



AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE *IN VITRO* DO FERRO EM BEBIDA ELABORADA COM PEPTÍDEOS QUELADOS.

Bruna Gaigher¹; Lucia de la Hoz², Vera S. Nunes da Silva³, Marcelo A. Morgano⁴; Maria Teresa Bertoldo Pacheco⁵

Nº 15243

RESUMO - O projeto objetivou o desenvolvimento de formulações de misturas secas para bebidas contendo como componente principal peptídeos quelados ao ferro. Para tal, peptídeos menores que 5 kDa foram obtidos da ultrafiltração de hidrolisado enzimático das proteínas de soro de leite com a enzima pancreatina. Para reação de síntese dos quelatos foi utilizado o sulfato ferroso. Os ingredientes selecionados para formulação da mistura seca visaram aumentar a biodisponibilidade do ferro e contribuir com sabor e aroma à mistura. A partir da definição dos ingredientes do sachê (20 g), a biodisponibilidade do ferro *in vitro* foi analisada considerando possíveis riscos da interação do ferro com os demais ingredientes da fórmula na absorção. Foram adotados todos os critérios de elegibilidade e dose permitida para cada componente utilizado (ANVISA). O ácido ascórbico foi adicionado para aumentar a absorção do ferro. Como agente flavorizante foi utilizado polpa desidratada de laranja. Os ingredientes utilizados na formulação afetaram negativamente a biodisponibilidade do ferro quelado, provavelmente devido ao conteúdo de fibra e outros componentes naturais da fruta do agente flavorizante usado.

Palavras-chaves: peptídeos quelantes ao ferro, soro de leite, anemia ferropriva, dialisabilidade, biodisponibilidade.

1 Autor: Bolsista CNPq (PIBITI): Graduação em nutrição, Unip, Campinas-SP, brugaiher@hotmail.com

2 Colaboradora: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP, lucia.carmem@ital.sp.gov.br

3 Colaboradora: Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP, vera.silva@ital.sp.gov.br

4 Colaborador: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP, morgano@ital.sp.gov.br

5 Orientadora: Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP, mtb@ital.sp.gov.br



ABSTRACT - *This project aimed to develop formulations for dry mix beverages containing as main component the iron-chelating peptides. To this end, 5 kDa smaller peptides were obtained from the ultrafiltration enzymatic hydrolysates of whey proteins with enzymes Pancreatina. For synthesis reaction of the chelates was used ferrous sulfate. The selected ingredients of the dry mix formulation were aimed for increasing the bioavailability of iron and contribute taste and flavor to the mixture. From the definition of sachet ingredients (20 g), in vitro iron bioavailability was analyzed considering possible risks of iron interaction with other ingredients in absorption. It was adapted all eligibility criteria and dose allowed for each component used (ANVISA). Ascorbic acid was added to enhancing iron absorption. As flavoring agent was used orange dried pulp. The ingredients used in the formulation impacted negatively on dialyzability of chelated iron, probably due to the fiber content and other natural components of the fruit flavoring agent.*

Keywords: *iron-chelating peptide, whey, iron deficiency, anemia, dializability, bioavailability*

1 INTRODUÇÃO

A eficácia da fortificação de alimentos com ferro continua sendo um desafio, devido aos problemas recorrentes associados a essa prática, incluindo variação na biodisponibilidade do ferro, alterações sensoriais, formação de sedimentos e o efeito do ferro sobre a oxidação lipídica (SUGIARTO, YE & SINGH, 2009). Neste sentido, a necessidade de suplementos de ferro que apresentem estabilidade, biodisponibilidade e sejam aceitos sensorialmente tem motivado a prospecção de novos componentes orgânicos, como alguns peptídeos bioativos, que associados ao ferro (inorgânico), permitam apresentar estas propriedades.

O ferro é um micronutriente essencial para o metabolismo do organismo e sua deficiência é observada, de forma mais acentuada, em mulheres em idade fértil e crianças. A anemia ferropriva é considerada um grave problema de saúde pública e atinge quase dois bilhões de pessoas em todo o mundo, correspondendo aproximadamente a 36% da população mundial (LIMA *et al*, 2004). Em crianças, pode prejudicar o desenvolvimento mental e psicomotor, causar aumento da morbidade e mortalidade materna e infantil, além da queda no desempenho do indivíduo adulto no trabalho e redução da resistência às infecções (JORDÃO, BERNARDI & FILHO, 2009).

Diante do fato de que, os micronutrientes participam em várias funções bioquímicas no organismo, muitas tentativas foram feitas para torná-los mais biodisponíveis e ao mesmo tempo protegê-los das condições presentes no trato gastrointestinal. Os aminoácidos e pequenos peptídeos estão entre os ligantes que melhor protegem os metais de transição no trato digestivo,



uma vez que podem se ligar aos metais em mais de um ponto de coordenação, assegurando que o átomo de metal se torne parte de uma estrutura biologicamente estável (POWER, 2006).

Estudos realizados por nosso grupo e outros, apontaram os peptídeos do soro de leite como eficientes quelantes de ferro e promissores ingredientes para elaboração de suplementos minerais para uso na prevenção da anemia (DE LA HOZ *et al*, 2014; KIM *et al.*, 2007). A motivação para utilização das proteínas do soro de leite como fonte de peptídeos quelantes de ferro tem duas fundamentações principais: a enorme disponibilidade da matéria-prima e a elevada qualidade biológica de suas proteínas (PACHECO *et al*, 2005). Portanto, justifica o objetivo do presente trabalho em utiliza-las para o desenvolvimento de um suplemento alimentar em pó hidrossolúvel, tendo como ingredientes bioativos, peptídeos quelados ao ferro, com elevada digestibilidade e biodisponibilidade do mineral, visando contribuir para prevenção da anemia ferropriva.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Matéria prima

O isolado proteico de soro de leite foi obtido da Glanbia Nutritionals (Kilkenny, Ireland), hidrolisado pela enzima pancreatina (P-1750 - Sigma- Aldrich).

2.2 Material

Os ingredientes para formulação foram de grau alimentício e todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou cromatográfico. PIPES SAL SÓDICO (P3768 – Sigma- Aldrich).

2.3 Hidrólise enzimática do isolado proteico de soro de leite (IPS) e fracionamento dos peptídeos

As condições de reação para obtenção dos hidrolisados proteicos de soro (HPS) foram selecionadas em trabalhos anteriores (DE LA HOZ *et al.*, 2014) . A reação foi monitorada por pH-Stat, utilizando o titulador automático Metler Toledo modelo DL 21 (Schwerzenbach, Switzerland). Para fracionamento foi utilizado um sistema de membranas de ultra filtração (Prep/Scale™ TFF Cartridges da Millipore, Bedford, MA, EUA) de fluxo tangencial (cut off 5 kDa).



2.4 Perfil de aminoácidos por eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE)

O hidrolisado proteico de soro de leite (HPS) foi caracterizado quanto ao perfil eletroforético em sistema de eletroforese capilar de Alta eficiência (HPCE/Agilent Technologies/Alemanha), com detector UV e arranjo de diodos e 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, 50 µm de diâmetro interno e como eletrólito de caráter básico foi usada uma solução tampão de borato 20 mM pH 9,3; a concentração da amostra foi de 5 mg/ml; temperatura do capilar a 25 ° C; voltagem de 15 kV ; injeção da amostra por pressão de 50 mbar durante 4 s; a detecção por medida da absorção a 200 nm; e o tempo de duração da corrida foi de 15 minutos para cada amostra.

2.5 Reação de síntese dos quelatos

Foi utilizada a metodologia de DE LA HOZ et al (2013), hidrolisados proteicos de soro de leite com Pancreatina e sulfato ferroso (0,1%).

2.6 Formulação das misturas secas para as bebidas

Os ingredientes básicos utilizados para composição dos sachês como ponto de partida para testes de desenvolvimento do produto foram saborizantes, adoçantes, espessantes e corantes. A legislação em vigor pertinente ao desenvolvimento foi consultada com relação a quantidade de ingredientes permitidos (ANVISA). O saborizante foi polpa de laranja desidratada e como coadjuvante da absorção do ferro foi testado ácido ascórbico.

Foram realizados testes preliminares com vários *flavorizantes* para determinar a concentração dos ingredientes visando a estabilidade dos componentes na bebida pronta. Depois de selecionado os ingredientes os testes de biodisponibilidade foram realizados em duplicatas.

2.7 Análise da biodisponibilidade do Ferro por % dialisabilidade do Ferro

Para dialisabilidade foi utilizado o método proposto por ARGYRI e colaboradores (2009). O cálculo de % dialisabilidade do Fe das amostras foi obtida através da fórmula:

$$\% \text{ Dialisabilidade do Fe} = \frac{\text{Fe dialisado}}{\text{Fe total}} \times 100 \quad \text{onde,}$$

Fe dialisado é aquele que atravessa a membrana de dialise e Fe total é o conteúdo de ferro inicialmente adicionado às amostras antes da digestão (0,25 mM).

2.8 Análise de ferro

O teor de ferro presente nas amostras e nos produtos da reação de quelação foi determinado de acordo com a metodologia descrita por SCHIAVO *et al.* (2013), utilizando um sistema de espectrometria de emissão com fonte de plasma de argônio e digestão com micro-ondas (MP-AES), marca Agilent Technologies, modelo 4100 MP-AES, Tokyo, Japan).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE)

O eletroferograma do hidrolisado da enzima Pancreatina está na Figura 1.

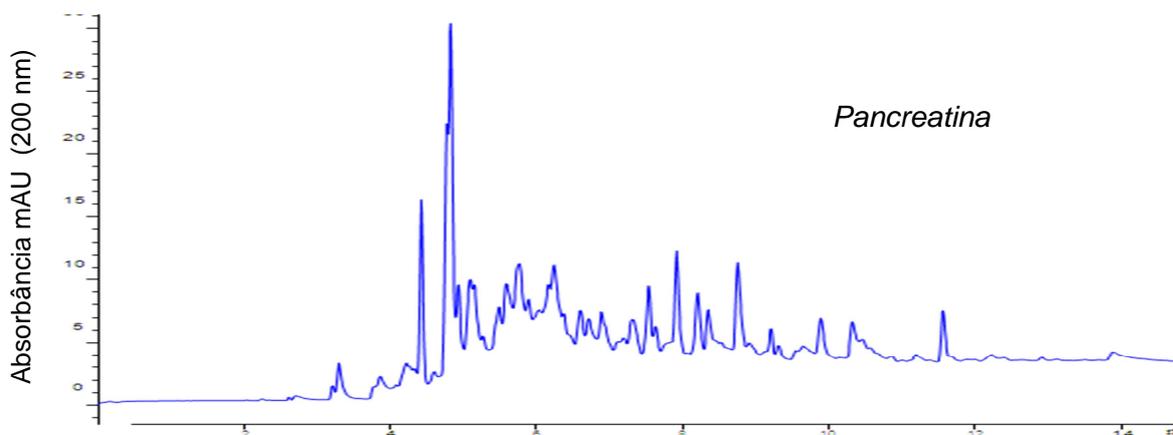


Figura 1. Perfil eletroforético do hidrolisado das proteínas de soro de leite (HPS) com a enzima pancreatina.

Na Figura 1 o perfil obtido para o hidrolisado das proteínas de soro de leite com pancreatina mostra que os peptídeos (<5 kDa) são diferentes quanto a composição de aminoácidos, carga e tamanho, fazendo com que o seu deslocamento ao longo do capilar fosse distinto, gerando um eletroferograma com picos com tempo de eluição entre 4 e 13 min.

3.2 Fórmula da mistura seca para bebida

Os ingredientes utilizados na composição da mistura seca (sachê de aproximadamente 20 g) foram: 86,5 % de sacarose; 10 % de polpa de fruta (laranja); 2,8 % de hidrolisado de soro de leite;



0,18 % de sulfato ferroso; 0,15% de ácido ascórbico; 0,05 % de corante (laranja e amarelo sintético). Os sachês foram realizados em duplicata.

3.3 Ensaio de biodisponibilidade por dialisabilidade do ferro presente na formulação

O ferro dialisado, expresso como porcentagem da quantidade de ferro inicial do tratamento da digestão (0,25 mM), foi usado para a comparação apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Ensaio de biodisponibilidade de ferro por dialisabilidade em diferentes tratamentos^a.

Tratamentos	(%) Fe dialisado ^a Peptídeos < 5 kDa (Pancreatina)
Tampão PIPES + Fe	27,85 ± 1,10
Peptídeos quelados-Fe sem ácido ascórbico	41,17 ± 2,40
Peptídeos quelados-Fe com ácido ascórbico	47,21 ± 0,40
Peptídeos quelados-Fe + mistura saborizante	22,39 ± 0,10

^a tratamentos realizados em duplicata (média e desvio padrão)

Os resultados obtidos da análise de dialisabilidade mostram a ação promotora dos peptídeos hidrolisados com pancreatina, comparados ao controle PIPES. Também foi observado que a presença do ácido ascórbico favoreceu o aumento da dialisabilidade do ferro na presença do hidrolisado contendo os peptídeos quelados ao ferro.

Contudo, as amostras contendo os ingredientes da mistura proposta para o sachê apresentaram resultados inferiores ao tratamento sem a adição da mistura. Os resultados indicam uma possível interação entre os componentes da mistura, impedindo a passagem do ferro pela membrana de diálise e assim diminuindo sua potencial biodisponibilidade.

4 CONCLUSÃO

Os peptídeos quelados ao ferro do sistema pancreatina foram mais efetivos em biodisponibilizar o ferro comparado ao Controle (PIPES), indicando que os ingredientes utilizados na mistura, mesmo com a presença do ácido ascórbico, atuaram negativamente no processo de dialisar o ferro. Novos ingredientes com diferente composição principalmente com relação ao teor de fibra alimentar deverão ser avaliados para esta finalidade.



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ, pela bolsa e ao CCQA – ITAL, pelo estágio concedido.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA, Ano IV nº 09, Junho de 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/300b3b00402000f49d4fdddc5a12ff52/saude_economia9-diagramado25+06+13.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15 de jan. 2015.

ARGYRI, K. *et al.* Milk peptides increase iron dialyzability in water but do not affect DMT-1 expression in caco-2 cells, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57: 1538-1543, 2009.

DE LA HOZ, L. *et al.* Identificación de péptidos de suero lácteo con capacidad quelante de hierro. In: **Ingredientes bioactivos y alimentos funcionales en Iberoamerica**. Madrid. Universidad Autónoma de Madrid. p 25-30, 2013. Disponível em: <https://webmail.csic.es/bigfiles/descarga.php?l=51352567f&t=1369390327&f=LIBRO-IBEROFUN-INGRED_BIOACT_Y ALIM_FUNC_IBEROAMERICA-2013.pdf>, Acesso em: 15 de junho 2015.

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

JORDAO, R. E.; BERNARDI, J. L. D. ;FILHO, A. D. A. B. Prevalência de anemia ferropriva no Brasil: uma revisão sistemática. **Revista paulista de pediatria**, São Paulo, v. 27, n. 1, Mar. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010305822009000100014&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 jun. 2015.

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.

LIMA, A.V.M.S. *et al.* Determinant factors of hemoglobin levels in 12 months old infants in the South of the Zona da Mata of Pernambuco. **Revista de Saúde Materno Infantil**, v. 4, n.1, p. 35-43, 2004.

PACHECO, M. T. B *et al.* Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, p. 333-338, 2005.

POWER, R. Organic mineral absorption: molecular mimicry or modified mobility?. **Recent Advances in Pet Nutrition**. Nottingham University Press. Ed. by Laue, D. K. and L. A. Tucker Nottingham, 2006.

SCHIAVO, D. *et al.* Direct analysis of milk using the Agilent 4100 Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometer (MP-AES). Application note. Disponível em: <http://www.spectroscopyonline.com/spectroscopy/author/authorInfo.jsp?id=57453> . Acesso em: 16 jun. 2015.

SUGIARTO, M.; YE, A.; SINGH, H. Characterisation of binding of iron to sodium caseinate and whey protein isolate. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 1007-1013, 2009.