,02 g pepsina / amostra), e o volume foi aumentado para 100 mL e incubado a 37°C por 2h com agitação. A digestão com pepsina foi interrompida mantendo-se as digestões gástricas em banho de gelo durante 10 min, e o pH foi ajustado para 6,5 com NaHCO₃ a 1 mol / L. A etapa de digestão intestinal foi realizada após a adição de solução de pancreatina / extrato de bile (0,005 g de pancreatina e 0,03 g extrato biliar / amostra) durante 2 h a 37° com agitação. As soluções digeridas foram então colocadas em um banho de gelo durante 10 min para interromper a digestão, e o pH foi ajustado para 7,2 com adição de solução de NaOH 0,5 mol/ L. A fração bioacessível foi obtida por centrifugação (3200 g / 60 min, 4°C). O teor de ferro total e solúvel foi determinado por ICP OES. O procedimento de preparo das soluções necessárias para a análise de digestão *in vitro* está apresentado na Figura 8 e o fluxograma do procedimento está apresentado na Figura 9.

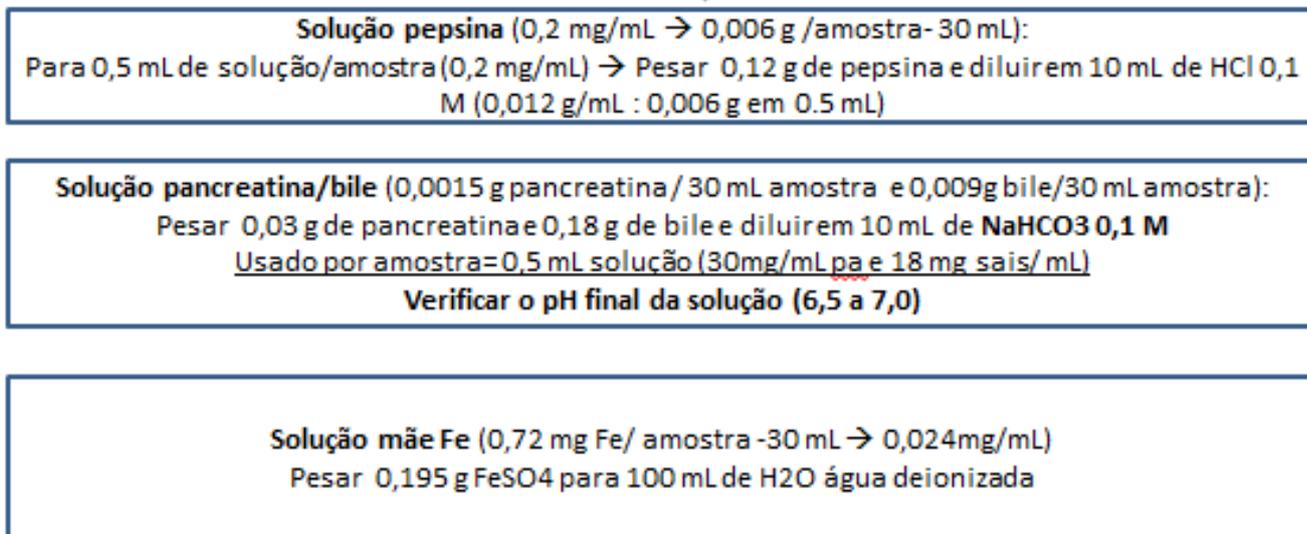


Figura 8- Procedimento para preparo das soluções necessárias para análise de solubilidade do Fe (Método PERALES, et al. 2005).

A bioacessibilidade do ferro foi calculada como a quantidade de ferro solúvel em relação ao total inicial do conteúdo de Fe, de acordo com a Equação 2:

$$\% \text{ Fe bioacessível} = \frac{\text{Fe solúvel (fração bioacessível)}}{\text{Fe total (inicial)}} \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

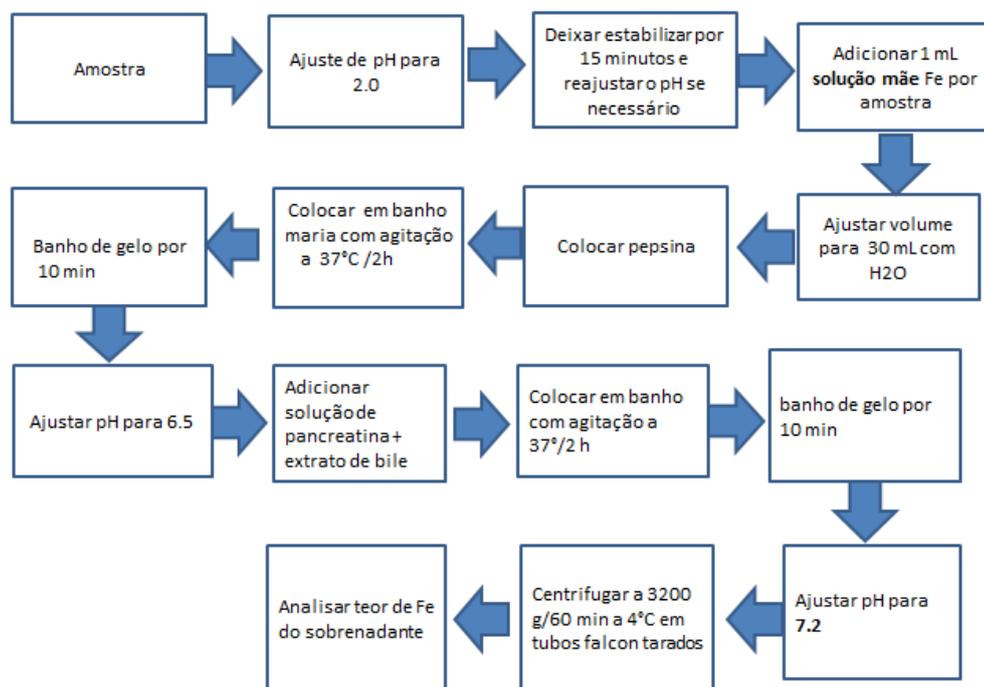


Figura 9- Fluxograma do procedimento para análise de bioacessibilidade do Fe (PERALES et al, 2005).

- **Digestão in vitro pelo método MINEKUS et al., 2014**

Este método é composto basicamente por três etapas: (1) preparação de soluções de estoque; (2) preparação de soluções para digestão; (3) simulação da digestão gastrointestinal.

O primeiro passo consiste em preparar as soluções estoque que serão usadas para simular as diferentes fases da digestão (saliva, suco gástrico e intestinal). A Tabela 4 mostra os constituintes e as concentrações na solução estoque, bem como as massas e volumes usados no preparo da solução.

Tabela 4 - Procedimento para preparo de soluções estoque (MINEKUS et al., 2014).

Reagente	Concentração (g L ⁻¹)	Volume (mL)	Massa (g)
KCl	37,3	100	3.73
KH ₂ PO ₄	34,0	50	1.7
NaHCO ₃	84,0	100	8.4
NaCl	117,0	100	11
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	15,25	50	0.7625
(NH ₄) ₂ CO ₃	12,0	50	0.6
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	14,7	50	0.735
	(100 mmol L ⁻¹ CaCl ₂)		
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	7.5 mmol L ⁻¹	100	7.5 mL (100 mmol L ⁻¹)
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	2 mmol L ⁻¹	50	1 mL (100 mmol L ⁻¹)
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	9 mmol L ⁻¹	50	4.5 mL (100 mmol L ⁻¹)
NaOH	40 (1 mol L ⁻¹)	50	2
HCl	6 mol L ⁻¹	50	25 mL (12 mol L ⁻¹)
HCl	1 mol L ⁻¹	50	8 mL (1 mol L ⁻¹)

Fonte: Da Silva, E. do N. *et al.* (2018)

Para realizar a etapa 2 (preparo das soluções para digestão), a Tabela 5 apresenta a quantidade (volume) de soluções adicionadas em cada amostra durante cada fase. Assim, a partir do conhecimento da quantidade necessária de solução para cada amostra é possível calcular a quantidade total de solução

necessária para o estudo de acordo com a quantidade de amostras que serão avaliadas. A Tabela 6 apresenta a quantidade de soluções estoques necessárias para o preparo das soluções da digestão (saliva, suco gástrico e intestinal).

Tabela 5- Condições e volume de soluções necessários para cada fase da digestão.

Massa de amostra	Fases	Soluções para digestão (proporção)	pH	Tempo min
5g de amostra líquida ou 0,25 de amostra seca	1 ^o	4 mL Saliva + 1 mL CaCl ₂ 7.5mM/ + NaOH 1 M	7,0	10
	2 ^o	9,1 mL Suco gástrico + 0,7 CaCl ₂ 2 mM/ + HCl 1M	3,0	120
	3 ^o	18.5 mL suco Intestinal + 1,35 CaCl ₂ 9 mM/ + NaOH 1 M	7,0	120

Fonte: Da Silva, E. do N. *et al.* (2018)

Tabela 6- Preparo das soluções de saliva, gástrica e intestinal.

Soluções digestivas					
Saliva (250 mL)		Suco gástrico (250 mL)		Suco intestinal (500 mL)	
SAL (mL)	VOLUME	SAL	VOLUME (mL)	SAL (mL)	VOLUME
KCl	7,5	KCl	3,5	KCl	6,8
KH ₂ PO ₄	3,75	KH ₂ PO ₄	0,9	KH ₂ PO ₄	1,6
NaHCO ₃	3,38	NaHCO ₃	6,3	NaHCO ₃	42,5
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,5	NaCl	5,9	NaCl	9,6
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,125	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,4	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	2,2
HCl 6 M	0,05	(NH ₄) ₂ CO ₃	1	HCl 6M	0,7
		HCl 6 M	0,65		
Amilase	6,2 g	Pepsina	4,4 g	Bile	13,5g
				Pancreatina	1,33g

A etapa 3 consiste em realizar a simulação da digestão gastrointestinal assim como descrito na Figura 10.

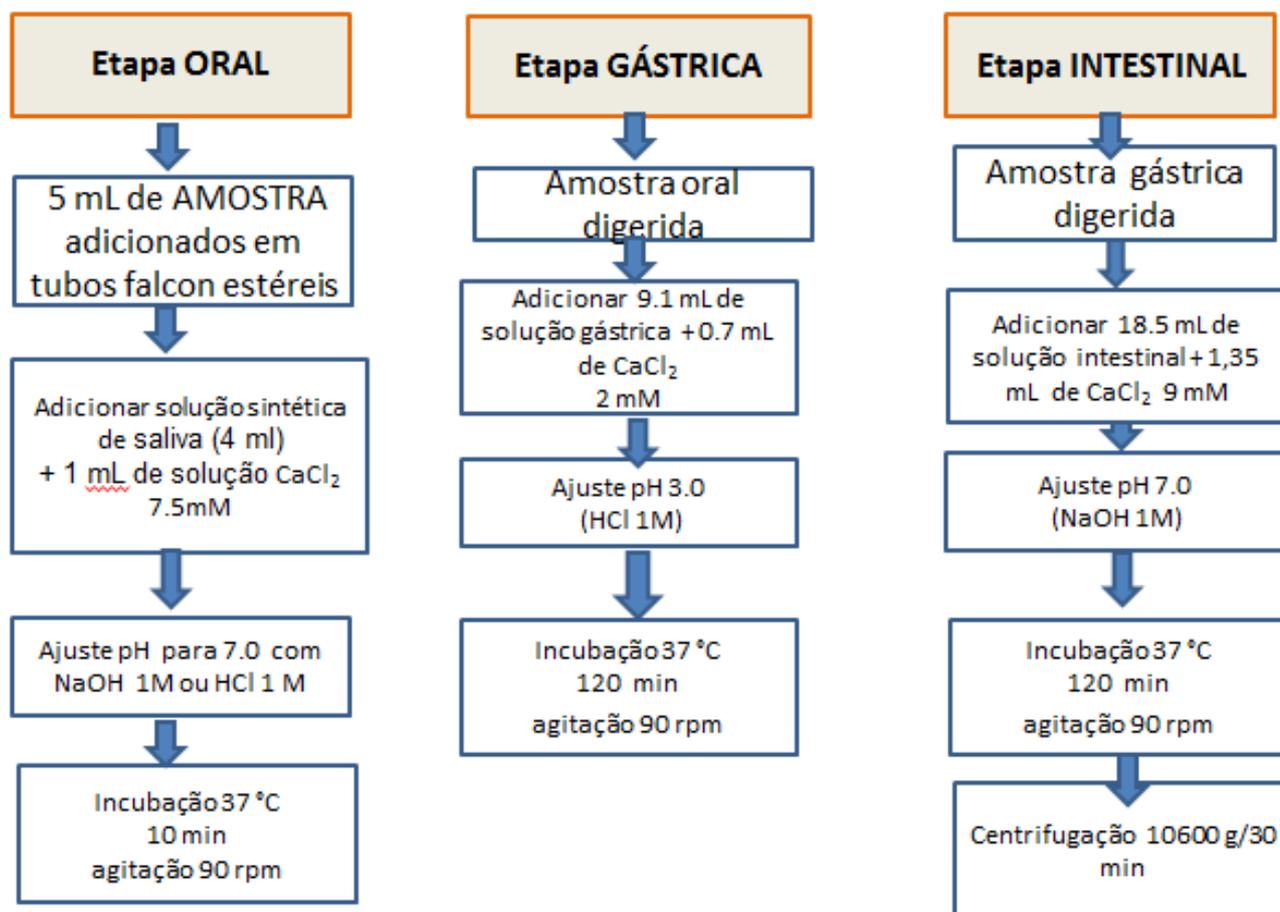


Figura 10- Fluxograma do procedimento para digestão pelo método MINEKUS, et al. 2014.

4.2.9.2. Dialisabilidade do Fe

Esta análise é considerada de maior predição da biodisponibilidade por utilizar uma membrana de baixa porosidade (6 – 8 kDa), que simula a parede intestinal. O pH das amostras foi ajustado para 2,8 com alíquotas de solução de HCl 6 mol/L e 2 mL foram transferidos para poços numa placa contendo seis poços. A Pepsina (0,1 mL) suspensão foi adicionada a cada poço e a placa foi colocada em banho-maria por 2 horas a 37° C.

Após a digestão gástrica foi inserido um anel fechado na parte inferior com a membrana de diálise em cada poço da placa (Figura 11). Cada poço continha 2 mL de amostra e 0,1 mL de suspensão de pepsina. O inserto foi adicionado após

as primeiras 2 h de incubação a 37 ° C foi preenchida com 2 mL de tampão PIPES, pH 6,5 e assim o tampão difundido através da membrana, ajustou gradualmente o pH das amostras de 2,8 para 6,5.

Após 30 min, o inserto foi levemente levantado e foi adicionado 0,5 mL de uma mistura de sal biliar de pancreatina às amostras. As placas foram cobertas com uma tampa de plástico e colocadas em banho- maria com agitação mantida a 37°C e incubadas durante 2 h. No final deste período de incubação, foi retirado a solução contida na parte superior do inserto (parte dialisada) e o teor de Fe foi analisado por ICP OES. A Figura 12 apresenta o procedimento para preparo das soluções utilizadas para a análise e a Figura 13 é um fluxograma para o procedimento da análise.

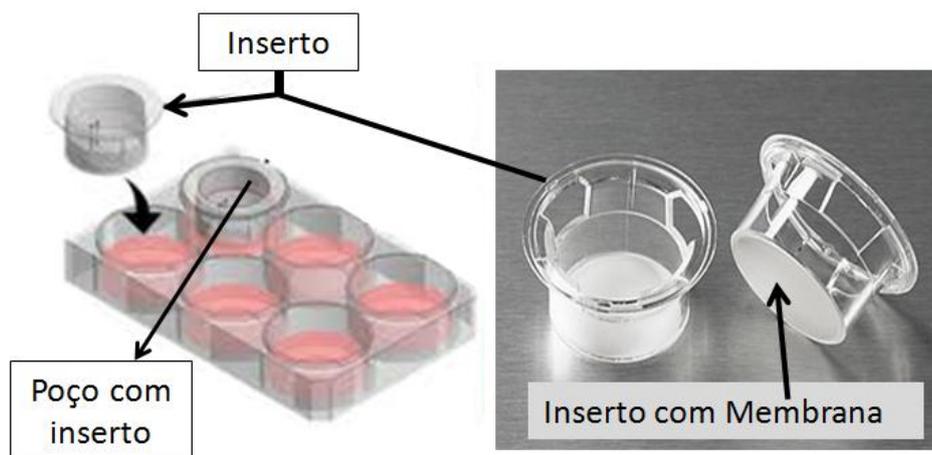


Figura 11 - Esquema da placa contendo os anéis com as membranas (insertos).

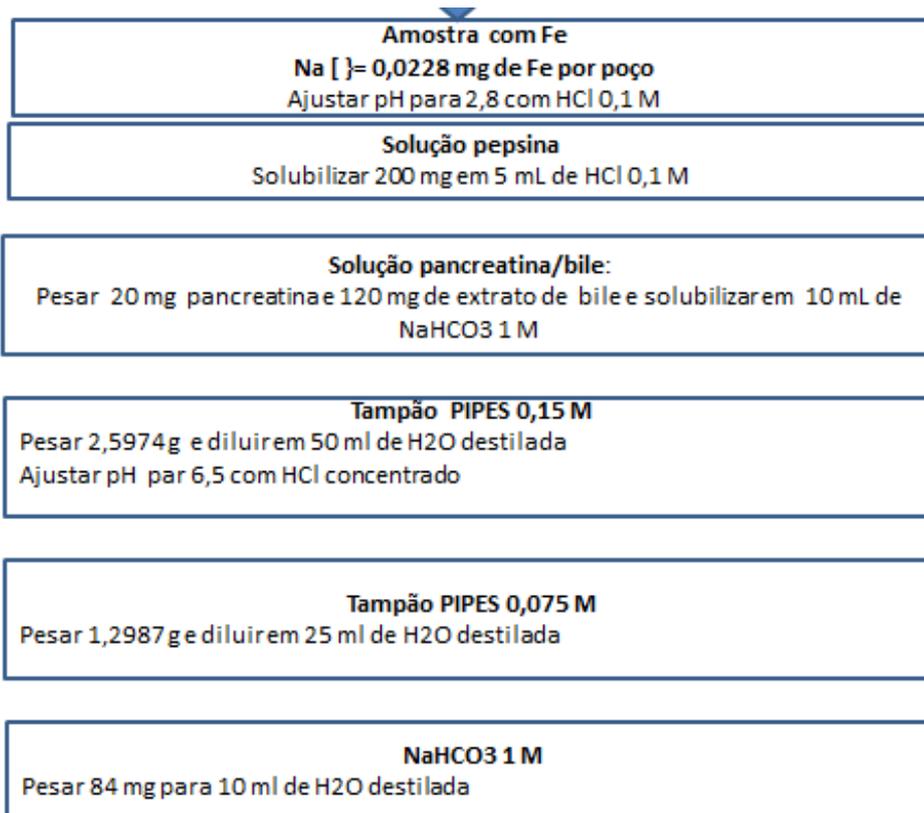


Figura 12- Procedimento para preparo das soluções necessárias para análise de dialisabilidade do Fe (ARGYRI et al. 2009).

4.2.11. Estimativa da biodisponibilidade do ferro

- **Modelo de digestão *in vitro* e cultivo de células intestinais humanas Caco-2**

Para estimar a biodisponibilidade de ferro, as amostras das formulações desenvolvidas passaram pelo processo de digestão segundo método MINEKUS et al., 2014 (item 4.2.10) e foram adicionadas nas células Caco-2 cultivadas nos poços das placas transwell. O conteúdo da solução presente na parte apical e basolateral foram retiradas separadamente e o ferro total presente em cada uma dessas soluções foi mensurado por ICP OES (Figura 14).

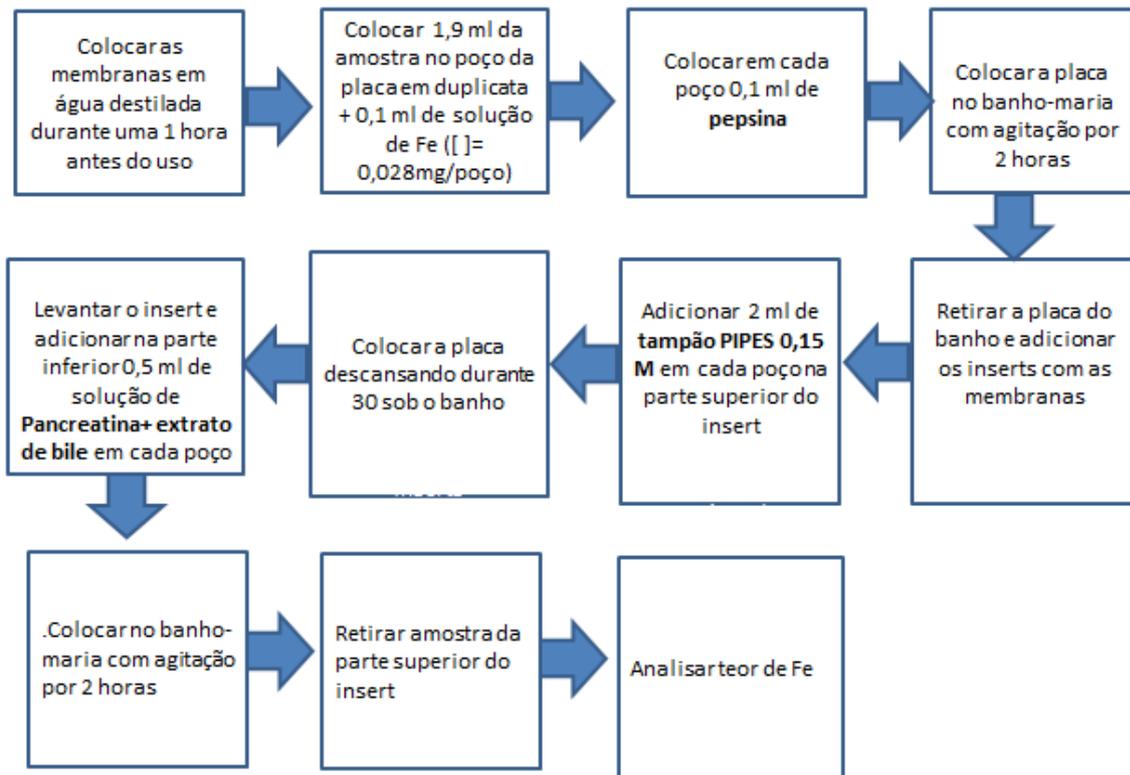


Figura 13- Fluxograma do procedimento para análise de dialisabilidade do Fe (ARGYRI, et al 2009).

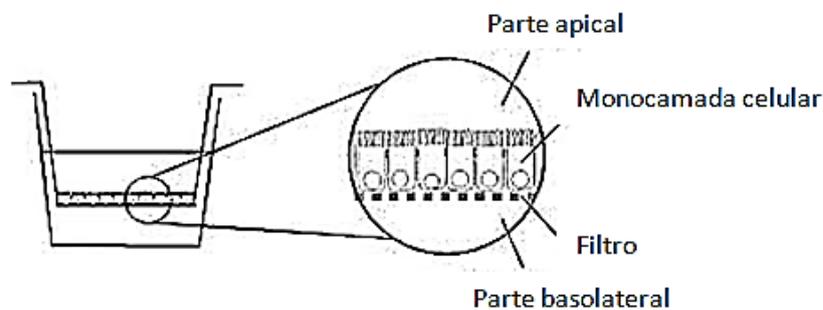


Figura 14- Esquema do cultivo celular nas placas de transwell.

As etapas da digestão (oral, gástrica e intestinal) foram realizadas *in vitro* (método MINEKUS et al., 2014), conforme apresentado na Figura 8.

Cultivo celular inicial:

Em primeiro lugar toda a vidraria utilizada no preparo das amostras e análises foi lavada com ácido clorídrico 10 %, seguida de enxague extensivo em água mili Q.

Foram utilizadas nos experimentos células nas passagens de 45. As células descongeladas foram primeiramente cultivadas em frascos de cultura T75. A concentração de células adicionadas ao frasco foi de $3,4 \times 10^4$. Foram adicionados 10 mL de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com concentração de glicose de $4,5 \text{ g L}^{-1}$ e suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino inativado, 1% v/v de solução de aminoácidos não essenciais 100X, NEAA (Non-Essential Amino Acids), 1% v/v de solução de L-glutamina 200 mM, 1% v/v de piruvato de sódio 100 mM, 1% de HEPES 1M – ácido N-(2-hidroxi-etil) piperazina-N'-(2-acido etabossufônico) – 1% de solução de antibióticos (100 IU mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina).

As células foram mantidas a 37 °C em uma incubadora com 5 % de CO₂/ar ambiente 95 % de umidade constante e o meio foi trocado a cada dois dias. O acompanhamento do crescimento celular, a confluência e o período pós-confluência foram realizados visualmente por microscópio. Quando as células atingiam aproximadamente 70% da cobertura da área de cultura (confluência), o subcultivo era realizado aspirando o meio de cultura contido no frasco de cultivo e submetendo-o à lavagem com solução salina D-PBS (*Dulbecco Phosphate Buffered Saline*), para eliminar as células não aderidas à ele. Após aspiração da solução de lavagem, foram adicionados 2 mL de solução de tripsina/EDTA - $2,5 \text{ g L}^{-1}$ e $0,2 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Em seguida, o frasco de cultivo foi colocado na incubadora por no máximo 15 minutos, para que as células aderidas pudessem soltar-se do frasco. Após este período, foram adicionados 5 mL do meio de cultura suplementado para desativar a ação da tripsina, e o conteúdo todo desta solução foi transferido para um tubo de centrifuga de 10 mL e este foi submetido à centrifugação por 5 minutos a 1200 rpm. Após a centrifugação o conteúdo sobrenadante foi aspirado.

A fração insolúvel (também chamada de *pellet*) foi dissolvida no meio de cultura suplementado e uma alíquota de 1 mL desta solução foi utilizada para um novo frasco de cultura celular (75 cm²), onde foram adicionados mais 10 mL do

meio de cultura suplementado. Após as células atingirem a confluência (>90 %) foram transferidas para placas de transwell.

Os frascos de cultivo foram monitorados em relação à presença de contaminantes microbiológicos, através de um microscópio ótico bioinvertido. Os procedimentos citados foram conduzidos em capela de fluxo laminar com desinfecção por luz ultravioleta e álcool 70 % v/v, sendo que todos os materiais utilizados se apresentavam estéreis.

O fluxograma geral do cultivo celular está apresentado na Figura 15.

Cultivo celular em placas transwell:

Para estudos de transporte, as células foram cultivadas em placas de transwell com seis poços cada. Cada inserto da placa possui uma membrana porosa que tem por finalidade propiciar suporte para o cultivo celular, com o intuito de simular a mucosa intestinal (parte superior, chamada apical) e a serosa intestinal (parte inferior, denominada basolateral), uma vez que as células Caco-2 não possuem a mucosa como nas células intestinais e isso poderia reduzir o número de fatores que podem desempenhar um papel na penetração transepitelial (FABIANO et al., 2018). No entanto essa grande limitação não prejudica a validade do método já relatado como eficiente para avaliar o teor de ferro.

De acordo com a densidade celular da suspensão de cultura, 1,5 mL da suspensão de células com 20×10^4 células já diluídas em meio foram adicionadas à câmara apical de cada poço, tal que o volume total foi de 1,5 mL por poço. Da mesma forma, 2 mL de meio salino (preparado em concentrações de 0,7 g L⁻¹ de KCl; 0,35 g L⁻¹ de NaHCO₃; 8,0 g L⁻¹ de NaCl e 1,0 g L⁻¹ de glicose) foi adicionado à câmara basal (Figura 16). O meio foi trocado a cada dia alternado até o uso. As placas foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂. A confluência de 90% foi atingida dentro de dez dias (Figura 17).

Foi utilizada uma Câmara de *Neubauer* para controle da densidade de células a serem utilizadas nos ensaios, possibilitando a contagem das mesmas.

A integridade da monocamada de células Caco-2 foi testada pela medição da TEER (do inglês: Transepithelial Electrical Resistance- resistência elétrica

transepitelial) no dia da realização dos ensaios no Medidor Epitelial Volt-Ohm (Millicell, modelo ERS-2, Burlington, EUA).

A resistência elétrica transepitelial (TEER) foi medida a cada 1 hora durante o experimento em 3 diferentes pontos de cada inserto que continham as culturas celulares e apenas os que apresentaram valores acima de $250 \Omega \text{ cm}^2$ e menores que $450 \Omega \text{ cm}^2$ foram considerados na análise dos resultados.

A TEER permite avaliar a integridade das monocamadas formadas, através da permeabilidade iônica entre as juntas de oclusão das células. Apresenta-se como um indicativo da diferenciação celular nos insertos, que é confirmada também através do monitoramento em microscópio ótico bioinvertido.

Amostras para o cultivo celular:

As amostras foram digeridas e apenas o sobrenadante das amostras foi adicionado às células nas placas de transwell, ou seja, apenas a fração bioacessível. As medidas de osmolalidade das frações bioacessíveis foram feitas no equipamento Semi Micro Osmometro (Knauer, modelo K-7400, Berlim, Alemanha) e ajustadas para $310 \pm 10 \text{ mOsm kg}^{-1}$ com solução de NaCl.

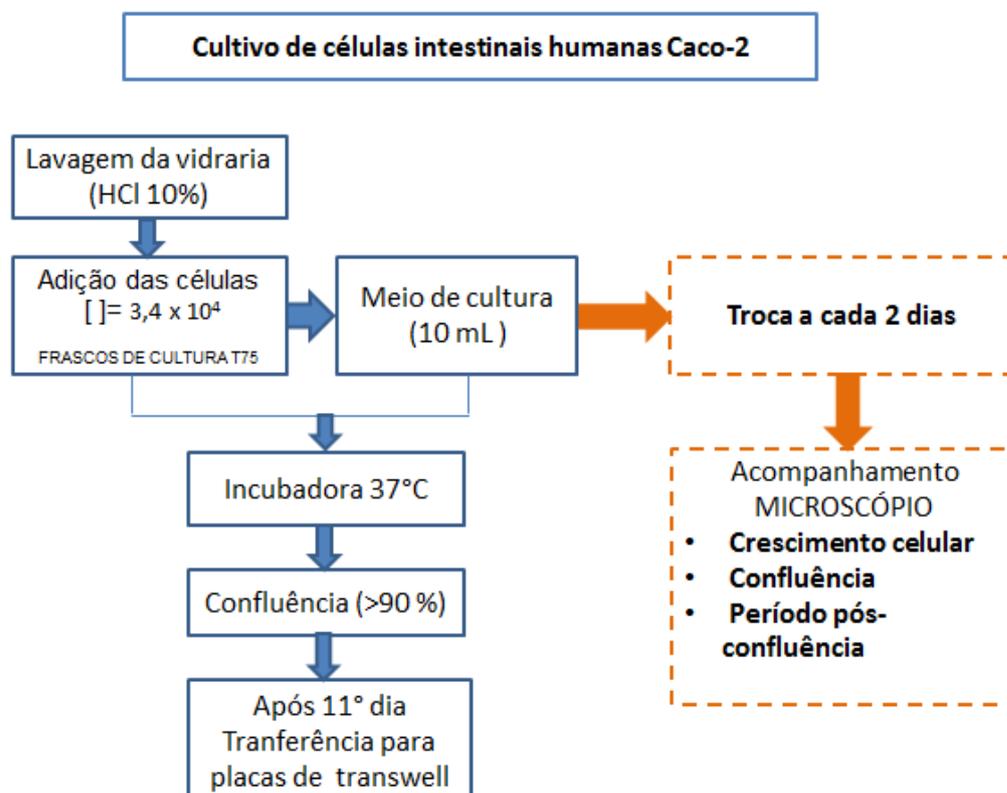


Figura 15- Fluxograma do cultivo celular.

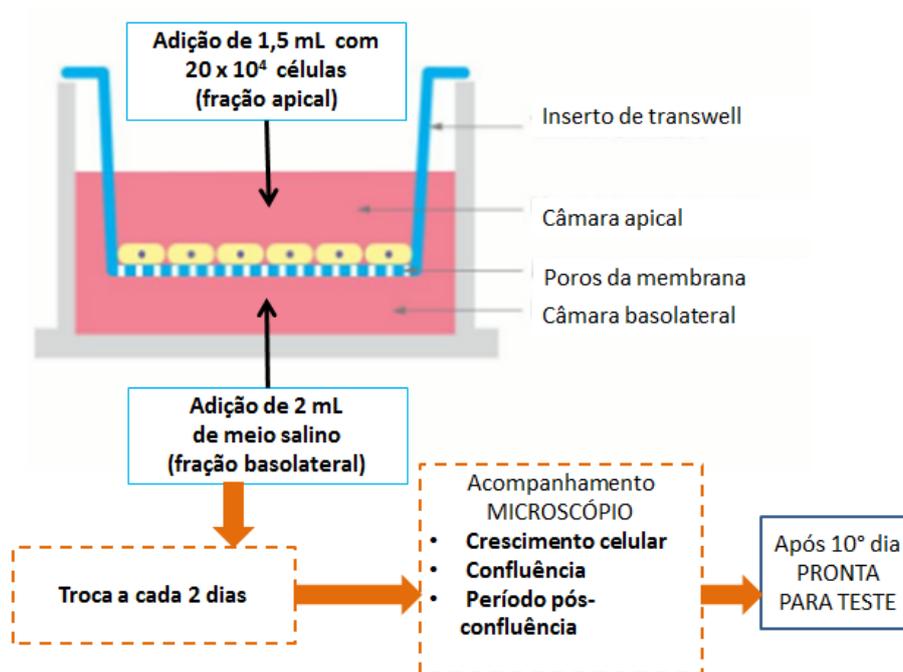


Figura 16- Esquema para adição de meio e células nas câmaras apical e basolateral dos insertos das placas transwell.

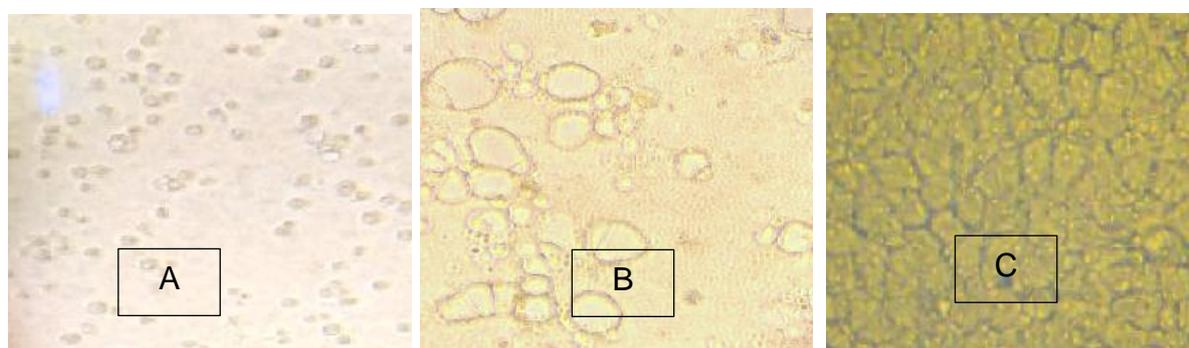


Figura 17- Fases do crescimento celular nas placas de transwell. Imagem obtida por microscopia com as células Caco-2 diferenciadas aumento de 200X. A) 1º dia na placa; B) 5º dia na placa e C) 10º dia com 90% de confluência.

4.2.10. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média aritmética e desvio padrão. Para a comparação de significância entre as médias dos resultados foi realizada

análise de variância ANOVA e teste de Tukey, para um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$) usando o programa XLSTAT versão 2012.6.03 (Addinsoft, França).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da matéria-prima e hidrolisado < 5kDa

O isolado se soro de leite (IPS) foi caracterizado apenas quanto ao conteúdo de proteínas e umidade. A Tabela 7 mostra que o IPS escolhido apresentou elevado conteúdo de proteína, acima de 90% em base seca. Como o hidrolisado foi obtido a partir do IPS hidrolisado, o conteúdo de proteínas foi similar uma vez que a umidade foi um pouco menor. O grau de hidrólise elevado é importante para aumentar o rendimento de peptídeos de baixo peso molecular.

Para as condições utilizadas de pH (8.0), temperatura (60°), relação enzima: substrato (1:100) e tempo de hidrólise (3 horas) foi obtido o grau de hidrólise de 19,04 %. No hidrolisado na concentração de proteína inicialmente presente (10%) foi utilizado para a etapa de ultrafiltração, sendo recolhido apenas o filtrado. Esta fração era de menor tamanho, uma vez que foi utilizado um corte de 5kDa. O material ultrafiltrado teve o conteúdo de proteína dosado (aproximadamente 4%) e congelado para ser utilizado posteriormente na obtenção dos complexos com o ferro.

TABELA 7- Caracterização físico-química do isolado proteico de soro de leite (IPS) e fração hidrolisada (> 5kDa).

Determinação (g/100g)	Valores (%)*	
	IPS	Hidrolisado < 5kDa
Umidade	4,42 ± 0,16	2,35 ± 0,45
Proteínas**	93,45 ± 0,97	96,46 ± 0,67

*média e estimativa de desvio padrão; **N x 6,38 para o IPS em base seca.

5.2. Caracterização do perfil aminoacídico do hidrolisado com enzima Alcalase

O perfil aminoacídico do hidrolisado total e fracionado (menor que 5 kDa) apresentaram perfil característico das proteínas do soro de leite, com elevado conteúdo de aminoácidos de cadeia ramificada (11,63% de leucina, 4,72% isoleucina e 4,68% de valina). O conteúdo proteico e aminoacídico apresentaram pequenas variações após a hidrólise. O conteúdo de aminoácidos totais e livres presentes nos hidrolisados são mostrados na Tabela 8.

O tipo de aminoácido livre reflete a especificidade da enzima em clivar as ligações peptídicas. A alcalase[®] é uma enzima proteolítica produzida por fermentação submersa de uma cepa selecionada no *Bacillus licheniformis*[®]. Entre as proteases, alcalase[®] (Subtilisin Carlsberg) é uma serina protease de grau alimentício, amplamente utilizada para produzir hidrolisados enzimáticos a partir de várias fontes proteicas, que cliva em muitos tipos de ligações peptídicas, de preferência aquelas com cadeia lateral hidrofóbica na porção C-terminal (DIETERICH, 2014). Apresenta elevada ação hidrolítica, sendo, contudo pouco específica em quebrar as ligações das cadeias proteicas.

Tabela 8- Composição em aminoácidos (totais e livres) da fração <5kDa, obtida por hidrólise com Alcalase® e ultrafiltração (g aminoácido/100g de amostra).

Hidrolisado proteico de soro de leite (HPS)		HPS Alcalase® (<5kDa)	
Aminoácidos (AA)	AA Totais (g/100g) ± DP	AA Totais (g/100g)± DP	AA Livres (mg /100g) ± DP
Ácido Aspártico	11,80 ± 00,3	12,34 ± 0,02	36,40 ± 0,12
Ácido Glutâmico	17,46 ± 0,06	18,62 ± 0,01	8,89 ± 0,02
Serina	4,02 ± 0,01	3,88 ± 0,00	7,59 ± 0,01
Glicina	1,61 ± 0,00	1,87 ± 0,01	2,88 ± 0,00
Histidina	1,87 ± 0,00	2,12 ± 0,01	25,87 ± 0,03
Arginina	2,58 ± 0,02	2,02 ± 0,00	14,52 ± 0,00
Treonina	5,17 ± 0,00	4,59 ± 0,00	68,34 ± 0,13
Alanina	4,20 ± 0,02	5,46 ± 0,01	17,31± 0,05
Polina	3,79 ± 0,01	3,60 ± 0,01	2,53 ± 0,06
Tirosina	3,31 ± 0,00	2,43 ± 0,05	4,80 ± 1,11
Valina	4,68 ± 0,02	4,95 ± 0,01	7,80 ± 0,39
Metionina	2,85 ± 0,01	2,78 ± 0,07	19,74 ± 0,10
Cistina_1	0,68 ± 0,05	1,28 ± 0,16	19,81 ± 0,02
Isoleucina	4,72 ± 0,01	6,48 ± 0,01	205,55 ± 0,64
Leucina	11,63 ± 0,01	11,67 ± 0,01	154,57 ± 0,36
Fenilalanina	3,01 ± 0,00	2,91 ± 0,00	222,28 ± 2,34
Lisina	9,79 ± 0,02	9,47 ± 0,02	125,79 ± 0,85
Triptofano	1,19 ± 0,03	nd	99,30 ± 0,38
% Proteína	93,17	96,43	944,63

DP= desvio padrão, nd= não determinado

Os aminoácidos livres do hidrolisado de baixo peso molecular são provavelmente concentrados devido ao processo de ultrafiltração, devido ao tamanho molecular que apresentam. O tamanho médio dos aminoácidos é em torno de 110 Da e sendo assim todos passam pelo corte da membrana (5 kDa). Os aminoácidos livres predominantes foram na seguinte ordem de concentração

(g/ 100g de amostra) fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, e cistina. Esses aminoácidos refletem a ação da enzima em clivar preferencialmente os grupos hidrofóbicos.

5.3. Eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE) dos hidrolisados de IPS

A Figura 18 apresenta o eletroferograma com o perfil do hidrolisado da enzima alcalase®. Os peptídeos gerados por uso desta enzima apresentaram mobilidade eletroforética influenciada pela estrutura, tamanho e carga dos mesmos. A concentração da massa peptídica foi maior no tempo de retenção de 5 a 7 minutos.

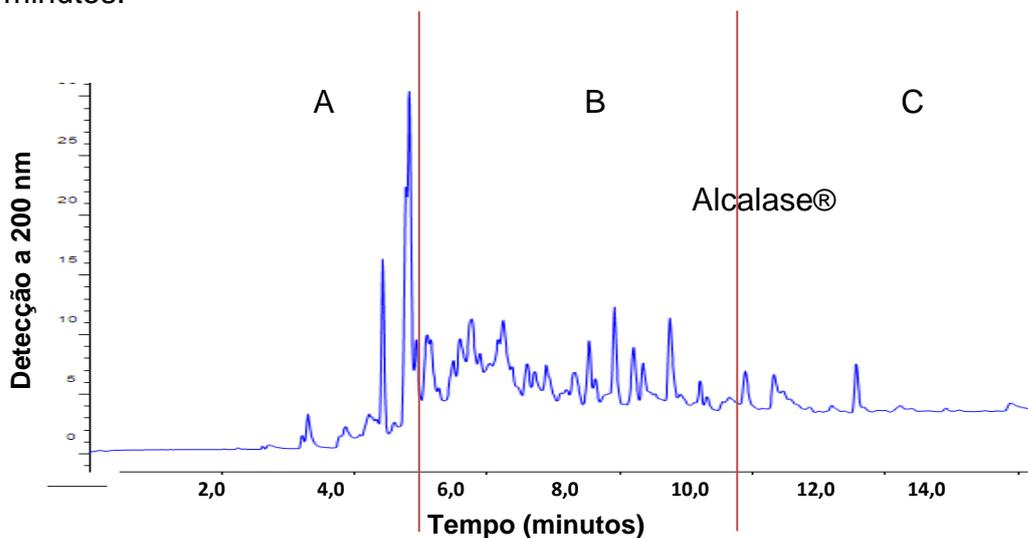


Figura 18- Perfil eletroforético do hidrolisados de isolado protéico de soro de leite (IPS) com a enzima Alcalase® com detecção a 200 nm. A) Baixa hidrofobicidade; B) hidrofobicidade intermediária e C) hidrofobicidade elevada.

Na eletroforese capilar, a separação é conduzida em tubos de diâmetro interno capilar, preenchidos com um eletrólito condutor, e submetidos à ação de um campo elétrico. A elevada resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 500 V/cm), resultando em separações de alta eficiência (geralmente excede 10^5 pratos teóricos) em tempos de análise apreciavelmente curtos. Além disso, demanda diminuta quantidade de amostra (1 a 10 mL), sendo uma técnica não destrutiva (TAVARES, 1997). Nesta técnica os compostos são separados com base na diferença entre as mobilidades iônicas, que estão relacionadas com a razão carga-massa, e a fatores estruturais.

O perfil de eletroforético mostra que os aminoácidos mais carregados de cátions migraram com maior velocidade e são detectados nos primeiros minutos do tempo de corrida. Contudo, a maior concentração de peptídeos ocorreu na região intermediária. Como o eletrólito usado foi de caráter básico (tampão de borato 20mM pH 9,3) e a polaridade era positiva (injeção no eletrodo positivo ânodo), podemos considerar que os fragmentos peptídicos quando submetidos a uma voltagem (15 kV entre os eletrodos) são arrastados pela distribuição de maior concentração de carga positiva em sua superfície.

5.4. Obtenção dos complexos Fe-peptídeo e ensaios de bioacessibilidade

O hidrolisado na forma líquida foi utilizado para a reação de complexação de peptídeos com o ferro. Foi utilizado a proporção de 10 g de peptídeo para 1 g de ferro, proveniente do sal sulfato ferroso. Desta forma para cada 100 mL do hidrolisado foi utilizado 0,4 g de ferro (1,0 g de sulfato ferroso). Todo o processo ocorreu utilizando o material líquido, onde apenas o complexo foi seco para garantir sua estabilidade e praticidade para se manipulado como um ingrediente alimentar. Para determinar a melhor proporção entre o peptídeo e o ferro foram realizadas as análises descritas a seguir (itens 5.4.1; 5.4.2; 5.4.3).

5.4.1. Otimização das condições de obtenção do complexo

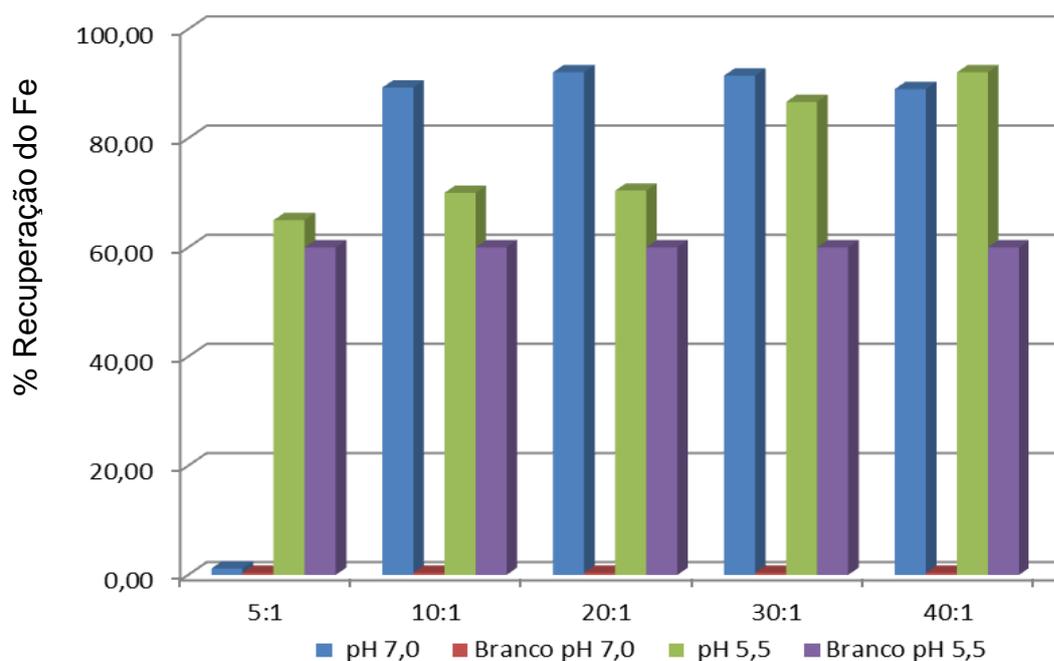
A otimização iniciou com a verificação da solubilidade do ferro complexado ao peptídeo no pH da reação (5,5) e no pH orgânico, mais especificamente do intestinal onde ocorre a absorção (pH 7,0). Para tal, foi dosado o ferro solúvel após centrifugação nos dois pHs, logo após a reação de síntese dos complexos. Assim como o dosado o ferro livre sem a presença dos peptídeos de baixo peso molecular, através de um branco controle, onde havia apenas o ferro proveniente do sulfato ferroso na mesma proporção, contudo sem a presença dos peptídeos. Em todas as determinações de ferro foi utilizado o ICP-OES com plasma de argônio, o qual apresenta elevada sensibilidade e precisão.

A presença de peptídeos complexados ao ferro garantiu a sua solubilidade nas diferentes concentrações ao redor de 90%, com excessão da proporção de 5: 1. (63 %). Os resultados da Figura 17 mostram que no pH 5,5

onde ocorre a reação de síntese dos complexos de peptídeos ao ferro, o ferro inorgânico também se apresenta solúvel, neste caso, de acordo com a literatura, na forma reduzida (Fe^{2+}) e solúvel (CONRAD; UMBREIT, 2000). Portanto, uma pequena proporção do ferro (~10 %) pode estar presente sem estar complexado ao peptídeo e provavelmente vai permanecer solúvel nas condições da reação. Esta condição não é desejável, uma vez que o ferro livre pode estar reativo e causar reações indesejáveis quando inserido em um meio orgânico.

Contudo, no pH intestinal (7,0), no qual o ferro deve permanecer solúvel para ser absorvido, a Figura 19 mostra que o ferro livre (denominado branco) proveniente do sulfato ferroso é totalmente insolúvel. Desta forma, pode se concluir que provavelmente apenas o ferro complexado aos peptídeos permanece solúvel, uma vez que na reação controle o ferro não foi dosado.

Figura 19- Solubilidade do ferro em diferentes condições de pH (5,5, e 7,0).



5.4.2. Capacidade ligante dos peptídeos pelo método DE LA HOZ et al. (2014a) modificado

A solubilidade do ferro é considerada um dos principais requisitos para promover uma alta disponibilidade de ferro para absorção (DE LA HOZ et al,

2014). A solubilidade do ferro foi superior ao controle quando nas proporções de 10:1(peptídeos:ferro), 30:1 (peptídeos:ferro) e 40:1 (peptídeos:ferro) que por sua vez se apresentaram similares entre si estatisticamente (Tabela 8).

O controle de sulfato ferroso apesar de apresentar solubilidade inferior às amostras contendo peptídeos, anteriormente citadas, ainda apresentou solubilidade elevada para o ensaio da capacidade ligante dos peptídeos, o que se deve provavelmente à faixa de pH 5.5 da solução aquosa na qual é realizada a complexação dos peptídeos com ferro, segundo método proposto (Tabela 9).

O ferro ferroso precipita a valores de pH neutro (7.0) e pode assim permanecer em estado solúvel no intestino proximal (SALOVARRA, SANDBERG, ANDLID, 2002). Já o ferro férrico precipita como hidróxidos em valores de pH acima de 4 e, portanto, precisa ser quelado no estômago ou no duodeno proximal para permanecer em estado dissolvido (CONRAD; UMBREIT, 2000). Assim, a redução da solubilidade do ferro ocorre diante das diferentes condições de pH enfrentadas durante a digestão no tratogastrointestinal como foi possível observar no estudos posteriores de bioacessibilidade na qual o controle reduz sua solubilidade para o valor de 1,84 % (Tabela 9).

Os ensaios da bioacessibilidade pelo método de PERALES et al (2005) mostrado na Tabela 9, não foram realizados com as amostras nas proporções de 5:1 e 30:1 (peptídeos:Fe) porque os resultados de solubilidade apresentaram a primeira semelhante ao controle e a segunda semelhante à amostra 40:1 (peptídeos:Fe). Assim afim de reduzir o número de amostras por ensaio, estas foram excluídas.

Tabela 9- Capacidade ligante de ferro solúvel (%) após a reação de complexação do ferro com os peptídeos em diferentes proporções (DE LA HOZ et al., 2014a) e % de solubilidade após a digestão in vitro das amostras, pelo método de PERALES et al.(2005).

Amostras (Peptídeo: Ferro)	% Fe	
	Solúvel *	Solúvel* Após a digestão
5:1	64,10 ± 3,13 ^A	nd
10:1	93,45 ± 0,22 ^C	89,34 ± 2,42 ^B
20:1	72,22 ± 1,56 ^B	90,73 ± 2,42 ^B
30:1	86,67 ± 2,71 ^C	nd
40:1	88,02 ± 1,92 ^C	92,47 ± 0,96 ^B
Controle	60,42 ± 3,83 ^A	1,84 ± 0,55 ^A

* Média de triplicatas e desvio padrão, nd = não determinado

Os resultados obtidos por este método indicam que as amostras em diferentes proporções apresentaram a mesma solubilidade, sendo diferente da amostra controle. O sulfato ferroso nas condições do teste apresentou baixa solubilidade. Esta baixa solubilidade no organismo pode representar toxicidade, uma vez que o excesso de ferro livre catalisa a geração de EROS (espécies reativas de oxigênio) que por sua vez danificam a membrana celular resultando em graves lesões corrosivas no trato gastrointestinal superior, incluindo necrose da membrana mucosa, úlcera e isquemia (UBERTI et al, 2017). No entanto, os hidrolisados proteicos podem reduzir os danos causados pela sobrecarga de ferro.

5.4.3. Dialisabilidade e estimativa da biodisponibilidade dos complexos Fe-peptídeos nas diferentes proporções peptídeos: ferro.

Os resultados obtidos para o estudo de dialisabilidade do ferro pelo método de ARGYRI et al (2009) estão apresentados na Tabela 10. Os ensaios foram realizados apenas nas proporções extremas de 10:1 e 40:1, visto que apresentaram resultados similares de solubilidade do ferro após digestão pelo método de PERALES et al (2005). Os valores obtidos indicam que as amostras com diferentes proporções de peptídeos: ferro apresentaram porcentagens do ferro dialisado, similares entre si, e diferentes da amostra controle. O sulfato ferroso nas condições do teste apresentou baixa dialisabilidade.

A maior dialisabilidade normalmente indica que quantidades de ferro solúvel e estável permanecem como tal até o momento da digestão intestinal (DE LA HOZ, 2014a). Resultados semelhantes foram encontrados por DE LA HOZ et al (2014 b), onde a dialisabilidade das amostras obtidas a partir das frações contendo peptídeos < 5 kDa e ferro foram superiores à amostra controle de sulfato ferroso e PIPES (tampão), as quais apresentaram valores de dialisabilidade de 42,4 % e 24,1 % respectivamente.

Os complexos com diferentes proporções de peptídeos: ferro foram ensaiadas nas linhagens de células Caco-2. Os resultados mostrados na Tabela 11 indicam que apenas o controle de sulfato de ferro apresentou menor disponibilidade do ferro, (nível de confiança de 95%), sendo as demais amostras similares entre si.

As células Caco-2 são reconhecidas por se assemelhar aos enterócitos que revestem o intestino delgado e, portanto, podem ser usados como modelo biológico imitando a barreira intestinal (FABIANO et al, 2017). Apesar de ter aumentado o número de estudos utilizando células Caco-2 nos últimos anos, ainda existem limitações na sua utilização. Para o ferro, por exemplo (como no caso deste trabalho), outros órgãos estão envolvidos na regulação do processo de absorção de nutrientes, como o fígado, que não é levado em consideração nos estudos realizados com estas células (SCHEERS et al., 2014). Assim, os ensaios de biodisponibilidade devem ser utilizados como uma estimativa de quanto o elemento seria absorvido pelo intestino durante a digestão e não para prever o valor real. Os resultados da Tabela 10 apresentaram similaridade nos valores

encontrados para os dois testes realizados: dialisabilidade do ferro e ferro absorvido utilizando células Caco-2.

Tabela 10- Dialisabilidade do ferro de amostras com diferentes proporções peptídeos e estimativa da biodisponibilidade do ferro em modelo transwell com linhagem celular CACO-2, para diferentes proporções de peptídeo:ferro.

Complexo peptídeos:Fe	% Fe	
	Dialisado	Biodisponível (células Caco-2)
10:1	49,07 ± 5,05 ^B	56,20 ± 6,79 ^B
20:1	nd	52,26 ± 15,66 ^B
40:1	46,70 ± 3,42 ^B	24,93 ± 9,95 ^B
Controle Fe	12,86 ± 0,0 ^A	9,6 ± 0,06 ^A

* Média de triplicatas e desvio padrão. nd=não determinado

Assim, para as diferentes proporções de peptídeo-ferro foi realizada uma análise estatística entre os métodos de dialisabilidade de ARGYRI et al. (2009) e o método de digestão de MINEKUS et al (2014) com linhagem de células Caco-2. Os resultados da Tabela 11 mostram a similaridade dos resultados para as proporções de 10: 1 e 40: 1 de peptídeo-ferro, ao nível de confiança de 95%.

Os resultados obtidos confirmam que embora a capacidade de diálise do ferro não defina o nível de absorção do ferro, é um indicativo de uma condição absorvível. Os valores mostrados (Tabela 11) vão de encontro com a afirmação de ARGYRI et al. (2011), na qual a dialisabilidade *in vitro* é uma ferramenta simples para prever a biodisponibilidade de ferro (ARGYRI et al., 2011; DE LA HOZ et al, 2014b). Alguns trabalhos realizaram um estudo comparativo da biodisponibilidade do ferro entre os métodos *in vitro* com métodos *in vivo* com humanos (ARAGÓN et al., 2012). Segundo os autores, os métodos *in vitro*, como a dialisabilidade são apropriados para o rastreio rápido de um grande número de amostras antes de seguir para ensaios com humanos. O método de ARGYRI et al. (2009) é recomendado por usar menor quantidade de amostras, reagentes e

suprimentos do que outros métodos *in vitro* descritos anteriormente. ARAGÓN et al. (2012) obtiveram para a biodisponibilidade do ferro resultados altamente correlacionados entre os métodos *in vitro* e *in vivo* ($r= 0,9765$; $P = 0,0008$). Concluíram, que em alguns casos, mesmo que a correlação não seja tão próxima, pode indicar uma tendência similar aos resultados *in vivo* em relação ao sulfato ferroso.

Em nossos estudos a correlação entre os ensaios de dialisabilidade *in vitro* e os ensaios utilizando as células Caco-2 foi maior para as amostras com a proporção de 10:1 (peptídeos:ferro) e o controle, na qual o valor de ferro dialisado e absorvido para a amostra de 10:1 (peptídeos: ferro) foi de 49,07% e 12,86% respectivamente e o valor de ferro dialisado e absorvido para a amostra controle foi de 56,20% e 9,6% respectivamente. Já para a amostra com a proporção de 40:1 (peptídeos: ferro), o valor de ferro dialisado foi muito superior ao resultado obtido no ensaio com as células Caco-2 (46,70 e 24,93 % respectivamente). Uma vez que os hidrolisados proteicos promovem a absorção de ferro de três maneiras: mantendo a solubilidade do ferro, reduzindo íons férricos a íons ferrosos para manter o ferro em um estado de baixa valência e promovendo a absorção de ferro através das membranas celulares intestinais (LI; JIANG ; HUANG, 2017), diante dos estudos realizados neste trabalho apenas o terceiro mecanismo sofreu interferência negativa com a amostra na proporção de 40:1(peptídeos:ferro), explicado talvez pela quantidade de peptídeos presentes que pode ter saturado as células e não permitindo a entrada do ferro consequentemente reduziu a absorção do ferro no estudo realizado. Manter a solubilidade do ferro, que está relacionada com a capacidade de quelação, é uma grande preocupação, a redução do íon férrico para o íon ferroso com hidrolisados de proteínas ou outros substratos também é importante, porém, o método pelo qual o ferro é transportado através da membrana celular intestinal ainda não foi suficientemente estudado, e mais pesquisas devem ser realizadas para esclarecer este mecanismo (LI; JIANG ; HUANG, 2017).

Tabela 11- Análise das diferenças entre as metodologias de dialisabilidade e estimativa da bioacessibilidade para as diferentes proporções de peptídeos: ferro.

Categoria	Média estimada	Grupos
Caco-2 (MINEKUS et al., 2014)	34,232	A
Dialisabilidade (ARGYRI, et al, 2009)	38,591	A

Os ensaios de bioacessibilidade e estimativa de biodisponibilidade com as amostras de complexos Fe-peptídeos nas proporções 10:1 e 40:1 (peptídeos/ferro) apresentaram valores semelhantes entre elas e superiores ao controle em todos os ensaios exceto para biodisponibilidade usando células Caco-2 (Figura 20).

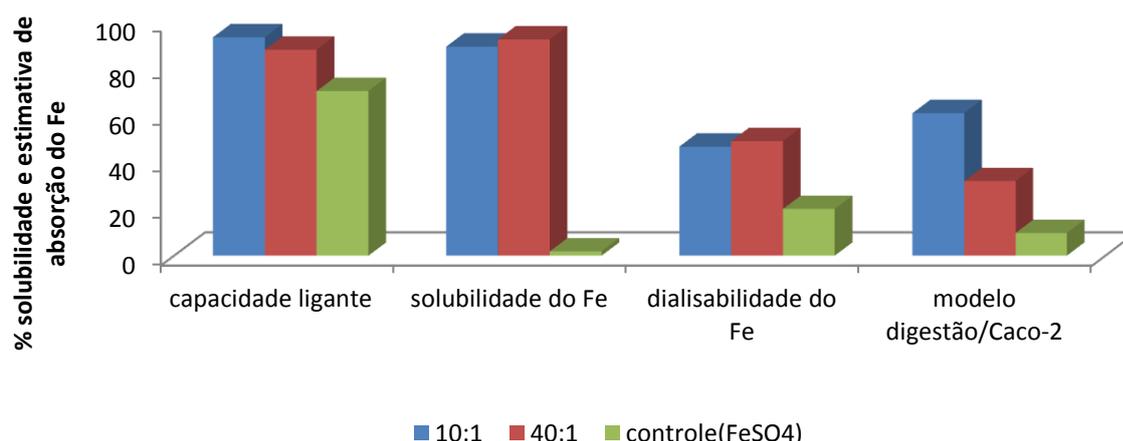


Figura 20- Comparação dos diferentes métodos para avaliação da bioacessibilidade e estimativa de biodisponibilidade do ferro.

Os resultados obtidos das análises de solubilidade, dialisabilidade e estimativa da biodisponibilidade em diferentes proporções auxiliaram na seleção da quantidade de peptídeos necessária para proporcionar uma predição do comportamento do ferro no sistema digestório (Figura 20). Foi selecionada a condição de 10: 1(peptídeos ferro), considerando esta a proporção ideal para prosseguir o trabalho. Esta condição permite reduzir os custos de produção assim

como sua introdução em matrizes alimentícias, sem ocasionar grande alteração do sabor.

5.5. Otimização da obtenção das micropartículas contendo os complexos Fe-peptídeo e ensaios de bioacessibilidade

5.5.1. Produção das micropartículas contendo Fe-peptídeos

A produção de micropartículas foi o meio encontrado para veicular e dar estabilidade aos complexos de Fe-peptídeos. Foram realizados vários testes preliminares para encontrar material de parede que não diminuíssem a absorção do ferro. As micropartículas foram produzidas de acordo com as condições selecionadas por Filiponi et al. (2019), tendo como material de parede maltodextrina e polidextrose na concentração de 80:20 (p/p), respectivamente. Para evitar a reatividade do ferro livre, uma vez que ele pode permanecer parte solúvel no pH 5,5, foi adicionado logo antes da secagem ácido ascórbico (AA), na proporção 1,6 para 1,0 de ferro (p/p) com o objetivo de reagir com o ferro ocasionalmente livre e evitar seu efeito oxidativo em espécies reativas ao oxigênio.

Os complexos peptídeos: ferro para serem utilizados como ingredientes em outras matrizes e suplementos alimentares, precisam estar na forma seca e estável durante o armazenamento. O ferro precisa estar na forma ferrosa e assim garantir a sua solubilidade e absorção. Para tal, os complexos foram adicionados de ácido ascórbico e secos em spray-dryer, onde os complexos foram veiculados como ativos. O processamento foi validado, as micropartículas caracterizadas e realizado um estudo de estabilidade das microcápsulas ao longo de 365 dias (Filiponi et al., 2019).

Outra possibilidade desejada era que a microencapsulação pudesse auxiliar no mascaramento do o sabor amargo dos peptídeos gerados pela hidrólise da alcalase[®]. Peptídeos ao serem hidrolisados expressam um sabor amargo devido à exposição dos sítios hidrofóbicos, que estavam enclausurados no interior da proteína nativa (MOHAN et al, 2015).

Depois de vários ensaios preliminares foi selecionado como material de parede a maltodextrina e a polidextrose. As maltodextrinas possuem inúmeras propriedades que permitem que sejam usadas para diversos fins, tanto na

indústria alimentícia quanto farmacêutica (TOURE et al., 2007). São comumente usadas como estabilizantes na microencapsulação de vitaminas, minerais, corantes e também gordura e óleos (GUPTA et al., 2015). Tem sido relatado em estudos realizados em modelo animal que a povidona atua como um prebiótico aumentando a absorção do ferro, principalmente devido a redução do pH fecal (SANTOS et al., 2010). Assim, pode atuar também como protetor da microbiota intestinal uma vez que o ferro não absorvido pode levar à alteração da microbiota e à inflamação intestinal (ARMAH et al., 2015; FABIANO et al., 2017).

Embora alguns autores comentem que a temperatura elevada do processamento pode promover a desnaturação da proteína, nossa hipótese é que o mesmo provavelmente não ocorre com os peptídeos, pelo seu reduzido tamanho e devido ao fato de estarem unidos ao ferro, formando estrutura externas ao metal. Contudo esta hipótese só poderá ser confirmada após a avaliação da bioacessibilidade das micropartículas.

Verificou-se que a secagem por pulverização resulta em microesferas com material ativo uniformemente distribuído no transportador, que tipicamente ocorre quando o transportador e os materiais do núcleo são similarmente hidrofílico (FILIPONI et al., 2019). O rendimento do processo, considerado como a porcentagem de ativo presente na solução alimentadora e a recuperada na forma seca foi 82 %.

O ativo na forma de micropartículas secas foi analisado quanto ao conteúdo de ferro e a implicação da secagem em disponibilizar o ativo (peptídeo:ferro). Posteriormente, as micropartículas foram utilizadas para elaborar formulações de pó para bebidas. A determinação do teor de ferro serviu para estimar a quantidade necessária de micropartículas para compor as formulações.

5.6. Estimativa da bioacessibilidade e biodisponibilidade das micropartículas.

Os estudos de bioacessibilidade e estimativa de biodisponibilidade do ferro foram realizados com as amostras de micropartículas para verificar se o material de parede utilizado não interferiria na liberação do ferro. Como pode ser

observado na Tabela 12 a solubilidade do ferro foi superior nas amostras de micropartículas em relação ao controle para todos os ensaios de bioacessibilidade e estimativa da biodisponibilidade no ensaio com a linhagem de células Caco-2.

Certos agentes quelantes e vários compostos podem formar complexos fortes com ferro e/ ou insolúveis e, conseqüentemente, ser pobres doadores de ferro para os enterócitos e, portanto, limitar a absorção (SALOVARRA; SANDEBERG, 2002). Nestes estudos foi apresentado que o material de parede utilizado para a formação da micropartícula (maltodextrina e polidextrose) não interferiu de forma negativa na solubilidade do ferro, condição preditiva para absorção do mesmo (DE LA HOZ et al, 2014a), podendo desta maneira ser utilizado para a síntese das formulações.

Tabela 12- Ensaios de bioacessibilidade e estimativa de biodisponibilidade com as amostras de micropartículas.

Amostra	(%) ± DP*		
	Solubilidade do ferro (Minekus et al. 2014)	Dialisabilidade (Argyri et al. 2009)	Células Caco-2
Micropartícula	39,12 ± 2,39	19,84 ± 1,29	34,85 ± 0,29
Controle (FeSO ₄)	10,17 ± 0,73	12,86 ± 1,88	9,72 ± 0,08

*DP= desvio padrão

5.7. Estudo das formulações: ensaios de bioacessibilidade e estimativa da biodisponibilidade.

Os resultados da Tabela 13 mostram que o sulfato de ferro usado como controle apresentou a menor solubilidade que as demais amostras. As micropartículas apresentaram uma posição intermediária às utilizadas nas formulações.

O aumento de solubilidade do ferro nas formulações de morango e tangerina, mesmo após a digestão pelo método de MINEKUS et al. (2014), provavelmente foi ocasionado pela presença de ácido ascórbico e açúcares nas fórmulas que agiram como protetores da oxidação do ferro. O ácido ascórbico é

conhecido por ser o promotor mais eficiente de absorção de ferro (TRIJATMIKO et al., 2016), principalmente pela sua capacidade de redução através dos seus grupos hidroxila (SALOVARRA; SANDEBERG; ANDLID, 2002).

As primeiras evidências de que açúcares simples, como glicose e frutose, afetam a biodisponibilidade do ferro surgiu pela primeira vez na década de 1960, a partir de um estudo que demonstrou que os açúcares eram capazes de quelar o ferro inorgânico e formar complexos solúveis estáveis e de baixo peso molecular (CHARLEY et al, 1963; CHRISTIDES; SHARP, 2013). Estes complexos de ferro-açúcar foram prontamente absorvidos através da mucosa intestinal de modelos de roedores (CHARLEY et al, 1963; CHRISTIDES; SHARP, 2013). O achado mais consistente em relação aos mono e dissacáridos e ferro é que a frutose aumenta a absorção dietética de ferro não- heme, possivelmente por quelação e / ou redução de ferro para a forma ferrosa, aumentando a solubilidade e permeabilidade do mesmo no enterócito (CHRISTIDESE; SHARP; 2013).

A presença da membrana de diálise no ensaio da dialisabilidade representa um obstáculo para a absorção do ferro, simulando a parede do epitélio intestinal. Após a análise de dialisabilidade foi recolhida todo o conteúdo presente na fração basolateral do sistema. Portanto, é determinado o teor de ferro que atravessou a membrana em relação ao teor de ferro inicial (Tabela 13).

As amostras de tangerina e morango permaneceram com valores mais elevados para o conteúdo de ferro dialisado em comparação ao controle e as demais amostras. Este fato é justificado pelas mesmas razões descritas para os resultados obtidos para o ensaio de solubilidade do ferro, devido a presença de ácido ascórbico e açúcares nas fórmulas que atuam como promotores da absorção do ferro.

Já a amostra de chocolate que havia apresentado solubilidade superior ao controle no ensaio de solubilidade, para o ensaio de dialisabilidade apresentou valores semelhantes ao controle reduzindo o índice de ferro absorvido (14,31%). A presença de cacau e goma xantana na formulação de chocolate pode ter relação com essa baixa bioacessibilidade do ferro.

Para comparar os dois métodos de digestibilidade foi realizada uma adaptação, onde o protocolo de digestão de MINEKUS et al (2014) foi adaptado para o sistema de placas com membrana de diálise de ARGYRI et al (2009). A

vantagem do protocolo de MINEKUS et al (2014) é ser mais abrangente, pois envolve a fase oral e utiliza uma maior concentração de sais do que aquele proposto por ARGYRI et al (2009). Contudo, o sistema em placas com membranas (6- 8 kDa) apresenta a vantagem de trabalhar com pequena quantidade de amostra, sendo um método validado para prever o comportamento da matriz em disponibilizar o ferro. Assim sendo, foi utilizado o sistema de placas com 6 poços e membrana de diálise nas condições de digestão proposta por MINEKUS et al (2014). O método de MINEKUS consiste de um estudo inter-laboratorial e tem sido usada como referência para digestão em matrizes complexas.

Os resultados obtidos no sistema composto por membrana de diálise, também está apresentado na Tabela 13. É notável que a presença de maior concentração de sais levou a menor passagem do ferro através da membrana. Contudo, os valores relativos foram similares para os dois ensaios de dialisabilidade, mostrando que as formulações de tangerina e chocolate permaneceram no mesmo grupo em ambos os ensaios. Estatisticamente, os ensaios de dialisabilidade ao nível de confiança de 95 % foram compatíveis, como apresentado na Tabela 14.

A estimativa da biodisponibilidade do ferro foi realizada com a linhagem de células Caco-2, na qual a fração solúvel das amostras adicionadas às células foi resultante da digestão pelo método de digestão in vitro de MINEKUS et al. (2014). Neste ensaio, após o período de quatro horas em estufa, foi recolhido o conteúdo total presente nas frações apical e basolateral das placas transwell para determinação do teor de ferro (Tabela 13). Os resultados mostraram que todas as amostras das micropartículas e das formulações tiveram uma absorção superior à amostra controle. As demais amostras diferiram entre si, sendo que os sabores de tangerina e morango apresentaram o mesmo comportamento dos ensaios de bioacessibilidade realizados.

Tabela 13- Solubilidade do ferro nas amostras após digestão pelo protocolo de Minekus et al. (2014), dialisabilidade do ferro pelo protocolo de Argyri et al. (2009) e estimativa da biodisponibilidade com células Caco-2.

AMOSTRAS	%			
	Fe solúvel	Fe dialisado	Fe dialisado	Fe absorvido
	<i>Minekus et al.(2014)</i>	<i>Argyri et al.(2009)</i>	<i>Minekus et al. (2014)</i>	Caco-2
Tangerina	85,76 ± 0,55 ^c	36,76 ± 4,00 ^c	17,96 ± 3,85 ^B	80,53 ± 0,09 ^C
Morango	90,91 ± 1,22 ^c	29,98 ± 3,26 ^{B,C}	20,90 ± 1,63 ^B	84,13 ± 0,04 ^D
Chocolate	36,58 ± 2,19 ^B	14,31 ± 1,10 ^A	4,32 ± 0,59 ^A	33,63 ± 0,52 ^B
Controle (FeSO ₄)	10,17 ± 0,73 ^A	12,86 ± 1,88 ^A	0,75 ± 0,25 ^A	9,72 ± 0,08 ^A

* valor médio de três determinações e desvio padrão

Tabela 14- Análise das diferenças entre os métodos de dialisabilidade por ARGYRI et al. (2009) e método de MINEKUS et al (2014) adaptado para o sistema de ARGYRI et al (2009).

Categoria	Média	
	estimada	Grupos
MINEKUS et al., 2014 adaptado	8,03	A
ARGYRI et al., 2009	14,32	A

6. CONCLUSÕES

A proporção de 10:1 peptídeo: ferro apresentou desempenho desejável na reação de complexação com o ferro. O processo de microencapsulação do complexo Fe-peptídeo mostrou um desempenho superior à amostra controle, quanto a bioacessibilidade do ferro. A análise estatística mostrou que a adaptação do método da digestão de MINEKUS para o sistema de ARGYRI ratificou os resultados obtidos pelo método de digestão de ARGYRI, para as diferentes proporções avaliadas neste estudo. O método de ARGYRI se mostrou preditivo para o modelo celular com linhagens de Caco-2. A presença de ácido ascórbico,

cítrico e açúcares, nas formulações, de tangerina e morango contribuem para aumentar a absorção do ferro, segundo os resultados obtidos para a bioacessibilidade e estimativa de biodisponibilidade do mineral. O sabor chocolate não mostrou um desempenho favorável provavelmente devido a adição de gomas para prover a consistência viscosa característica da bebida. A secagem e microencapsulação do complexo Fe: peptídeo é importante para viabilizar seu uso como ingrediente ativo em outras formulações e promove maior bioacessibilidade quando incorporada a formulações.

7. REFERÊNCIAS

ABBASPOUR N., HURRELL R., KELISHADI R. Review on iron and its importance for human health. **Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 19, n. 2, p. 164-174, 2014.

ADLER-NISSEN, J. Enzymic hydrolysis of food protein. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1985.

ANTUNES, S. A.; CANZIANI, M. E. F. Heparin: an important iron metabolism regulator in chronic kidney disease. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, vol.38, n.3, p. 351–355, 2016.

ARGYRI, K.; TAKO, E., MILLER, D.; GLAHN, R.P.; KOMAITIS, M.; KAPSOKEFALOU, M. Milk peptides increase iron dialyzability in water but do not affect DMT-1 expression in caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1538-1543, 2009.

ARMAH, S.M., CARRIQUIRY, A.L., REDDY, M.B. Total iron bioavailability from the US diet is lower than the current estimate. **Journal of Nutrition**, vol. 145, n.11, p. 2617–2621, 2015.

ARTINS, E. A. L.; ROBALINHO, R. L.; MENEGHINI, R. Oxidative stress induces activation of a cytosolic protein responsible for control of iron uptake. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 316, p. 128- 134, 1995.

AUERBACH, M.; ADAMSON, J. W. How we diagnose and treat iron deficiency anemia. **American Journal of Hematology**, v. 91, p. 31–38, 2016.

AUGUSTIN, M. A.; HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chemical Society Reviews**, vol. 38, n. 4, p. 902–912, 2009.

BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A., Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption, **J. Pharmacol. Toxicol. Meth.**, vol.44, p. 301-312, 2000.

BENITO, P.; MILLER, D. Iron absorption and bioavailability: na update review. **Nutrition Research**, v. 18, n. 3, p. 581-603, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas: Anemia por deficiência de ferro. Portaria SAS/MS nº 1.247, de 10 de novembro de 2014.

BRASIL , ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 259, de 20 de setembro de 2002 .

BRYSEWSKA, M. A.; LAGHI, L.; ZANNONI, A.; GIANOTTI, A.; BARONE, F.; SAA, D.L.T; BACCI, M.L.; VENTRELLA, D. ;FORNI, M. n vitro bioaccessibility and bioavailability of iron from breads fortified with microencapsulated iron. **Lwt. Elsevier Ltd**,vol. 99, p. 431–437, 2018.

CAETANO-SILVA, M.E., PACHECO, M. T.B, LEME, A. F.P, NETTO, F.M. Iron-binding peptides from whey protein hydrolysates: Evaluation, isolation and sequencing by LC–MS/MS. **Food research international**, v. 71, p. 132–139, 2015.

CAETANO-SILVA, M.E.; CILLA, A.; PACHECO, M.T.B.; NETTO, F.M.; ALEGRIA, A.Evaluation of in vitro iron bioavailability in free form and as whey peptide iron complexes. **Journal of food composition in analysis**, 2017.

CAMASCHELLA, C. New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. **Blood Reviews**, 2017.

CÁMARA, F. *et al.* Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods”, **Food Chemistry**, vol.92, n.3, p. 481–489. 2005.

CARMO, E.L.; FERNANDES, R.V.B.; BORGES, S. V. Microencapsulação por spray drying, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. **Journal of Chemical Engineering and Chemistry**, v. 1, n.2, p.030-044, 2015.

CARREIRA R. L. et al. Perfil peptídico de hidrolisados Proteicos da farinha de trigo. *pesq. Agropec. Trop.*, Goiânia, v. 41, n. 4, p. 481-489, out./dez. 2011.

CHARLEY PJ, SARKAR B, STITT CF, SALTMAN P. Chelation of Iron by Sugars. *Biochimistry Biophysical Acta*, vol. 69, p. 313–321, 1963.

CHRISTIDES, T.; SHARP, P. Sugars increase non-heme iron bioavailability in human epithelial intestinal and liver cells. *PloS One*, vol.8, n.12, 2013.

CHRONAKIS, I.S. On the molecular characteristics, compositional properties, and structural-functional mechanisms of maltodextrinas: a review. *Critical Reviews in Food Science*, v.38, n.7, p.599-637,1998.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition, vol.11, p. 254–262. 2000

CONRAD, M. E.; UMBREIT, J. N. Iron absorption and transport - an update. *The American Journal of Hematology*, vol. 64, p. 287-298, 2000.

COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de nutrientes. 3ed. Barueri, SP: Manole, 2009.

CRUZ-HUERTA, E. ;MAQUEDA, D. M.;RECIO,D.M., DE LA HOZ, L.;NUNES, V. S.PACHECO, M.T.B;AMIGO, L. Short communication: Identification of iron-binding peptides from whey protein hydrolysates using iron (III) -immobilized metal ion affinity chromatography and reversed phase-HPLC-tandem mass spectrometry, *Journal of Dairy Science*. Elsevier, vol.99, n. 1, p. 77–82, 2016.

DA SILVA, E.do N. Nutrientes e elementos tóxicos em alface (*lactuca sativa*): estudos de bioacessibilidade, biodisponibilidade, biofortificação e especiação. Tese de Doutorado - Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, 2016.

DE BENOIST, B.; MCLEAN, E., EGLI, I. AND COGSWELL, M. EDS. Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005. WHO Global Database on Anaemia Geneva, World Health Organization, 2008.

DE LA HOZ, L.; SILVA, V.S.N.; MORGANO, M.A.; BERTOLDO-PACHECO, M.T. Small peptides from enzymatic whey hydrolysates increase dialyzable iron. *International Dairy Journal*, v.38, p 145-147, 2014b.

DE LA HOZ, L. L. *et al.* Iron-binding properties of sugar cane yeast peptides. *Food Chemistry* , v.142, p.166 - 169, 2014 a.

DIAS, D. R.; BOTREL, D. A., FERNANDES, R. V. D. B., BORGES, S. V. Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 31-37, 2017.

DIETERICH, F. Desenvolvimento, avaliação físico-química e biológica de hidrolisado proteico de resíduos agroindustriais para surubim. tese de doutorado da universidade paulista (UNESP),2014.

DONOVAN, A., ROY, C. N.,ANDREWS, N.C. The Ins and Outs of Iron Homeostasis. **Physiology**, vol.21, n. 2, p. 115-123, 2006.

ETCHEVERRY, P., GRUSAK, M. A. E FLEIGE, L. E. Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B 6, B 12, D, and E, **Frontiers in Physiology**, 3 AUG(August), p. 1–22, 2012.

FABIANO, A. ABIANO, A.;BRILLI, E.;FOGLI, S.;BECONCINI, D.;CARPI, S.;TARANTINO, G.; ZAMBITO, Y.Sucrosomial® iron absorption studied by in vitro and ex-vivo models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2018.

FABIANO, A. BRILI, E.; F.; STEFANO F.; BECONCINI, D.; CARPI, S.; TARANTINO, G.; ZAMBITO, Y. Sucrosomial® iron absorption studied by in vitro and ex-vivo models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 111, n. jun. 2017, p. 425-431, 2018.

FANG, Z., BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - a review. Trends in **Food Science & Technology**, v.21, n. 10, p.510-523, 2010.

FILIPONI, M.P; GAIGHER, B.; CAETANO-SILVA, M.E.; ALVIM, I.D.; PACHECO,M.T.B. Microencapsulation performance of Fe-peptide complexes and stability monitoring. **Food Research International**, vol.125, 2019.

GARCÍA-NEBOT,CASTRO, D. Advantages and disadvantages of the animal models v. in vitro studies in iron metabolism: a review. **Animal**, vol., 7, n. 10, p 1651–1658, 2013.

GARTI, N.; MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals. Woodhead Publishing, 2012.

GAUCHERON, F. Iron fortification in dairy industry. **Trends in Food Science and Technology**, vol.11, n.11, p. 403–409. 2000.

GERA, T.; SACHDEV, H.S.; BOY, E. Effect of iron-fortified foods on

hematologic and biological outcomes: Systematic review of randomized controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 96,p. 309–324, 2012.

GHARIBZAHEDI, S. M. T., & JAFARI, S. M. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. **Trends in Food Science and Technology**, vol.62, p. 119-132, 2017.

GLAHN, R. P., LEE, O. A. E MILLER, D. D. In Vitro Digestion / Caco-2 Cell Culture Model to Determine Optimal Ascorbic Acid to Fe Ratio in Rice Cereal. **Journal of Food Science**. vol. 64, n.5, p. 1–4. 1999.

GLAHN, R. P., WIEN, E. M., VAN CAMPEN, D. R., MILLER, D. D. Caco-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels in vivo studies: use of a novel in vitro method for rapid estimation of iron bioavailability. **The Journal of nutrition**, vol. 126, n.1, 332-339, 1996.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 390-397, 2008 .

GULEC, S.; ANDERSON, G. J., COLLINS, J. F. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**,v. 307, n. 4, p. 397-409, 2014.

GUPTA, C., CHAWLA, P., ARORA, S., TOMAR, S. K., SINGH, A. K. Iron microencapsulation with blend of gum arabic, maltodextrin and modified starch using modified solvent evaporation method - Milk fortification. **Food Hydrocolloids**, v. 43, n. 1, p. 622–628, 2015.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of aminoacids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n.6, n. 912-916, 1989.

HUR, S.J.; LIM, B.O.; DECKER, E.A.; MCCLEMENTS, D.J., In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, vol.125, p. 1-12, 2011.

HURREL, R. How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food. **Nutrition Reviews**, v. 60, n. 7, p. S7-S15, 2002.

HURRELL, R; EGLI. I. Iron bioavailability and dietary reference values. **The American Journal of Clinical Nutrition**. vol.91, n.5, p.1461-1467, 2010.

JORDÃO, R.E.; BERNARDI, J.L; BARROS FILHO, A.D.A. Prevalência de anemia ferropriva no Brasil: uma revisão sistemática. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 27, n. 1; p. 90-8, 2009.

KAPSOKEFALOU, M.; MILLER, D. D. Effects of meat and selected food components on the valence of nonheme iron during in vitro digestion. **Journal of Food Science**, vol.56, n. 2, p. 352–358, 1991.

KIM, S.B.; SEO, I. S.; KHAN, M. A.; KI, K. S. NAM, M.S; KIM, H. S. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. **International Dairy Journal**, vol. 17, p. 625-631, 2007.

KIM, H. J.; et al.Cytotoxicity, intestinal transport, and bioavailability of dispersible iron and zinc supplements, **Frontiers in Microbiology**, vol.8, p. 1–14, 2017

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.3, n. 2, p.39–48, 2002.

KIM, S. B.; LIM, J. W. Calcium-binding peptides derived from tryptichydrolysates of cheese whey protein. Asian-australas. **Journal of Animal Science**, v. 17, p. 1459-1464, 2004.

KIM, S.B.; SEO, I. S.; KHAN, M. A.; KI, K. S. NAM, M.S; KIM, H. S. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. **International Dairy Journal**, vol. 17, p. 625-631, 2007.

KIM, H. J.; BAE, S.H., KIM; H. J., KIM, K.M.; SONG, J. H.; GO, M.R, J. Y., OH, J. M. Cytotoxicity , Intestinal Transport , and Bioavailability of Dispersible Iron and Zinc Supplements. **Frontiers in Microbiology**, vol.8, p.1-14, 2017.

KISKINI, S., ARGIRI, K., KALOGEROPOULOS, M., KOMAITIS, M., KOSTAROPOULOS, A., MANDALA, I., & KAPSOKEFALOU, M. Sensory characteristics and iron dialyzability of gluten- free bread fortified with iron. **Food Chemistry**, vol. 102,p. 309–316, 2007.

KIM, S. B.*et al.* Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 6, p. 625-631, 2007a.

KRATZER, F.H., & VOHRA, P. The colorimetric detection and quantitation of total protein current protocols in cell biology. Inc. **Chelates in nutrition**. Boca Raton, Florida: CRC Press. Krohn, R.I. 2001.

KLOOTS, W., DEN KAMP, D. O.; ABRAHAMSE, L. In vitro iron availability from iron-fortified whole-grain wheat flour. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, vol.52,p. 8132–8136, 2004.

LATIMER, G. W. JR. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 19th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2012.

LEDESMA, B. H. *et al.* Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. **International Dairy Journal**, v.38 ,p.82-100,2014.

LESMESS, U., & MCCLEMENTS D. J. Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. **Trends in Food Science Technology**, v.20, n.10, p.448-457, 2009.

LI, Y.; JIANG, H.;HUANG, G. Protein Hydrolysates as Promoters of Non-Haem Iron Absorption. **Nutrients**. vol. 9, p.609, 2017.

MACKENZIE, E. L., IWASAKI, K., TSUJI, Y. Intracellular Iron Transport and Storage: From Molecular Mechanisms to Health Implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.10, n.6, p. 997–1030, 2008.

MADUREIRA, A. R.;TAVARES, T.;GOMES, A.M.P.;PINTADO, M.E.;MALCATA, F.X. *et al.* Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey protein, **Journal of Dairy Science**. Elsevier, vol.3, n.2, p. 437–455. doi: 10.3168/jds.2009-2566. 2010.

MAHLER GJ, SHULER ML, GLAHN RP. Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. **J Nutr Biochem** 20:494–502, 2009.

MILLER DD, SCHRICKER BR, RASMUSSEN RR, VAN CAMPEN D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 34, p.2248-56, 1981.

MINEKUS, M. *et al.* “A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus”, **Food and Function**, 5(6), p. 1113–1124. 2014.

MOHAN, A. RAJENDRAN, S. R. C. K., HE, Q. S., BAZINET, L., & UDENIGWE, C. Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: A

review, *RSC Advances*. **Royal Society of Chemistry**, 5(97), p. 79270–79278. 2015.

MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S. C. N.; , FERREIRA, M. M. C. Determinação dos teores de minerais em sucos de frutas por espectrometria de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). **Ciência de Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, p. 344-348, 1999.

NORONHA, J. A. , KHASAWNEH, E. A. E. Anemia in Pregnancy - Consequences and Challenges: A Review of Literature. **Journal of South Asian Federation of Obstetrics and Gynecology**, vol. 4, n. 1, pg. 64-70, 2012.

NORONHA, J. A. *et al.* Literature Review Anaemia., **Journal of South Asian Federation Of Obstetrics and Gynaecology**, 4(1), p. 64–70. 2012

OLIVEIRA, O.W.; PETROVICK, P.R. Secagem por aspersão (spray drying) de extrato vegetais: bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.4, p.641-650, 2010.

OU, K; LIU, Y.; ZHANG, L.; YANG, X.; HUANG, Z.; NOUT, R.M.J.; LIANG, J. Effect of neutrase, alcalase and papain hidrolisis of whey protein concentrates on iron uptake by caco-2 cells. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, vol. 58, p. 4894-4900, 2010.

PACHECO, M. T. B., DIAS, N. F. G., BALDINI, V. L. S., TANIKAWA, C., SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite, vol.25, n.2, 333–338, 2005.

PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Effect of different hydrolysates of whey protein on hepatic glutathione content in mice. *Journal of Medicinal Food*, v. 8, p. 337-342, 2005.

PADOVANI, R. M.; AMAYA-FARFAN, J.; COLUGNATI, F. A. B.; DOMENE, S. M. A. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. *Revista de Nutrição*, vol.19, n.6, pp. 741-760, 2006.

PASRICHA, S.R., SHET, A.S., BLACK, J.F., SUDARSHAN, H., PRASHANTH, N.S., BIGGS, B.A. Vitamin B-12, folate, iron, and vitamin A concentrations in rural Indian children are associated with continued breastfeeding, complementary diet, and maternal nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 5, pg. 1358–1370, 2011.

PAULO, F., SANTOS, L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 77, n.0, p.1327-1340, 2017.

PERALES, S.; BARBERA, R.; LAGARDA, M. J.; FARRE, R. Bioavailability of calcium from milk-based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dialyzability, and uptake and transport by Caco-2 cells). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.vol. 53, p. 3721–3726, 2005.

PERALES, S.; BARBERÁ, R.; LAGARDA, M.J., FARRÉ, R. Fortification of milk with calcium: Effect on calcium bioavailability and interactions with iron and zinc”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54(13), p. 4901–4906. 2006.

PRENTICE, A.M., MENDOZA, Y.A., PEREIRA, D., CERAMI, C., WEGMULLER, R., CONSTABLE, A., SPIELDENNER, J. Dietary strategies for improving iron status: balancing safety and efficacy. **Nutrition Reviews**, v. 75, n.1, p. 49-60, 2017.

PREZA, G. C., PINON R., GANZ, T., NEMETH, E. . Cellular Catabolism of the Iron-Regulatory Peptide Hormone Hepcidin, **PLoS ONE**, v.8, n. 3, p. 1–6. 2013.

PRICE, W. J.; ROOS, J. T. H. Analysis of fruit juice by atomic absorption spectrophotometry -The determination of iron and tin in canned juice. Pye Unicam Ltd., York Street, Cambridge, 1969.

RAY, S., RAYCHAUDHURI, U., CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, v.13, n. 1, p.76-83, 2016.

REN, Z. Y.; HUANG, G. R.; JIANG, J. X., CHEN, W.W. Preparation and characteristic of iron-binding peptides from shrimp processing discards hydrolysates. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 5, p. 348-354, 2011.

RUTZ, F.; MURPHY, R. Minerais orgânicos para aves e suínos. I Congresso Internacional sobre uso da levedura na alimentação animal, CBNA - Campinas, SP, 2009. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/cet/img/20091103_minerais.pdf>. Acesso em: 10 set 2018.

SAHUQUILLO, A., BARBER, R. ; FARR, R. Bioaccessibility of calcium, iron and zinc from three legume samples. **Nahrung - Food**, vol.47, n.6, p. 438–441, 2003.

SALOVAARA, S., SANDBERG, A. S. E ANDLID, T. Organic acids influence iron uptake in the human epithelial cell line Caco-2”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(21), p. 6233–6238. 2002.

SANTOS, E. F. ;TSUBOI, K. H.;ARAÚJO, M. R.;FALCONI, M. A.OUWEHAND, A. C., ANDREOLLO, N. A.MIYASAKA, C. K. Ingestion of polydextrose increase the iron absorption in rats submitted to partial gastrectomy”, **Acta Cirurgica Brasileira**, 25(6), p. 518–524. 2010.

SCHEERS, N. M. , ALMGREN, A.B.; SANDBERG, A.S. Proposing a Caco-2/HepG2 cell model for in vitro iron absorption studies. **The Journal of nutritional biochemistry**, vol. 25, n.7, p. 710-715, 2014.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, 39: 1412- 1415, 1967.

SPINELLI, M.G.N, MARCHIONI, D.M.L, SOUZA, J.M.P., SOUZA, S.B, SZARFARC, S.C. Fatores de risco para anemia em crianças de 6 a 12 meses no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 17, n.2, pg. 84–91, 2005.

SUAVE, J. DALL’ANGOL E. C., PEZZIN, A. P. T., SILVA, D. A. K., MEIER, M. M., SOLDI V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, n.2, p.12-20, 2006.

SZARFARC, S. C. Políticas publicas para o controle da anemia ferropriva. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 2-7, 2010.

TAIT, S. F. et al. The usefullness of in vitro models to predict the bioavailability of iron and zinc: A consensus statement from the harvest plus expert consultation. **International Journal of Vitamins and Nutrition Research**, vol. 75, n.6, 2005.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. Tese de doutorado da universidade de são paulo (usp), 1997.

TAYLOR, T.A., KENNEDY, K.A. Randomized trial of iron supplementation versus routine iron intake in VLBW infants. **Pediatrics**, v.131, n. 2, pg. 433-8, 2013.

TOURE, A., ZHANG, X. M., JIA, C. S., DONG, Z. J. Microencapsulation and oxidative stability of ginger essential oil in maltodextrin/whey protein isolate (MD/WPI). **International Journal of Dairy Sciences**, vol.2, n.4, 387 e 392, 2007.

TRIJATMIKO, K. R. DUEÑAS, C. ; TSAKIRPALOGLU, N.; TORRIZO, L.; ARINES, F.; MARIA, O.; SAPASAP, M.V.; BORRERO, J.; PERIGIO, J.; FRANCISCO, P.; NELSON, A. NAKANISHI, N.; LOMBI, E. ; TAKO, E. ; GLAHN, R.P.; STANGOULIS, J.; MOHANTY, P.C.; JOHNSON, A.A.T.; TOHME, J.; BARRY, G. ; SLAMET-LOEDIN, A.H. Biofortified indica rice attains iron and zinc nutrition dietary targets in the field. *Scientific reports*, vol.6, 2016.

UBERTI, F.; MORSANUTO, V.; GHIRLANDA, S.; MOLINARI, C. Iron absorption from three commercially available supplements in gastrointestinal cell lines. **Nutrients**, vol. 9, n. 9, p. 1-18, 2016.

VAN CAMPEN, D.R.; GLAHN, R.P., Micronutrient bioavailability techniques: Accuracy, problems and limitations, **Field Crops Res.**, vol.60, n., p.93-113, 1999.

VIEIRA, A.C.F., DINIZ, A.S, CABRAL, P.C, OLIVEIRA, R.S, LOLA, M.M.F, SILVA, S.M.M. Nutritional assessment of iron status and anemia in children under 5 years old at public day care centers. **Journal of Pediatric (Rio Janeiro)**, v.83, n.4, p.370-6, 2007.

WANDREY, C.; BARTKOWIAK, A.; HARDING, S. E. Materials for Encapsulation In: Zuidam N.J., Nedovic, V.A. (Eds.). **Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing**, New York: Springer, p. 31- 100, 2009.

WANG, P. F., HUANG, G. R., & JIANG, J. X. Optimization of hydrolysis conditions for the production of iron-binding peptides from mackerel processing byproducts. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 5, n.7, p. 921–925, 2013.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY; J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **The Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n.4, p. 170-177, 1986.

WHO. Iron Deficiency Anaemia - Assessment, Prevention and Control. A guide for programme managers. World Health Organisation: WHO/NHD/01.3; 2001.

WHO. The global prevalence of anaemia in 2011. Geneva: World Health Organization, 2015. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/177094/1/9789241564960_eng.pdf> Acesso em: 10 set. 2018.

WHO. Guideline: Daily iron supplementation in infants and children. Geneva: World Health Organization, 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204712/1/9789241549523_eng.pdf?ua=1&ua=1> Acesso em: 5 mar. 2017.

WU, H., LIU, Z., ZHAO, Y., MINGYONG, Z. Enzymatic preparation and characterization of iron-chelating peptides from anchovy (*Engraulis japonicus*) muscle protein. **Food Research International**, vol.48,p. 435–441, 2012.

ZHANG, D.L., GHOSH, M. C., ROUAULT, T. A. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 124, 2014.

ZHOU J., WANG X., AI T, CHENG X., GUO H.Y., TENG G.X., MAO X.Y. Preparation and characterization of β -lactoglobulin hydrolysate-iron complexes. **Journal dairy science**. vol.95, n.8, p.4230-6, 2012.

ZHU, L., GLAHN, R.P., NELSON, D., MILLER, D.D. Comparing soluble ferric pyrophosphate to common iron salts and chelates as sources of bioavailable iron in a Caco-2 cell culture model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 5014- 5019, 2009.

ZLOTKIN, S., ARTHUR, P., ANTWI, K. Y., & YEUNG, G. Treatment of anemia with microencapsulated ferrous fumarate plus ascorbic acid supplied as sprinkles to complementary (weaning) foods. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol.6, p. 791–5, 2001.

ZUIDAM N. J. & HEINRICH J. Encapsulation of aroma. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V.A., (Eds.). **Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing**; New York: Springer; p. 127-60, 2009.