**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Bioacessibilidade e influência de promotores e inibidores de ferro e zinco na
mistura arroz/feijão**

Larissa Catelli Rocha Torres

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

**Piracicaba
2018**

Larissa Catelli Rocha Torres
Bacharela em Ciências dos Alimentos

**Bioacessibilidade e influência de promotores e inibidores de ferro e zinco na
mistura arroz/feijão**

Orientadora:
Profa. Dra. **SOLANGE GUIDOLIN CANNIATTI BRAZACA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Torres, Larissa Catelli Rocha

Bioacessibilidade de ferro e zinco na mistura: arroz/feijão e influência de promotores / Larissa Catelli Rocha Torres. - - Piracicaba, 2018.

77 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Minerais 2. Caco-2 3. Ácido ascórbico 4. Cisteína 5. Ácido fítico 6. Taninos I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, esposo e filho, pelo amor, apoio e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pelo dom da vida, sempre guiando e iluminando meus passos.

Aos meus pais (meus maiores exemplos), pelo apoio, incentivo, encorajamento e por serem tão presentes em minha vida.

Ao meu esposo, Rafael, pela paciência, apoio e confiança depositados em mim e por ser companheiro em todos os momentos.

Ao meu filho, Lucas, pelos momentos mais leves e descontraídos que eu já tive até o momento, por ser minha fonte de inspiração e fazer com que eu tente ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus irmãos, Tatiana e Marcos, sobrinhos, Mateus e Francisco, sogros Inês e Edson e cunhados Thanite, Fernanda e Fernando, pelo amor, companheirismo e momentos de distração.

À professora Solange Brazaca, pela orientação e ensinamentos sobre a vida acadêmica, além da confiança depositada em mim.

Ao professor de estatística Marcelo Corrêa Alves pelo auxílio na finalização dos dados e pelos conhecimentos prestados na área.

Às minhas velhas amigas que tanto me ajudaram nesse mestrado: Nataly, Gabriela e Mayra.

As velhas e atuais amigas Rachel e Susana. Obrigada pela parceria, sentirei saudades dos nossos almoços.

A turma do laboratório de cultivo celular – Caco-2: Talita, Alexys, José Eduardo e Flávia, pelo excelente trabalho em equipe que desempenhamos e nossa luta para deixar o laboratório impecável. Cada um teve uma parcela importante para o sucesso das análises.

Aos colegas de laboratório: Amanda, Rafael, Larissa e Naiane, pela ajuda e troca de experiências.

A querida e prestativa estagiária Mailys, pelo auxílio e participação com as análises.

As técnicas de laboratório: Adna, Regina e Rose pela ajuda dispensada.

Ao professor Severino Matias de Alencar (LAN-ESALQ/USP) que auxiliou em diversas análises oferecendo sua estrutura e materiais.

Ao professor Ricardo Antunes de Azevedo e a técnica Salete do Departamento de Genética, da ESALQ-USP pelos serviços prestados.

Ao professor Alleoni e a técnica Marina do Departamento de Ciência dos Solos ESALQ-USP, pelos serviços prestados.

Agradeço também à banca examinadora pelas contribuições que enriqueceram este trabalho.

Agradeço à Embrapa Arroz e Feijão pela doação das amostras utilizadas neste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos os meus familiares e amigos que não mencionei acima, mas são tão importantes quanto e todos os funcionários do LAN que ajudaram indiretamente neste trabalho.

Esse mestrado só se tornou possível com a ajuda de todos vocês, gratidão!

EPÍGRAFE

*Se não puder voar, corra.
Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje,
mas continue em frente de qualquer jeito.
Martin Luther King*

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS	13
2. BIOACESSIBILIDADE DE FERRO E ZINCO NA MISTURA ARROZ-FEIJÃO	15
RESUMO	15
ABSTRACT	15
2.1. INTRODUÇÃO	16
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.2.1. Material	19
2.2.1.1. Preparo das amostras	19
2.2.1.1.1. Preparo dos tratamentos	19
2.2.2. Métodos	20
2.2.2.1. Composição centesimal dos alimentos utilizados nos tratamentos.....	20
2.2.2.1.1. Determinação de umidade.....	20
2.2.2.1.2. Determinação de cinzas	20
2.2.2.1.3. Determinação de proteína	21
2.2.2.1.4. Determinação de lipídeos	21
2.2.2.1.5. Determinação de fibras	22
2.2.2.1.6. Determinação de carboidratos	22
2.2.2.2. Determinação do teor de ácido ascórbico em tomate.....	23
2.2.2.3. Determinação de umidade dos tratamentos	23
2.2.2.4. Determinação do teor de Ferro e Zinco	23
2.2.2.5. Bioacessibilidade de ferro e zinco	23
2.2.2.5.1. Cultivo das células Caco-2.....	24
2.2.2.5.2. Digestão <i>in vitro</i>	25
2.2.2.5.3. Fase experimental.....	25
2.2.2.5.4. Coleta das células caco-2.....	28
2.2.2.5.5. Determinação de zinco	28
2.2.2.5.6. Determinação de proteína nas células.....	29
2.2.2.5.7. Determinação de ferritina	29
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
2.4.1. Composição centesimal das amostras	30
2.4.2. Teor de umidade nos tratamentos	32
2.4.3. Teores de ácido ascórbico em tomates	33
2.4.4. Bioacessibilidade de ferro.....	33
2.4.5. Bioacessibilidade de zinco	36
2.5. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	37
3. INTERFERENTES NA BIOACESSIBILIDADE DE FERRO E ZINCO	43
RESUMO	43
ABSTRACT	43

3.1. INTRODUÇÃO.....	44
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.2.1. Material.....	49
3.2.1.1. Preparo das amostras.....	49
3.2.2. Métodos.....	50
3.2.2.1. Determinação de fatores antinutricionais.....	50
3.2.2.1.1. Taninos.....	50
3.2.2.1.2. Ácido fítico.....	51
3.2.2.2. Determinação de promotores.....	51
3.2.2.2.1. Ácido ascórbico.....	51
3.2.2.2.1.1. Extração de ácido ascórbico e dehidroascórbico.....	52
3.2.2.2.1.2. Redução do ácido dehidroascórbico em ascórbico com DL-dithiothreitol (DTT).....	52
3.2.2.2.1.3. Determinação do teor de ácido ascórbico.....	52
3.2.2.2.2. Cisteína.....	53
3.2.2.2.2.1. Extração de aminoácidos.....	53
3.2.2.2.2.2. Derivatização e quantificação de cisteína.....	53
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
3.4.1. Fatores Antinutricionais.....	55
3.4.1.1. Teores de Taninos.....	55
3.4.1.2. Teores de ácido fítico.....	56
3.4.1.3. Relação entre minerais e taninos.....	57
3.4.1.4. Relação entre minerais e ácido fítico.....	58
3.4.2. Promotores.....	60
3.4.2.1. Teor de ácido ascórbico.....	60
3.4.2.2. Teor de cisteína.....	63
3.4.2.3. Relação entre ácido ascórbico e minerais.....	64
3.4.2.4. Relação entre cisteína e minerais.....	65
3.5. CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77

RESUMO

Bioacessibilidade e influência de promotores e inibidores de ferro e zinco na mistura arroz/feijão

Arroz e feijão são alimentos comuns em uma refeição típica brasileira, oferecendo grande variedade de nutrientes. São fontes de minerais, como o ferro e zinco, que são essenciais ao bom funcionamento do organismo. O ferro participa de importantes processos metabólicos de transporte e é componente de muitas proteínas. O zinco, por sua vez, é constituinte essencial para a atividade de muitas enzimas. A deficiência destes minerais pode levar a uma série de doenças e ao impedimento do funcionamento normal do organismo. Sabe-se que o ferro não heme, oriundo dos vegetais, possui menor absorção do que o ferro heme, de origem animal, assim como o zinco vegetal, que acaba sofrendo interferência de inibidores, naturalmente presentes em vegetais. Os inibidores mais comuns em arroz e feijão são os polifenóis, com maior abrangência dos taninos, e o ácido fítico conhecido por seu efeito quelante. Promover estratégias que visem aumentar a absorção de nutrientes são interessantes, visto que eles podem ser reduzidos pelos inibidores. Neste estudo, foram elaborados quatro tratamentos, sendo que todos continham arroz e feijão e variaram entre si quanto à promotores adicionados à esta mistura. Ácido ascórbico e aminoácidos sulfurados, como a cisteína foram os escolhidos para este estudo para verificar a promoção de ferro e zinco. Para simular uma realidade nutricional, como fonte de ácido ascórbico foi escolhido o tomate, e, como fonte de aminoácidos sulfurados foram escolhidos o alho e a cebola. O objetivo foi avaliar a bioacessibilidade do ferro e zinco em arroz e feijão, bem como analisar a influência de promotores e inibidores na absorção destes micronutrientes. A bioacessibilidade foi determinada pela utilização de células caco-2, que é um método validado tanto para ferro como para zinco, e o teor de ferritina e zinco foram usados como indicadores de bioacessibilidade. Como resultado, observou-se que tanto a cisteína como o ácido ascórbico estiveram associados com o aumento na absorção de ferro, porém tal efeito só foi significativo quando permaneceram juntos no mesmo tratamento. Em relação aos inibidores, somente o ácido fítico influenciou a bioacessibilidade de ferro, enquanto que para taninos não foi observada influência. A ação dos promotores e inibidores não teve relação significativa para zinco.

Palavras-chave: Minerais; Caco-2; Ácido ascórbico; Cisteína; Ácido fítico; Taninos

ABSTRACT

Bioaccessibility and influence of iron and zinc promoters and inhibitors in the rice/bean mixture

Rice and beans are common foods in a typical Brazilian meal, offering great variety of nutrients. They are sources of minerals such as iron and zinc, which are essential to the proper functioning of the body. Iron participates in important metabolic processes of transport and is a component of many proteins. Zinc, in turn, is an essential constituent for the activity of many enzymes. The deficiency of these minerals can lead to several diseases and to the impediment of normal functioning of the body. It is known that non-heme iron, derived from vegetables has less absorption than heme iron, of animal origin, as well as plant zinc that ends up suffering interference from inhibitors, naturally present in vegetables. The most common inhibitors in rice and beans are polyphenols, with greater coverage of tannins and phytic acid, known for its chelating effect. Promoting strategies to increase nutrient uptake are interesting, as they can be reduced by inhibitors. In this study, four treatments were elaborated, all of which contained rice and beans and varied among them for the promoters added to this mixture. Ascorbic acid and sulfur amino acids such as cysteine were chosen for this study to verify the promotion of iron and zinc. To simulate a nutritional reality tomato was chosen as a source of ascorbic acid and garlic and onion were chosen as sources of sulfur amino acids. The objective was to evaluate the bioaccessibility of iron and zinc in rice and beans, as well as to analyze the influence of promoters and inhibitors on the absorption of these micronutrients. Bioaccessibility was determined using Caco-2 cells, which is a validated method for both iron and zinc and the content of ferritin and zinc were used as indicators of bioaccessibility. As a result, both cysteine and ascorbic acid were found to be associated with increased iron absorption, but this effect was only significant when they were in the same treatment. In relation to the inhibitors, only phytic acid influenced the bioaccessibility of iron, while for tannins no influence was observed. The action of promoters and inhibitors was not significantly related to zinc.

Keywords: Minerals; Caco-2; Ascorbic acid; Cysteine; Phytic acid; Tannins

1. INTRODUÇÃO GERAL

Arroz e feijão são um exemplo clássico para o sinergismo de qualidade proteica entre cereais e leguminosas, já que os dois contêm aminoácidos essenciais. Uma proporção adequada de cereais e leguminosas em uma mesma refeição pode apresentar valor nutricional, do ponto de vista proteico, equivalente àquele apresentado pelas proteínas de origem animal (COZZOLINO, 2016). Os feijões comuns contêm quantidades significativas de fibra dietética, ácido fítico e polifenóis (ESPINOSA-ALONSO et al., 2006), e são reconhecidos por ser fonte protéica, de 2 a 3 vezes maior que a dos grãos de cereais (SIDDIQ et al., 2010; HAYAT et al., 2014). As proteínas dietéticas existentes no feijão desempenham papel importante na nutrição humana e em complemento com outros alimentos, como os cereais, oferece uma melhor estratégia para combater o problema da má nutrição proteica no mundo (BUTT e BATOOL, 2010; BATISTA et al., 2011). Dentre as leguminosas, o feijão é o que apresenta maior teor de minerais, sendo importante fonte de ferro, zinco, cobre, fósforo e alumínio (SHIMELIS e RAKSHIT, 2005). O nível de ferro é elevado no feijão, com variação de 62,0-150 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (VADIVEL e JANARDHANAN, 2000). Além disso, feijões são boas fontes de ácido fólico, tocoferóis, tiamina, riboflavina, niacina, biotina e piridoxina (HAYAT et al., 2014) e apresentam elevados teores de lisina e carboidratos complexos, mas apresentando deficiência de aminoácidos sulfurados, como metionina e cisteína, ambos essenciais na alimentação (MOURA, CANNIATTI-BRAZACA, 2006). A utilização do feijão está associada a benefícios fisiológicos para a saúde, como prevenção de doenças cardiovasculares e obesidade (HAYAT et al., 2014).

O arroz é a cultura alimentar mais consumida mundialmente (FITZGERALD, MCCOUCH e HALL, 2009; HE et al., 2013), fornecendo 21% da energia e 15% das proteínas diárias necessárias (DEPAR et al., 2011; REHMAN et al., 2012). Apresenta baixo teor de gordura e alto teor de carboidratos, como amido, além de contém alto teor de vitaminas E e B (tiamina e niacina) e mineral, como potássio (MCGLOUGHLIN, 2010; RENUKA et al., 2016).

O arroz é classificado como o cereal que apresenta maior digestibilidade, além de bom valor biológico e elevada eficiência proteica, pois apresenta bons percentuais de aminoácidos sulfurados, como a metionina e a cisteína (MINGUITA et al., 2015). É consumido tanto como arroz integral, ou seja, sem a remoção da camada de aleurona ou como arroz branco polido, que leva esse nome por passar pela etapa adicional de brunição e polimento. Geralmente, arroz polido é mais aceito que o arroz integral, devido às suas propriedades sensoriais (textura e cor) desejáveis e estabilidade durante o armazenamento. Porém, há interesse crescente nos benefícios à saúde ligado ao consumo de arroz integral, devido, em parte, à sua composição fitoquímica como antioxidantes e compostos fenólicos (ZHU et al., 2008). A camada de aleurona rica em nutrientes,

e o gérmen (embrião) são tradicionalmente removidos antes do consumo humano, deixando apenas o endosperma, que possui o amido como parte comestível (BOUIS e WELCH, 2010; WEI et al., 2012). Como resultado, obtém-se um arroz polido pobre em micronutrientes como ferro e zinco (BOUIS e WELCH, 2010; REHMAN et al., 2012).

A ingestão inadequada de ferro e zinco pode acarretar diversos danos à saúde. O ferro está envolvido no transporte de oxigênio e metabolismo energético e a sua carência pode levar a morbidade e mortalidade em crianças bem como atraso no desenvolvimento cognitivo e psicomotor das mesmas (BEARD e STOLTZFUS, 2001; YANG et al., 2007). Já o zinco é um componente essencial para a atividade de mais de trezentas enzimas e estabilizador de estruturas moleculares de constituintes citoplasmáticos. Atua na síntese de proteínas importantes para a produção de neurotransmissores, além de ser importante na síntese dos ácidos nucleicos (SANDSTEAD et al., 1998). A deficiência de zinco provoca atraso no crescimento e maturação dos neurônios, afetando também a atividade eletrofisiológica e de transmissão no cérebro (BLACK, 1998).

Quanto ao ferro, há duas formas predominantes, o ferro heme, presente em produtos de origem animal e o ferro proveniente de vegetais, o não-heme, cuja forma química é mais insolúvel e, conseqüentemente, menos aproveitado pelo organismo, assim como o zinco oriundo de fontes animais é mais disponível do que o de fontes vegetais, já que este pode ser inibido mais facilmente (LA FRANO et al., 2014).

Entre os inibidores presentes no arroz e feijão que podem interferir negativamente na absorção de ferro e zinco, destacam-se os taninos e ácido fítico. Porém, tanto a absorção de ferro quanto de zinco pode ser melhorada pela ligação dos minerais com compostos que formam complexos tornando os mais solúveis. Estes compostos podem ser obtidos pela dieta, tal como é alguns ácidos orgânicos e aminoácidos sulfurados (GROPPER, SMITH e GROFF, 2005), sendo o ácido ascórbico o promotor mais conhecido, entre os ácidos orgânicos.

O feijão, juntamente com o arroz, constitui a base alimentar da maioria dos brasileiros e são de fácil acesso, além de economicamente viáveis. São fonte de nutrientes essenciais, porém o ferro e zinco oriundos de vegetais, têm baixa disponibilidade quando comparados aos de origem animal. Investir em dietas contendo promotores pode ser uma estratégia bem-sucedida para reduzir a incidência de distúrbios relacionados à carência destes elementos minerais no organismo.

Neste estudo adicionamos tomate na forma de salada que contém ácido ascórbico, e alho e cebola, que contêm aminoácidos sulfurados em sua composição, reproduzindo assim uma dieta realista brasileira.

Dentro deste contexto, o objetivo geral deste estudo foi verificar a bioacessibilidade de arroz e feijão com diferentes promotores e analisar a influência de inibidores na absorção de ferro e zinco.

Referências

- BATISTA, K. A.; PRUDENCIO, S. H.; FERNANDES, K. F. Wheat bread enrichment with hard-to-cook bean extruded flour: Nutritional and acceptance evaluation. **Journal of Food Science**, v.76, p.108–113, 2011.
- BEARD, J.; STOLTZFUS, R.J. Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. **Journal Nutrition**, v.131, p.563S–703S, 2001.
- BLACK, M.M. Zinc deficiency and child development. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, p.464S-469S, 1998.
- BOUIS, H.E.; WELCH, R.M. Biofortification– a sustainable agricultural strategy for reducing micronutrient malnutrition in the global South. **Crop Science**, v.50, p.S20–S32, 2010.
- BUTT, M.S.; BATOOL, R. Nutritional and functional properties of some promising legume protein isolates. **Journal of Nutrition**, v.9, p.373–379, 2010.
- DEPAR, N.; RAJPAR, I.; MEMON, M.Y.; IMTIAZ, M.; ZIA-UL-HASSAN. Mineral nutrient densities in some domestic and exotic rice genotypes. **Pakistan Journal of Agriculture Agricultural Engineering Veterinary Science**, v.27, p.134–142, 2011.
- ESPINOSA-ALONSO, L.; LYGIN, A.; WIDHOLM, J.M.; VALVERDE, M.A.; PAREDES-LOPEZ, O. Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4436–44, 2006.
- FITZGERALD, M. A.; MCCOUCH, S. R.; HALL, R. D. Not just a grain of rice: The quest for quality. **Trends in Plant Science**, v.14, p.133-139, 2009.
- GROPPER, S.S.; SMITH, J.L.; GROFF, J.L. **Advanced Nutrition and Human Metabolism**. Thomson Wadsworth, 4ª edição, 2005. 600p.
- HAYAT, I.; AHMAD, A.; MASUD, T.; AHMED, A.; BASHIR, S. Nutritional and Health Perspectives of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An Overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.54, p.580-592, 2014.
- LA FRANO, M.R.; DE MOURA, F.F.; BOY, E.; LÖNNERDAL, B.; BURRI, B.J. Bioavailability of iron, zinc, and provitamin A carotenoids in biofortified staple crops. **Nutrition Review**, v.72, p.289-307, 2014.
- MINGUITA, A. P.S.; CARVALHO, J.L.V.; OLIVEIRA, E.M.M.; GALDEANO, M.C. Produção e caracterização de massas alimentícias a base de alimentos biofortificados: trigo, arroz polido e feijão carioca com casca. **Ciência Rural**, v.45, p.1895-1901, 2015.

- MOURA, N.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Avaliação da disponibilidade de ferro de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em comparação com carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.270-276, 2006.
- REHMAN, H.; AZIZ, T.; FAROOQ M.; WAKEEL, A.; RENGEL, Z. Zinc nutrition in rice production systems: a review. **Plant Soil**, v. 361, p. 203-226, 2012.
- RENUKA, N.; MATHURE, S.V.; ZANAN, R.L.; THENGANE, R.J.; NADAF, A.B. Determination of some minerals and β -carotene contents in aromatic indica rice (*Oryza sativa* L.) germplasm. **Food Chemistry**, v.191, p.2-6, 2016.
- SANDSTEAD, H.H.; PENLAND, J.G.; ALCOCK, N.W.; DAYAL, H.H.; XUE, C.C.; JUI, S.L.; FAJI, Z.; JIA, J.Y. Effects of repletion with zinc and other micronutrients on neuropsychologic performance and growth of Chinese children. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, p.470S–475S, 1998.
- SHIMELIS, E.A.; RAKSHIT, S. K. Proximate composition and physicochemical properties of improved dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Ethiopia. **LWT-Food Science Technology**, v.38, p.331–338, 2005.
- SIDDIQ, M.; RAVI, R.; DOLAN, K. D. Physical and functional characteristics of selected dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour. **LWT-Food Science Technology**, v.43, p.232–237, 2010.
- VADIVEL, V.; JANARDHANAN, K. Nutritional and anti-nutritional composition of velvet bean: An under-utilized food legume in South India. **Food Science and Nutrition**, v.51, p.279–287, 2000.
- WEI, Y.; SHOHAG, M.J.I.; YANG, X.; YIBIN, Z. Effects of foliar iron application on iron concentration in polished rice grain and its bioavailability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.11433-11439, 2012.
- YANG, X.E.; CHEN, W.R.; FENG, Y. Improving human micronutrient nutrition through biofortification in the soil-plant system: China as a case study. **Environmental Geochemistry and Health**, v.29, p.413–428, 2007.
- ZHU, F.; CAI, Y-Z.; SUN, M.; CORKE, H. Effect of phenolic compounds on the pasting and textural properties of wheat starch. **Starch-Starke**, v.11, p.609–616, 2008.

2. BIOACESSIBILIDADE DE FERRO E ZINCO NA MISTURA ARROZ-FEIJÃO

RESUMO

Ferro e zinco são micronutrientes necessários para o bom funcionamento do organismo, sendo que a carência destes elementos minerais pode acarretar em prejuízos à saúde humana. As informações sobre a presença de minerais na dieta normalmente se referem às suas concentrações totais. No entanto, esses valores não reproduzem a fração que pode estar bioacessível para o corpo humano. Nutricionalmente, a bioacessibilidade é definida como a fração ou quantidade do composto de interesse que é liberada da matriz alimentar durante a digestão gastrointestinal e torna-se disponível para ser absorvida pelo intestino. Neste trabalho, a bioacessibilidade foi determinada pelo método *in vitro* de cultura celular caco-2, que simula a digestão gastrointestinal. Foram elaborados quatro tratamentos chamados de T1, T2, T3 e T4 sendo que todos continham arroz e feijão e variaram entre si quanto à promotores adicionados à esta mistura. Ácido ascórbico e cisteína foram os promotores escolhidos para avaliar a influência na absorção de ferro e zinco. Para tanto, como fonte de ácido ascórbico foi escolhido o tomate, e, como fonte de cisteína foram escolhidos o alho e a cebola. T1 apresentava apenas arroz e feijão, T2 além de conter arroz e feijão, possuía tomate, T3 foi formulado com arroz, feijão, alho e cebola e T4 continha arroz, feijão, alho, cebola e tomate. O objetivo foi avaliar se os promotores aumentavam a bioacessibilidade de ferro e zinco do arroz e feijão. O tratamento 4 foi o que proporcionou maior bioacessibilidade significativa para ferro, no entanto não houve diferença significativa entre os tratamentos para o zinco.

Palavras-chave: Caco-2; Minerais; Leguminosas; Cereais; Promotores

ABSTRACT

Iron and zinc are micronutrients necessary for the proper functioning of the body, and the lack of these elements can lead to human health losses. Information on the presence of minerals in the diet usually refers to their total concentrations. However, these values do not reproduce the fraction that may be bioaccessible to the human body. Nutritionally, bioaccessibility is defined as the fraction or amount of the compound of interest that is released from the alimentary matrix during gastrointestinal digestion and becomes available to be absorbed by the intestine. In this work, bioaccessibility was determined by the *in vitro* method of caco-2 cell culture, which simulates gastrointestinal digestion. Four treatments called T1, T2, T3 and T4 were elaborated, all of which contained rice and beans and varied among them as to the promoters added to this mixture. Ascorbic acid and cysteine were the promoters chosen to evaluate the influence on iron and zinc. As a source of ascorbic acid the tomato was chosen, and garlic and onion were chosen as the source of cysteine. T1 presented only rice and beans, T2 besides containing rice and beans, possessed tomato, T3 was formulated with rice, beans, garlic and onion and T4 contained rice, beans, garlic, onion and tomato. The objective was to evaluate if the promoters increased the iron and zinc bioaccessibility of rice and beans. The treatment 4 was the one that

obtained bioaccessibility for iron significant greater, however there was no significant difference between the treatments for the zinc.

Keywords: Caco-2; Minerals; Legumes; Cereals; Promoters

2.1. Introdução

Níveis adequados de minerais são importantes para o bom funcionamento do organismo, visto que desempenham variedade considerável de funções metabólicas. São elementos que devem ser fornecidos ao corpo humano pela alimentação (KHOUZAM, POHL e LOBINSKI, 2011).

Sendo assim, a carência desses micronutrientes pode causar danos à saúde. Cerca de dois milhões de pessoas mundialmente são afetadas por deficiências de vitaminas e minerais, coletivamente conhecidas como fome oculta, que afetam negativamente a saúde e o desenvolvimento econômico (MUTHAYYA et al., 2013). A deficiência de ferro é um dos mais importantes problemas nutricionais no mundo e suas principais vítimas são gestantes, lactentes e crianças em idade pré-escolar. (BEARD e STOLTZFUS, 2001). Já a carência de zinco pode levar ao retardo de crescimento, distúrbios reprodutivos, letargia mental, alterações na pele e nas percepções gustativas (TUERK, FAZEL, 2009).

As informações sobre minerais na dieta normalmente se referem às suas concentrações totais. No entanto, esses valores não reproduzem a fração que pode estar bioacessível para o corpo humano, ou seja, o que está sendo liberado da matriz ficando acessível no trato gastrointestinal. Do ponto de vista nutricional, bioacessibilidade é definida como a fração ou quantidade do composto de interesse que é liberada da matriz alimentar durante a digestão gastrointestinal e torna-se disponível para ser absorvida pelo intestino (JACOB et al., 2012), enquanto que para um nutriente ser considerado biodisponível, ele precisa estar bioacessível no trato gastrointestinal, atuar no metabolismo e agir no tecido alvo (ESPÍN, GARCIA-CONESA, TOMÁS-BARBERÁN, 2008). A fração bioacessível é influenciada pelas formas químicas dos elementos, pelo comportamento das espécies e complexos organometálicos no trato gastrointestinal e pelas interações com a matriz alimentar (KHOUZAM, POHL e LOBINSKI, 2011). O processo de digestão inicia com a mastigação na boca. Diversos fluidos digestivos contendo diferentes enzimas continuam a fragmentar a matriz alimentar no estômago e durante todo o restante do lúmen gastrointestinal. O alimento digerido é predominantemente rompido no intestino delgado por enzimas biliares e pancreáticas, segregadas a partir da mucosa intestinal (GROPPER, SMITH e GROFF, 2005). O processamento de alimentos vegetais pode afetar a bioacessibilidade de alguns nutrientes como carboidratos e lipídeos, principalmente pelas mudanças na estrutura e

propriedades da parede celular da planta, já que elas são fortemente resistentes à degradação no intestino superior, representando uma barreira importante para a liberação de compostos bioativos (BERRY et al., 2008). Normalmente, os estudos de bioacessibilidade são conduzidos *in vitro* e são úteis para avaliar possíveis interações entre os nutrientes e os diversos fatores que podem afetar a digestão e a consequente liberação do nutriente pela matriz (ETCHEVERRY, GRUSAK e FLEIGE, 2012). A digestão com enzimas juntamente com o modelo celular de Caco-2, é um método *in vitro* validado que simula a digestão gastrointestinal e a absorção na matriz alimentar (VAZ-TOSTES et al., 2015). Em 1996, os autores Garcia, Flowers e Cook concluíram em seus estudos que o sistema de células Caco-2 é efetivo para estudar fatores da dieta que influenciam a disponibilidade de ferro nos alimentos. As células Caco-2 pertencem a uma linha celular epitelial derivada de um adenocarcinoma colônico humano (ETCHEVERRY, GRUSAK e FLEIGE, 2012). As células se diferenciam em monocamadas polarizadas com uma membrana de borda em escova que contém as enzimas presentes nos enterócitos epiteliais (GLAHN et al., 1996). Nos EUA, este sistema foi mencionado como uma metodologia promissora para mensurar bioacessibilidade de ferro, em uma conferência patrocinada pelo Escritório Federal de suplementos dietéticos, pelos Institutos Nacionais de Saúde e pela Sociedade Americana de Ciências da Nutrição (WOOD e TAMURA, 2001).

A biodisponibilidade de ferro em alimentos tem uma variação expressiva, um dos fatores envolvido é devido as duas formas químicas em que o ferro se encontra nos alimentos, classificadas de acordo com seu mecanismo de absorção: ferro heme e ferro não-heme. O ferro heme encontra-se na estrutura do anel protoporfirina, ligado à hemoglobina e mioglobina, representando cerca de 40% do ferro do tecido animal. Sua absorção pelo organismo, geralmente, é elevada e pouco influenciada pelos outros fatores da dieta (OTTEN, HELLWIG e MEYERS, 2006). A forma inorgânica (Fe^{3+}) ou, ferro não-heme, é encontrada em hortaliças, cereais e leguminosas e apresenta baixa taxa de absorção pelo organismo. A absorção desse ferro é consideravelmente influenciada pela solubilidade e interação com outros componentes da refeição, que podem promovê-la ou inibi-la (OTTEN, HELLWIG e MEYERS, 2006). O ácido ascórbico atua como promotor, pois potencializa a absorção de ferro, mantendo-o na forma de quelato solúvel no intestino delgado. Interações permitem a troca contínua de elétrons e a consequente mudança do estado de oxidação do ferro de íon férrico, para íon ferroso, podendo então ser captado pelos eritrócitos. O ácido ascórbico também pode influenciar no transporte e no armazenamento de ferro no organismo (COZZOLINO, 2016)

A bioacessibilidade de ferro em células Caco-2 é mensurada através da quantidade de ferritina absorvida pelas células e o método foi desenvolvido por Glahn et al. (1998). A ferritina é

a principal proteína envolvida no armazenamento de ferro. Ela é um indicador satisfatório de reserva do micronutriente no organismo. O ferro chega à ferritina na forma Fe^{2+} e é oxidado a Fe^{3+} dentro da ferritina, onde é armazenado (THEIL, 2003; LIU et al., 2006).

Ao contrário da formação de ferritina, que é um indicador da absorção de ferro, não há biomarcadores satisfatórios de absorção de minerais para zinco. O uso de metalotioneína, uma proteína citoplasmática que armazena o mineral, pode ter algum potencial. Porém, essa proteína pode se ligar e armazenar outros metais como cobre, selênio, cádmio, mercúrio, prata e arsênico (BELL e VALLEE, 2009; ETCHEVERRY, GRUSAK e FLEIGE, 2012). Assim, como não é específica para o zinco, não é confiável utilizá-la como biomarcador para medir a biodisponibilidade desse mineral. Geralmente, a bioacessibilidade de zinco é medida por espectrometria atômica em equipamento de emissão óptica, medindo o teor do elemento na célula de absorção (ETCHEVERRY, GRUSAK e FLEIGE, 2012).

A avaliação da bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos associados à saúde é importante para a compreensão da relação entre alimentos e nutrição (REIN et al., 2012). Desta forma, é essencial obter uma dieta equilibrada que forneça todos os nutrientes que o organismo necessita, porém deve-se considerar que parte do que ingerimos não está acessível. Portanto, investir em estratégias que aumentem a biodisponibilidade desses micronutrientes pode ser uma opção de melhoria. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi adicionar alimentos que contém componentes promotores à mistura clássica de arroz e feijão com o intuito de verificar se há diferença em relação à bioacessibilidade. Os promotores escolhidos foram ácido ascórbico, sendo fonte o tomate, e cisteína, sendo fonte o alho e cebola. Para isso, foi elaborado quatro tratamentos, sendo: T1 – arroz e feijão; T2 – arroz, feijão e tomate; T3 – arroz, feijão, alho e cebola; T4: arroz, feijão, alho, cebola e tomate. Os objetivos específicos do projeto foram:

- Caracterizar os alimentos inseridos nos tratamentos em relação à composição centesimal;
- Determinação do teor de ácido ascórbico em duas variedades de tomate (Carmem e Débora);
- Determinação dos teores de ferro e zinco totais nos tratamentos;
- Avaliar a bioacessibilidade de ferro e zinco nos tratamentos.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Material

Os grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) foram doados pela Embrapa Arroz e Feijão, localizada em Santo Antônio de Goiás, no estado de Goiás e a cultivar escolhida foi a BRS Pontal, comercialmente conhecida como carioca. O arroz branco polido, classe longo fino (*Oryza sativa*), o alho (*Allium sativa*), a cebola (*Allium cepa*) e os tomates variedade Débora e Carmem (*Solanum lycopersicum*) foram adquiridos em supermercado local (Piracicaba, SP).

2.2.1.1. Preparo das amostras

Feijão: As amostras de feijão (150 g) foram deixadas em maceração na proporção 3:1 (água para feijão), em Erlenmeyer de 250 mL por 10 horas em água destilada, trocou-se a água na proporção 2:1 (água: feijão) e os grãos foram cozidos em autoclave a 121°C por 10 min.

Arroz: Os grãos de arroz (150 g) foram cozidos em panela aberta de alumínio com capacidade de 1 L durante 10 min com a seguinte proporção: 1:2 de arroz/água destilada. O cozimento ocorreu na planta piloto do departamento, em fogão doméstico. A proporção de arroz-feijão foi 2:1, pois esta aumenta a biodisponibilidade proteica (COZZOLINO, 2016).

Tomate: O tomate foi utilizado cru, aproveitando todo o seu conteúdo. Foi cortado em cubos com medidas aproximadas de 1cmx1cmx1cm e em seguida foi homogeneizado com auxílio de *mixer*.

Alho e Cebola: Foram descascados e picados finamente medindo, aproximadamente 5mm de largura e comprimento. Em seguida, foram homogeneizados com auxílio de *mixer*.

2.2.1.1.1. Preparo dos tratamentos

O arroz e feijão foram preparados como descrito no item 2.2.1.1

Tomate: O tomate (*Solanum lycopersicum*), variedade Débora, foi utilizado cru, portanto adicionou-se após o tratamento térmico do arroz e feijão. Foram utilizados aproximadamente 230 g de tomate por 100 g da mistura arroz-feijão, após cocção, segundo o proposto por Fantini et al. (2008), e após a adição, a mistura foi homogeneizada com auxílio de *mixer*.

Alho e cebola: O alho (*Allium sativa*) e cebola (*Allium cepa*) foram cortados, conforme descrito item 2.2.1.1 e adicionados ao arroz no momento do cozimento. Foram utilizados 0,5 g de alho e 3 g de cebola para 10 g da mistura arroz-feijão (peso antes da cocção), baseado no estudo de Gautam, Platel e Srinivasan (2010).

Foram propostos quatro tratamentos (Figura 1):

Figura 1. Composição dos tratamentos T1; T2; T3 e T4

Para a realização do preparo dos tratamentos, após a pesagem e adição de todos os componentes, foi utilizado *mixer* para homogeneizar as amostras.

2.2.2. Métodos

2.2.2.1. Composição centesimal dos alimentos utilizados nos tratamentos

A composição centesimal do alho, arroz, cebola, feijão e tomate, utilizados nos diferentes tratamentos foi determinada de acordo com métodos indicados pela Association of Official Analytical Chemists - AOAC (2006), com exceção da determinação de fibras, que foi realizada segundo Asp et al. (1983).

2.2.2.1.1. Determinação de umidade

Foi utilizado método gravimétrico. O método é baseado na evaporação da água presente na amostra, pela ação do calor. Para obter-se a quantidade de água presente, foi pesado 1 g de amostra em uma placa previamente seca e tarada. Esta placa foi colocada em estufa até peso constante a 105 °C. Em seguida, foi pesada a placa com a amostra seca até peso constante e o resultado de umidade foi obtido por diferença (método 934.01, AOAC, 2006).

2.2.2.1.2. Determinação de cinzas

O método utilizado para a determinação de cinzas foi o gravimétrico. Para obter-se a fração de cinzas, a amostra foi calcinada em forno do tipo mufla, para eliminar a matéria orgânica. Foi pesado 1 g de amostra em um cadinho previamente seco e tarado. Este cadinho foi colocado em mufla, onde a temperatura foi aumentada gradativamente até 550 °C e mantida por 4 h até a

destruição total da matéria orgânica. Em seguida, foi pesado o cadinho com as cinzas e o resultado de cinzas foi obtido por diferença (método 923.03, AOAC, 2006).

2.2.2.1.3. Determinação de proteína

Para a determinação do teor de proteínas contida na amostra foi utilizada metodologia de Kjeldahl, sendo caracterizado como micro-Kjeldahl em função da quantidade de amostra que é empregada nas determinações. A determinação do nitrogênio total, proposta por Kjeldahl em 1883, fundamenta-se na decomposição da matéria orgânica dos alimentos pelo ácido sulfúrico, em presença de catalisador, a aproximadamente 350°C. O nitrogênio presente na solução ácida resultante é determinado por destilação por arraste a vapor, seguido de titulação com ácido diluído.

Foi utilizado 100 mg de amostra, adicionou-se solução digestora e as amostras foram deixadas em repouso por 1 noite dentro da capela. No dia seguinte procedeu-se a digestão em bloco digestor, sendo a temperatura elevada lentamente até 350 °C. Durante a digestão, todo o carbono e o hidrogênio contidos na amostra foram oxidados a gás carbônico e água e o nitrogênio da proteína foi reduzido e transformado em sulfato de amônio. A digestão ocorreu até a queima total da amostra sendo visível através da mudança de cor (azul/preto para transparente). Após a etapa da digestão, foi realizada a destilação, em meio básico, através da adição de NaOH 11 M, para a liberação da amônia, que foi recolhida em solução de ácido bórico, formando borato de amônio. Este borato formado foi quantificado por titulação com ácido sulfúrico 0,02 M. Para a quantificação de proteína bruta, multiplica-se o valor do nitrogênio total encontrado com o método Kjeldahl por um fator que converte o nitrogênio em proteína. Esse fator é específico, pois depende da porcentagem de nitrogênio encontrada na composição de cada proteína. Convencionalmente, em amostras de alimentos, a proteína bruta é expressa pelo fator 6,25, considerando que a maioria das proteínas contém nas suas moléculas aproximadamente 16% de nitrogênio, sendo utilizado esse fator para a conversão das amostras, com exceção do arroz, cujo fator de conversão é 5,61 (método 960.52, AOAC, 2006).

2.2.2.1.4. Determinação de lipídeos

O teor de lipídeos foi determinado utilizando o extrator de Soxhlet. Para a extração, foi utilizado 1 g de amostra, colocada em papel filtro e deixada em refluxo contínuo por 4 h, utilizando hexano como solvente, à temperatura de 45 – 50°C. Após recuperação do hexano, os tubos foram retirados e colocados em estufa por 12 h a 105 °C, deixando-os esfriar em dessecador e pesados, obtendo-se a quantidade de lipídeos por diferença do peso do tubo, pesado previamente (método 920.39, AOAC, 2006).

2.2.2.1.5. Determinação de fibras

Para a determinação do teor de fibras nos alimentos, foi utilizado o método enzimico-gravimétrico de acordo com Asp et al. (1983). Foi utilizado 1 g de amostra. Para a digestão das amostras, primeiramente foi adicionada a enzima alfa-amilase termoresistente e a amostra foi levada a um banho-maria a 100 °C, com agitação a cada 5 min, durante 15 min, para hidrolisar as ligações de amido. Após ajuste do pH para 1,5, foi adicionada a enzima pepsina e as amostras permaneceram em banho-maria a 40°C durante uma hora. Em seguida, o pH foi ajustado para 6,8 e adicionou-se pancreatina e as amostras foram levadas ao banho-maria por mais uma hora a 40 °C. Logo após o pH foi acertado para 6,8. Para a determinação da quantidade de fibra insolúvel, as amostras digeridas foram filtradas em cadinhos de placa porosa contendo celite, com auxílio de uma bomba de vácuo seguida da adição de 20 mL de água, 20 mL de álcool 95 % e 20 mL de acetona. A quantidade de fibra retida no cadinho foi levada a estufa a 105 °C por uma noite e pesada no dia seguinte sendo corresponde à quantidade de fibra insolúvel. O líquido que passou pelo cadinho foi recolhido, identificado, adicionado de álcool 95 % e deixado em descanso por 6 h. Após este intervalo, foi também filtrado nas mesmas condições, com auxílio de 20 mL de álcool 78 %, 20 mL de álcool 95 % e 20 mL de acetona. A quantidade de fibra retida no cadinho foi pesada e corresponde à quantidade de fibra solúvel. Foi separado um cadinho para análise de cinzas e outro para determinação de proteína para se ter um resultado mais próximo ao real, ou seja, é feita uma correção da quantidade de cinzas e proteínas que possam não ter sido quebradas na digestão e estejam sendo contabilizadas como parte das fibras.

2.2.2.1.6. Determinação de carboidratos

A quantidade de carboidratos nas amostras foi calculada por diferença, através da equação:

$$\% \text{ carboidratos} = 100 - (\% \text{ cinzas} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ lipídeos} + \% \text{ fibra total})$$

Esse cálculo é baseado no princípio de que o alimento é composto por minerais, proteínas, gordura, fibras e carboidratos e, somando todos estes componentes, o valor deve ser igual a 100 % de matéria seca.

2.2.2.2. Determinação do teor de ácido ascórbico em tomate

Foram analisadas duas variedades de tomate a fim de escolher aquela que ofertasse maior teor de ácido ascórbico. As variedades escolhidas para a determinação foram: Débora e Carmem, que são usualmente utilizadas na preparação de saladas. A determinação de ácido ascórbico foi feita pelo método titulométrico de Tillmans de acordo com Benassi e Antunes (1988). Este método baseia-se na redução do indicador 2,6 Diclorofenol Indofenol (DCFI) pelo ácido ascórbico. O DCFI em meio básico ou neutro é azul, em meio ácido é rosa e sua forma reduzida é incolor. O ponto final da titulação é detectado na viragem da solução incolor para rosa. O resultado é expresso em mg de ácido ascórbico por 100 mL de amostra.

2.2.2.3. Determinação de umidade dos tratamentos

Foi utilizado o mesmo método descrito no item 2.2.2.1.2, no entanto para os tratamentos foram pesados 10 g.

2.2.2.4. Determinação do teor de Ferro e Zinco dos tratamentos

Os elementos minerais foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Miller (1998). Foram pesados 0,2 g de amostra em tubos de digestão e adicionados 5 mL de ácido nítrico. As amostras foram mantidas em capela por uma noite. Em seguida, as amostras foram colocadas no bloco digestor e a temperatura foi ajustada para 50 °C, sendo elevada paulatinamente, até atingir 150 °C. As amostras foram retiradas do bloco digestor para esfriarem e então acrescentou-se 0,5 mL de ácido perclórico. As amostras retornaram ao bloco digestor a 50 °C, sendo a temperatura elevada gradativamente até 200 °C. Depois que as amostras esfriaram, completou-se o volume para 10 mL com água deionizada e as mesmas foram mantidas em repouso durante uma noite. As amostras foram colocadas em frascos para leitura de absorbância em espectrofotômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado Thermo Scientific Icap 6000 Series (ICP-OES) no Laboratório de Análises Ambientais, do departamento de Ciência do Solo pertencente à ESALQ-USP. Os comprimentos de onda utilizados para o ferro e o zinco, foram respectivamente: 259,9 nm e 213,8 nm. A análise foi realizada em triplicata.

2.2.2.5. Bioacessibilidade de ferro e zinco

As células epiteliais de intestino humano da linhagem Caco-2 (ATCC®HTB37™) foram cultivadas no laboratório de cultivo de células Caco-2 do Departamento de Agroindústria,

Alimentos e Nutrição - LAN-ESALQ/USP, seguindo os procedimentos descritos por Glahn et al. (1998) e Garret, Failla e Sarama (1999).

2.2.2.5.1. Cultivo das células Caco-2

Foram utilizadas no experimento células nas passagens 28-31. Primeiramente, foram cultivadas em frascos de cultura T75 para repicagem e em frascos T25 para os experimentos. Adicionou-se aos frascos T75, células Caco-2 na concentração de $1,0-1,7 \times 10^6$ células por mL enquanto que nos frascos T25 foram semeadas na concentração $2,4 \times 10^5$ células por mL. O meio utilizado para cultura foi o DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (D7777; Sigma®). O pH do meio foi ajustado para 7,0 e esterilizado por filtração asséptica realizado em cabine de segurança biológica (CSB nível 2). O meio foi suplementado com 1% de L-glutamina, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina, 0,8% de antimicótico fungizone, 15% de soro fetal bovino inativado por calor (FBS). Ao alcançar o período de pós-confluência, o DMEM suplementado teve a proporção de FBS reduzida para 8-7,5%. Os frascos foram mantidos em incubadora com atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico a 37°C. Realizou-se a troca do DMEM a cada 48 horas.

Utilizou-se o microscópio invertido (Bel Photonics) para acompanhar o crescimento, confluência e pós-confluência das células. As placas apresentaram-se confluentes após aproximadamente 8-9 dias após a semeadura, isto é quando o tecido celular cobriu mais de 90% da placa na qual foi cultivado. As placas T-25 foram utilizadas para a fase experimental entre o dia 14º e 15º pós-confluência, nos quais já apresentavam domas (junções oclusivas entre células adjacentes, Pinto et al., 1983) devido a diferenciação em enterócitos, período ideal para a absorção dos nutrientes (GARRET, FAILLA e SARAMA, 1999). O volume do meio foi 5 mL/T25.

Figura 2. Placa T-25 contendo meio DMEM completo e células caco-2.

2.2.2.5.2. Digestão *in vitro*

A simulação *in vitro* da digestão, incluindo a fase oral, gástrica e intestinal seguiu os procedimentos descritos por Garret, Failla e Sarama (1999) e Glahn, Cheng e Welch (2002) com adaptações. Foram pesados 5 g de cada tratamento em tubo Falcon de 50 mL. Para a etapa oral, adicionou-se uma solução sintética de saliva (6 mL) preparada de acordo com Oomen et al. (2003), composta por 106 unidades/mL de α -amilase (Sigma® A3176) para iniciar a etapa oral. Em seguida, o volume foi completado para 30 mL com a solução basal de sais (SBS) contendo 120 mol/L de NaCl, 6 mmol/L de CaCl₂ e 5 mmol/L KCl e incubados à 37 °C por 10 min com agitação em um equipamento tipo rocker (120 rpm).

A solução SBS foi utilizada para os ajustes de volumes em cada etapa da digestão. Os procedimentos foram realizados evitando a exposição excessiva à luz direta e oxigênio para não ocorrerem degradações dos compostos durante a análise e em cada etapa de incubação, ao longo da digestão os tubos foram cobertos por gás inerte nitrogênio e selados com parafilm®.

Após a incubação, o pH foi ajustado para 2,5 com HCl 1M e adicionou-se 2 mL de solução de pepsina (Sigma® P7000) na concentração de 10000 unidades/mL em HCl 100 mM, posteriormente o volume foi ajustado para 40 mL. Os tubos seguiram para a incubação nas mesmas condições da etapa anterior por 1h. Em seguida, a reação gástrica foi cessada pelo ajuste do pH para 6,0 com NaHCO₃ 1M. Adicionou-se 3mL de solução de extrato de bile (Sigma® B8631) na concentração 40 mg/mL em 100 mM NaHCO₃ e 2 mL de solução de pancreatina (Sigma® P1750) e lipase (Sigma® L3126) nas concentrações de ~4000 unidades/mL em 100 mM NaHCO₃ e ~1000 unidades/mL em 100 mM NaHCO₃, respectivamente, sendo o pH ajustado para 6,5 e o volume ajustado para 50 mL. Incubou-se os tubos à 37 °C por 2h com agitação (120 rpm) para simulação da etapa intestinal (duodenal). Ao término das 2 horas foi retirada uma alíquota de 12 mL e transferida para um novo tubo Falcon de 15 mL que foi centrifugado por 45 min a 4 °C a 1370 x g.

2.2.2.5.3. Fase experimental

Os ensaios foram feitos em triplicata e além dos tratamentos foram feitos o controle negativo (que foi utilizado tanto para ferro como para zinco) e o controle positivo, para ferro (Adicionou-se 0,5 g de sulfato ferroso e 0,5 g de ácido ascórbico). No final do processo da digestão *in vitro*, retirou-se a alíquota de 12 mL dos materiais digeridos que foram submetidos a centrifugação a 1370 x g por 45 min em 4 °C. O sobrenadante (fração solúvel) foi coletado, filtrado por membranas de celulose (Milipore® 0,22µm de poro) e adicionado à cultura de células. A fração solúvel foi diluída na proporção 1:4 em meio de cultura basal DMEM (pH 6,2). Lavaram-se as

culturas celulares com meio basal DMEM e foram adicionados, em seguida, 5 mL da fração solúvel na proporção correta. As placas foram incubadas a 37 °C por duas horas para que o ferro e zinco contidos fossem solubilizados e passassem através da monocamada, chegando até as células Caco-2 e durante este período a integridade do tecido celular foi verificada em microscópio e o crescimento foi registrado por equipamento fotográfico (figuras 3 até 8). Após o período de incubação, um novo meio basal DMEM foi adicionado e os fracos permaneceram incubados por mais 22 h.

Figura 3. Experimento na 1ª troca de meio DMEM completo em frascos de T-25.

Figura 4. Experimento na 2ª troca de meio DMEM completo em frascos de T-25.

Figura 5. Experimento na 4ª troca de meio DMEM completo em frascos de T-25.

Figura 6. Experimento na 6ª troca de meio DMEM completo em frascos de T-25.

Figura 7. Experimento na 7ª troca de meio DMEM completo em frascos de T-25. Nota-se presença de domas.

Figura 8. Experimento na 9ª troca de meio DMEM completo em frascos de T-25. Nota-se presença de domas.

2.2.2.5.4. Coleta das células caco-2

Após as 22 horas de incubação, o meio DMEM foi retirado das placas e foram feitas três lavagens com 3 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,0. Em seguida, as células foram coletadas com auxílio de um raspador. Os tratamentos foram transferidos para tubo Falcon de 15 mL e depois centrifugadas a 4°C por 10 min a 250 x g. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi congelado à -80°C até a realização das determinações de ferritina, proteína e zinco.

2.2.2.5.5. Determinação de zinco

A determinação do zinco foi feita de acordo com Vasiluk, Dutton e Hale (2011). Foi adicionado ao pellet de células, 1 mL de ácido nítrico 2% com 4 mL de água deionizada, o qual permaneceu em repouso por uma noite. Em seguida foi realizada a leitura de absorbância em espectrofotômetro de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado Thermo Scientific Icap 6000 Series (ICP-OES) das amostras e do padrão com concentrações conhecidas de zinco a 0,005; 0,01; 0,03; 0,05 e 0,1 mg.L⁻¹. Os resultados foram expressos em mg de zinco por mg de proteína. A porcentagem de bioacessibilidade de zinco foi calculada baseada na equação de Tokalioglu et al. (2014): Bioacessibilidade (%) = (Fração absorvida de zinco/Teor total de zinco)*100. A análise foi realizada no Laboratório de Análises Ambientais, pertencente ao Departamento de Ciência dos Solos localizado na ESALQ-USP.

2.2.2.5.6. Determinação de proteína nas células

Para determinar o teor de proteína de cada amostra foi utilizado o kit Bio Rad Protein assay reagent (Bio-Rad), que envolve a ligação do Coomassie Brilliant Blue com a proteína (BRADFORD, 1976), conforme microplaca ilustrada na Figura 9. Uma curva padrão de absorbância foi gerada por regressão linear das leituras de absorbância espectrofotométrica para concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA) a 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 mg/mL. A absorbância dos padrões e das amostras foi medida em espectrofotômetro a 595 nm. As concentrações proteicas das amostras foram calculadas através da equação da reta.

Figura 9. Microplaca para análise de proteína nas células.

2.2.2.5.7. Determinação de ferritina

Para a análise de ferritina, os tubos com os pellets de células foram descongelados à temperatura ambiente e adicionou-se 100 μ L de PBS. Os tubos foram agitados em vortex por 1 minuto, deixados em banho de ultrassom por 15 min e novamente agitados por 1 minuto. A análise de ferritina foi realizada com Kit ELISA (Phoenix, EK-310-25). Adicionou-se 20 μ L do padrão, do controle e da amostra nos poços da microplaca, seguida de 100 μ L de enzima conjugada e agitou-se levemente por 30 segundos. A microplaca foi incubada a temperatura ambiente por 45 min, em seguida foi lavada com água deionizada (5 vezes) e adicionada de 100 μ L do reagente TMB (One-Step). Após isso, foram então incubadas em temperatura ambiente e local escuro por 20 min. Para cessar a reação adicionou-se 100 μ L da solução STOP e agitou-se por 30 segundos, sendo então realizada a leitura da reação antígeno anticorpo por UV em leitor de placa.

A concentração de ferritina das amostras foi determinada através da curva padrão de absorbância por regressão linear das leituras de absorbância para concentrações conhecidas de ferritina a 0, 15, 80, 250, 500 e 1000 μ g/mL. A absorbância dos padrões e das amostras foi

determinada utilizando espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram expressos em ng de ferritina/mL. A porcentagem de bioacessibilidade de ferro foi calculada baseada na equação de Tokalioglu et al. (2014): Bioacessibilidade (%) = (Fração absorvida de ferritina/Teor total de ferro)*100.

Figura 10. Microplaca para análise de ferritina.

2.3. Análise estatística

Os resultados das análises de bioacessibilidade e ácido ascórbico foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey, no nível de 5% de significância. Para todas as análises, foi utilizado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS, 1996).

2.4. Resultados e discussão

2.4.1. Composição centesimal das amostras

A Tabela 1 mostra os resultados de composição centesimal das amostras.

Tabela 1. Composição centesimal das matérias-primas em g.100g de matéria seca.

Amostra	Umidade	Cinzas	Proteína	Lípido	Fibra Insolúvel	Fibra Solúvel	Fibra total	Carboidrato
Alho	64,90±0,84	4,17±0,17	19,59±1,22	0,17±0,01	5,67±1,82	7,76±0,47	13,43±2,29	62,47±4,18
Arroz	62,07±0,27	0,06±0,02	6,29±0,17	0,32±0,03	3,31±0,02	1,35±0,32	4,66±0,30	88,67±0,53
Cebola	91,13±0,03	4,76±0,08	8,57±0,83	0,49±0,05	22,10±0,96	20,37±3,71	42,47±2,75	43,34±1,99
Feijão	77,76±0,02	0,80±0,08	19,37±1,25	1,80±0,06	24,67±0,31	7,71±0,17	32,38±0,48	36,23±1,06
Tomate	95,69±0,05	11,35±0,21	18,15±2,36	0,96±0,03	10,23±3,35	34,58±2,62	44,81±0,73	24,73±2,85

* Média (n=3) e desvio-padrão

Em relação à umidade, a cebola e o tomate são os que apresentam maior teor de água em sua composição com valores superiores a 90%.

O maior teor de cinzas foi encontrado no tomate enquanto que o arroz e o feijão obtiveram os menores valores.

O feijão, alho e tomate foram os alimentos que apresentaram maior valor de proteína, sendo bem próximos entre si.

O feijão apresentou o maior valor de lipídeo entre as amostras.

Em relação à digestibilidade no intestino delgado, as fibras não podem ser digeridas pelas enzimas digestivas do organismo humano, a fibra alimentar pode ser dividida em dois grupos: as solúveis e insolúveis, as quais podem ser degradadas ou não no intestino grosso, pela microflora intestinal (ENGLYST, LIU e ENGLYST, 2007). Este tipo de fibra contribui positivamente para a redução do tempo do trânsito intestinal e aumento do volume fecal (CABALLERO, 1988). O feijão e a cebola foram os que obtiveram maior percentual de fibra insolúvel, com teores próximos entre si, e arroz e alho obtiveram os resultados menores.

Fibras solúveis estão associadas à redução dos níveis glicemia pós-prandial e do colesterol pré-prandial (MANN e CUMMINGS, 2009). Os valores mais altos de fibra solúvel foram encontrados na cebola e tomate, enquanto que o arroz apresentou o menor valor.

Em relação ao teor de carboidratos, as amostras com teores mais elevados foram o arroz e alho enquanto que o menor teor foi observado no tomate.

Lovato et al. (2018) realizaram análise de composição centesimal do mesmo feijão (cozido) utilizado neste trabalho (BRS Pontal) e encontraram valores de 1,44 g.100 g para lipídeos, 32,08 g.100 g para proteínas, e 3,86 g.100 g para cinzas. O teor de lipídeo é semelhante ao do estudo, sendo que proteína e cinzas está ligeiramente acima, podendo ter havido diferença entre as épocas de cultivo e colheita.

Brigide, Canniatti-Brazaca e Silva (2014) avaliaram a composição centesimal de feijões biofortificados e os valores encontrados foram: umidade de 76,96 a 81,4, a proteína variou de 22,24 a 33,10 g.100g, os teores de lipídeos variaram de 1,77 a 2,22 enquanto os valores de fibra total foram de 27,08 a 34,78, para cinzas a variação foi de 3,78 a 4,82 e os teores de carboidratos variam de 25,06 a 40,7. Todos os valores são semelhantes aos encontrados neste estudo. Nota-se que o teor de proteína dos feijões biofortificados pode ter variação entre si.

Na Tabela 2 mostram-se os resultados da composição centesimal da Taco (Unicamp, 2011), em base seca.

Tabela 2. Dados da literatura (adaptado de TACO, 2011), em g.100g de matéria seca.

Amostra	Cinzas	Umidade	Fibra Total	Proteína	Lipídeos	Carboidratos
Alho	4,00	67,50	13,23	21,54	0,62	73,54
Arroz	0,32	69,10	5,18	8,09	0,65	90,94
Cebola	3,60	88,90	19,82	15,32	0,90	80,18
Tomate	10,20	95,10	24,49	22,45	4,08	63,27

Em comparação, os resultados da Taco (2011) com os da presente pesquisa, todos os valores de alho e arroz estão semelhantes. Enquanto, os teores de fibra do tomate e cebola estão abaixo do encontrado no estudo, superestimando o resultado de carboidratos, já que o cálculo deste componente foi realizado por diferença. Além do mais, o teor de lipídeos do tomate ficou ligeiramente abaixo do valor da Taco (2011) e o teor de proteína da cebola também. Isto pode ocorrer devido às diferenças da cultivar e condições ambientais, além da época de colheita e condições de cultivo distintas, como armazenamento e estágio de maturação dos frutos (PINHO et al., 2008).

2.4.2. Teor de umidade nos tratamentos

Os valores de umidade dos tratamentos encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Teor de umidade dos tratamentos, em %.

Tratamento*	Média $\pm$ DV
T1	66,84 ^c $\pm$ 0,08
T2	86,39 ^b $\pm$ 0,03
T3	66,78 ^c $\pm$ 0,12
T4	86,84 ^a $\pm$ 0,09

*T1- Arroz, feijão; T2- arroz, feijão, tomate; T3- arroz, feijão, alho e cebola; T4- arroz, feijão, alho, cebola e tomate (n=3)

Os teores de umidade nos tratamentos 2 e 4 foram os mais elevados e isto deve-se a presença de tomate nestas misturas. O tomate apresenta 95 % de água em sua composição conforme descrito na Tabela 1.

2.4.3. Teores de ácido ascórbico em tomates

As variedades Débora e Carmem foram as escolhidas para esta análise pois são as comumente encontradas em supermercados e as utilizadas na forma de salada em refeições.

Na Tabela 4 mostram-se os resultados para o teor de ácido ascórbico encontrado nas duas variedades.

Tabela 4. Teor de ácido ascórbico em duas variedades de tomate (g.100 g de amostra).

Variedade	Teor de ácido ascórbico	
	Média	DV
Carmem	7,97 ^b	0,84
Débora	15,95 ^a	0,73

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa (95% de confiança)

A variedade Débora apresentou o maior conteúdo de ácido ascórbico em relação à variedade Carmem, deste modo optou-se pela variedade Débora para a preparação dos tratamentos 2 e 4.

Esta diferença também foi encontrada no trabalho de Borguini (2002), que comparou essas duas variedades quanto ao cultivo convencional e orgânico, sendo que, em ambos a variedade Débora mostrou maior conteúdo de ácido ascórbico. Na forma convencional, semelhante a este estudo o valor foi 28,9 mg.100g⁻¹ enquanto para a variedade Carmem foi 21,9 mg.100g⁻¹ de amostra.

O valor de ácido ascórbico da variedade Débora está condizente com o observado pelos autores Chiumarelli m e Ferreira (2006), que analisaram o teor de ácido ascórbico em tomate da mesma variedade expostos a diferentes condições de cultivo e os valores variaram de 14,85 a 21,83 mg.100g⁻¹ de amostra.

Perdas de ácido ascórbico podem ocorrer nas diversas etapas que antecedem o consumo e durante o próprio consumo, contribuindo também para a variação na composição do fruto (CHITARRA, 1994). Portanto, variações deste componente em uma mesma variedade podem ser encontradas na literatura.

2.4.4. Biocessibilidade de ferro

Para verificar a viabilidade do experimento foi realizado, um tratamento denominado controle positivo, que era composto de 500 mg de sulfato ferroso + 500 mg ácido ascórbico. O sulfato ferroso é considerado efetivo como controle positivo por induzir a síntese de ferritina (VAZ-TOSTES et al., 2015). O controle positivo normalmente tem elevado teor de ferritina já que não apresenta fatores antinutricionais, que está presente nos alimentos.

Os resultados dos teores de ferro, ferritina e bioacessibilidade relativos aos quatro tratamentos podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados dos teores totais de ferro dos tratamentos (base seca), de ferritina e porcentagem de bioacessibilidade.

Tratamento*	Teor total de Fe (mg/Kg)	Ferritina (ng/mL de proteína)	Bioacessibilidade (%)
T1	28,64±1,20 ^b	0,67±0,21 ^B	2,35±0,62 ^A
T2	37,95±2,75 ^a	0,46±0,12 ^B	1,21±0,28 ^A
T3	28,43±1,45 ^b	0,39±0,09 ^B	1,36±0,36 ^A
T4	37,75±1,72 ^a	1,17±0,31 ^A	3,09±0,84 ^B
Controle (-)		0,64±0,11 ^B	-
Controle (+)		133,36±15,61	-

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa (95% de confiança);

*T1- Arroz, feijão; T2- arroz, feijão, tomate; T3- arroz, feijão, alho e cebola; T4- arroz, feijão, alho, cebola e tomate

Em relação aos teores totais de ferro, os tratamentos que continham arroz e feijão (1) e o que continha arroz, feijão, alho e cebola (3) diferiram estatisticamente dos tratamentos 2 e 4. Esse resultado era esperado já que esses tratamentos apresentavam tomate na mistura, sugerindo que o ácido ascórbico proveniente deste fruto ocasionou este aumento do teor de ferro. Esse aumento no teor de ferro provocado pelo ácido ascórbico foi encontrado também no estudo de Tentes et al. (2005), que propuseram seis tipos de dietas com adição de vários níveis de vitamina C, sendo três delas com níveis baixos (de 26 a 34 mg) e três com níveis altos (115 a 123 mg). Observou-se um aumento no teor de ferro naquelas refeições que receberam doses mais elevadas de vitamina C. No entanto, em outro estudo não foi encontrado teores mais elevados nos níveis totais de ferro quando adicionados de vitamina C, porém na fração absorvida houve aumento de 1,5 % em bebidas à base de aveia fortificadas com vitamina C (TRINIDAD et al., 2013).

Apesar do tratamento 2, ao lado do tratamento 4, ter apresentado teores superiores de ferro em relação ao tratamento 1 e 3, sua bioacessibilidade não diferiu significativamente entre esses tratamentos, tendo apenas o tratamento 4 diferido significativamente. Ele apresentou concentração de ferritina e consequentemente taxa de bioacessibilidade mais elevada, supondo que a combinação de promotores, neste caso o ácido ascórbico e a cisteína, são promissores para elevar a absorção de ferro. Diferente do estudo de He et al. (2013), que conseguiu aumentar a bioacessibilidade com apenas um promotor. O trabalho analisou onze genótipos de arroz polido na forma cozida em relação à bioacessibilidade de ferro comparando as amostras com e sem a presença de ácido ascórbico. O estudo utilizou o modelo de células caco-2 e as amostras que receberam ácido ascórbico apresentaram maior índice de bioacessibilidade indicando que a vitamina C promoveu a absorção de ferro. Apenas dois genótipos não tiveram resultados significativos quanto à bioacessibilidade na presença de ácido ascórbico (HE et al., 2013).

Outro estudo que também utilizou um tipo de promotor e surtiu efeito, foi o de Yun et al. (2004), em que diferentes doses de vitamina C foram adicionadas a refeições semissintéticas e a quantidade de ferritina absorvida pelas células caco-2 aumentou, confirmando que o ácido ascórbico atuou como facilitador de ferritina. As doses de vitamina C foram: 0; 25; 50; 100; 250 e 500 mg e a quantidade de ferritina foi: 16,3; 54; 74,3; 104; 226,6 e 283,9 ng de ferritina/mg de proteína, respectivamente.

Figura 11. Teor total de ferro, ferritina e % de bioacessibilidade nos quatro tratamentos.

O tratamento 3 recebeu alho e cebola por estes alimentos conterem a cisteína, um aminoácido sulfurado capaz de promover a biodisponibilidade de alguns minerais. No entanto este tratamento não teve diferença significativa em relação ao tratamento 1 para teor de ferro, que continha arroz e feijão apenas, resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Fantini et al. (2008), em que foram feitas combinações de alimentos que promovessem o aumento de ferro utilizando tomate e arroz como fonte de ácido ascórbico e cisteína, respectivamente. O teor de ferro encontrado no tratamento que continha apenas feijão (17,11 mg/Kg) não teve diferença significativa daquele que continha o arroz como fonte de cisteína (17,45 mg/Kg).

Fantini et al. (2008), encontraram maior teor de ferro dializável na mistura que continham tomate e arroz juntamente com feijão, ou seja, os dois promotores no mesmo tratamento, não tendo sido observado aumento de ferro na combinação que continha apenas a cisteína como facilitador, estando de acordo com os resultados deste trabalho.

2.4.5. Bioacessibilidade de zinco

Os tratamentos 1 (arroz, feijão), 2 (arroz, feijão e tomate) e 3 (arroz, feijão, alho e cebola) não diferiram entre si quanto ao teor total de zinco, enquanto que o tratamento 4 (arroz, feijão, alho, cebola e tomate) diferiu dos demais sendo a mistura que contém o menor teor do elemento. Vários fatores podem atuar na inibição do zinco, como o ferro, porém somente quando a razão molar seja maior que 25:1 (SANDSTRÖM et al., 1985), o que não se aplica a este estudo. Fitato e ácidos nucléicos (todos os compostos contendo fósforo) diminuem a absorção de zinco e o cálcio pode afetar negativamente também, quando na presença de fitato (DAVIES e OLPIN, 1979), porém acredita-se que o tratamento 4 (arroz, feijão, alho, cebola e tomate) tenha apresentado o menor teor de zinco por ser o que contém a menor quantidade de arroz e feijão, que são as principais fontes de zinco na mistura.

Na Tabela 6 pode se verificar os teores totais de zinco, o teor que foi absorvido pelas células e a bioacessibilidade relativa.

Tabela 6. Teor total, zinco bioacessível e bioacessibilidade de zinco nos tratamentos

Tratamento*	Teor total (mg/Kg)	mg de zn/mg de proteína	Bioacessibilidade (%)
T1	21,48±0,62 ^a	1,10±0,06 ^A	5,15±0,46 ^A
T2	23,68±0,48 ^a	0,97±0,16 ^A	4,07±0,61 ^A
T3	21,65±1,21 ^a	1,05±0,06 ^A	4,87±0,14 ^A
T4	18,39±1,33 ^b	0,99±0,17 ^A	5,4±0,85 ^A
Controle (-)		1,15±0,06 ^A	-

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa (95% de confiança)

*T1- Arroz, feijão; T2- arroz, feijão, tomate; T3- arroz, feijão, alho e cebola; T4- arroz, feijão, alho, cebola e tomate

Embora para teor de zinco, o tratamento 4 (arroz, feijão, alho, cebola, tomate) tenha apresentado menor valor, não houve diferença significativa para a concentração de zinco absorvido pelas células, entre os tratamentos. Além disto, o tratamento 4 apresentou a maior taxa de bioacessibilidade, sugerindo que o teor total de zinco não influencia na quantidade absorvida, mas os componentes presentes na dieta, sim. O tratamento que apresentou a menor concentração de zinco (zinco bioacessível) nas células foi também o que apresentou a menor taxa de bioacessibilidade, correspondendo ao tratamento 2, que continha apenas um promotor. Os tratamentos 1 e 3 mostraram-se semelhantes quanto ao teor total, concentração de zinco absorvida e taxa de bioacessibilidade, sugerindo que a quantidade de alho e cebola não foi suficiente para aumentar nem o teor total e nem a bioacessibilidade deste elemento, apesar de haver uma crescente evidência que dietas contendo aminoácidos sulfurados podem aumentar a absorção de zinco e o alho e a cebola são conhecidos por conterem esses aminoácidos, em particular, a cisteína. Neste estudo não comprovamos essa promoção, porém Gautam, Platel e Srinivasan (2010) obtiveram

resultados positivos para o aumento de bioacessibilidade não só de zinco como também em ferro. Os autores testaram duas quantidades de alho (0,25 e 0,5 g) e de cebola (1,5 e 3 g) em diferentes cereais, incluindo o arroz. Observaram aumento na bioacessibilidade decorrente da adição de ambas as quantidades, porém foi constatado que o nível mais alto, que era o dobro do mais baixo, não provocou aumento proporcional, isto tanto para o ferro como para o zinco. Eles sugerem que isso pode ocorrer devido ao efeito positivo ser alcançado, ou seja, aproximou-se da saturação na dose mais baixa.

Figura 12. Teor de zinco, zinco bioacessível e % de bioacessibilidade nos quatro tratamentos.

Um estudo já publicado, avaliou os possíveis interferentes na absorção de zinco, como fitato, polifenóis e ácido ascórbico e verificou que o ácido ascórbico não influenciou a absorção de zinco como foi verificado neste trabalho. Além disto, o estudo avaliou as características de absorção de zinco pelas células, como cinética, ligação interpolares e concluiu que é um método confiável para avaliar a bioacessibilidade de zinco comparado com ratos e humanos (SREENIVASULU et al., 2008). Existem alguns trabalhos comparando arroz polido e integral (JOU et al., 2012) e o método de células caco-2 com animais e humanos (KRUGER et al., 2013; TAKO et al., 2009).

2.5. Conclusão

O ácido ascórbico e a cisteína quando administrados juntos são mais eficazes na absorção dos minerais, pois o tratamento que continha arroz, feijão, alho, cebola e tomate obteve o melhor resultado entre os demais tanto para ferro quanto para zinco, mesmo sendo o tratamento que, inicialmente, continha o menor teor deste último elemento. Por isso a importância de avaliar os componentes de uma dieta consumida pela população brasileira.

Referências

- ACCIOLY, E.; LACERDA, E.M.A.; ENGSTROM, E.M. Aspectos fisiopatológicos e epidemiológicos da deficiência de Ferro. In: RAMALHO, A. **Fome Oculta: diagnóstico, tratamento e prevenção**. Editora Atheneu, capítulo 2.2, 2009. 3343p.
- ASP, N. G.; JOHANSSON, C.G.; HALLMER, H.; SILJESTROEM, M. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.31, p.476-482, 1983.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS-AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Edição 16, v.2, 2006.
- BEARD, J.; STOLTZFUS, R.J. Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. **Journal Nutrition**, v.131, p.563S–703S, 2001.
- BELL, S. G.; VALLEE, B. L. The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. **ChemBioChem**, v.10, p.55–62, 2009.
- BENASSI, M.T.; ANTUNES, A.J.; A comparison of meta-phosphoric and oxalic acids as extracts solutions for the determination of vitamin C in vegetables. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.31, p.507-513, 1988.
- BERRY, S.E.; TYDEMAN, E.A.; LEWIS, H.B.; PHALORA R.; ROSBOROUGH, J.; PICOUT, D.R.; ELLIS, P.R. Manipulation of lipid bioaccessibility of almond seeds influences postprandial lipemia in healthy human subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.88, p.922–9, 2008.
- BORGUINI, R. G. **Tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) orgânico: o conteúdo nutricional e a opinião do consumidor**. 2002, 110p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitaion of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRIGIDE, P.; CANNIATTI-BRAZACA. S.G.; SILVA, M.O. Nutritional characteristics of biofortified common beans. **Food Science and Technology**, v.34, p.493-500, 2014.
- CABALLERO, B. Interacciones entre los componentes de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.38, p.656-684, 1988.
- CARBONELL-CAPELA, J. M.; BUNIEWSKA, M.; BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive

- compounds from fruits and vegetables: a review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v.13, p.155-171, 2014.
- CARPENTER, C.E.; MAHONEY, A.W. Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.31, p.333-367, 1992.
- CHITARRA, M.I.F. Colheita e qualidade pós-colheita de frutos. **Informe Agropecuário**, v.179, p.8-18, 1994.
- CHIUMARELLI, M.; FERREIRA, M.D. Qualidade pós-colheita de tomates 'Débora' com utilização de diferentes coberturas comestíveis e temperaturas de armazenamento. **Horticultura Brasileira**, v.24, p.381-385, 2006.
- COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Editora Manole, 5ª edição, revisada e atualizada. 2016. 878p.
- DAVIES, N. T.; OLPIN, S. E. Studies on the phytate:zinc molar contents in diets as a determinant of Zn availability to young rats. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.41, p.590-603, 1979.
- ENGLYST, K.N.; LIU, S.; ENGLYST, H.N. Nutritional characterization and measurement of dietary carbohydrates. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.61, p.19-39, 2007.
- ESPÍN, J.C.; GARCIA-CONESA, M.T.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Nutraceuticals: facts and fiction. **Phytochemistry**, v.68, p.2986-300, 2007.
- ETCHEVERRY, P.; GRUSAK, M. A.; FLEIGE, L. E. Application of *in vitro* bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. **Frontiers in Physiology**, v. 3:317, p. 1-22, 2012.
- FANTINI, A.P.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; SOUZA, M.C.; MANSI, D.N. Disponibilidade de ferro em misturas de alimentos com adição de alimentos com alto teor de vitamina C e de cisteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.435-439, 2008.
- GARCIA, M.N.; FLOWERS, C.; COOK, J.D. The Caco-2 cell culture system can be used as a model to study food iron availability. **The Journal of Nutrition**, v.126, p.251-258, 1996.
- GARRETT, D.A.; FAILLA, M.L.; SARAMA, R.J. Development of an *in vitro* digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.4301-9, 1999.
- GAUTAM, S.; PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Higher Bioaccessibility of Iron and Zinc from Food Grains in the Presence of Garlic and Onion. **Food Chemistry**, v.58, p.8426-8429, 2010.
- 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. **Journal of Nutrition**, v.126, p.332-339, 1996.

- GLAHN, R.P.; LEE, O.A.; YEUNG, A.; GOLDMAN, M.I.; MILLER, D.D. Caco-2 cell ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. **Journal of Nutrition**, v.128, p.1555-61, 1998.
- GLAHN, R.P.; CHENG, Z.Q.; WELCH, R.M. Comparison of iron bioavailability from 15 rice genotypes: studies using an *in vitro* digestion/ Caco-2 cell culture model. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.3586–3591, 2002.
- GROPPER, S.S.; SMITH, J.L.; GROFF, J.L. **Advanced Nutrition and Human Metabolism**. Thomson Wadsworth, 4ª Edição, 2005. 600p.
- HE, W.; SHOHAG, M.J.I.; WEI, Y.; FENG, Y.; YANG, X. Iron concentration, bioavailability, and nutritional quality of polished rice affected by different forms of foliar iron fertilizer. **Food Chemistry**, v.141, p.4122-4126, 2013
- JACOB, J. K.; TIWARI, K.; CORREA-BETANZO, J.; MISRAN, A.; CHANDRASEKARAN, R.; PALIYATH, G. Biochemical basis for functional ingredient design from fruits. Annual Review, **Food Science Technology**, v.3, p.79-104, 2012.
- JOU, M.Y.; DU, X.; HOTZ, C.; LONNERDAL, B. Biofortification of Rice with Zinc: Assessment of the Relative Bioavailability of Zinc in a Caco-2 Cell Model and Suckling Rat Pups. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.60, p.3650-3657, 2012.
- KHOUZAM, R.B.; POHL, P.; LOBINSKI, R. Bioaccessibility of essential elements from white cheese, bread, fruit and vegetables. **Talanta**, v.86, p.425 –428, 2011.
- LIU, X.; HINTZE, K.; LONNERDAL, B.; THEIL, E.C. Iron at the center of ferritin, metal/oxygen homeostasis and novel dietary strategies. **Biological Research**, v.39, p.167-71, 2006.
- LOVATO, F.; KOWALESKI, J.; SILVA, S.Z.; HELDT, L.F.S. Composição centesimal e conteúdo mineral de diferentes cultivares de feijão biorfortificado (*Phaseolus vulgaris* L.), **Brazilian Journal Food Technology**, v. 21, e2017068, 2018.
- MANN, J.I.; CUMMINGS, J.H. Possible implications for health of the different definitions of dietary fibre. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.19, p.226-9, 2009.
- MILLER, R.O. **Nitric-perchloric acid wet digestion in an open vessel**. Em: Editora Kalra YP, Handbook of Reference Methods for Plant Analysis, pp.57-61. CRC Press, 1998.
- MUTHAYYA, S.; RAH, J.H.; SUGIMOTO, J.D.; ROOS, F.F.; KRAEMER, K.; BLACK, R.E. The global hidden hunger indices and maps: An advocacy tool for action. **Plos One**, v.8, e67860, 2013.
- OOMEN, A.G.; ROMPELBERG, C.J.; BRUIL, M.A.; DOBBE, C.J.; PEREBOOM, D.P.; SIPS, A.J. Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil

- contaminants. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.44, p.281-287, 2003.
- OTTEN, J.J.; HELLWIG, J.P.; MEYERS, L.D. Dietary Reference Intakes (DRI) – **The essential guide to nutrient requirements**. Institute of Medicine of the National Academies. The National Academies Press, 2006. 330p.
- PINHO LP; PAES MCD; ALMEIDA AC; COSTA CA; GLORIA MBA; RODRIGUES RJA; GUILHERME DO; MARTINS IS. Composição centesimal e análise físico-química do tomate cereja cultivado em sistema orgânico e convencional. **Horticultura Brasileira**, v.26, p.S177-S182, 2008.
- PINTO, M.; RABINE-LEON, S.; APPAY, M.D.; KEDINGER, M.; TRIADOU, N.; DUSSAULX, E.; LOUROIX, B.; SIMON-ASSMANN, P.; HAFEB, K. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Biology of the Cell**, v. 47, p. 323-330, 1983.
- REBELLATO, A. P.; PACHECO, B.C.; PRADO, J.P.; PALLONE-LIMA, J.A. Iron in fortified biscuits: A simple method for its quantification, bioaccessibility study and physicochemical quality. **Food Research International**, v. 77, p.385-391, 2015.
- REIN, M. J.; RENOUF, M.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; ACTIS-GORETTA, L.; THAKKAR, S.K.; PINTO, M.S. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, p.588-602, 2012.
- SANDSTRÖM, B.; DAVIDSSON, L.; CEDERBLAD, A.; LÖNNERDAL, B. Oral iron, dietary ligands and zinc absorption. **Journal of Nutrition**, v.115, p.411–414, 1985.
- SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT Guide for personal computers**. Editora Cary, SAS Institute, 6ª edição, 1996. 1028p.
- SREENIVASULU, K.; RAGHU, P.; RAVINDER, P.; NAIR, K.M. Effect of Dietary Ligands and Food Matrices on Zinc Uptake in Caco-2 Cells: Implications in Assessing Zinc Bioavailability. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.56, p.10967-10972, 2008.
- TETENS, I.; LARSEN, T.M.; KRISTENSEN, M.B.; HELS, O.; JENSEN, M.; MORBERG, C.M.; THOMSEN, A.D.; HOJGAARD, L.; HENRIKSEN, M. The importance of dietary composition for efficacy of iron absorption measured in a whole diet that includes rye bread fortified with ferrous fumarate: a radioisotope study in young women. **British Journal of Nutrition**, v. 94, p.720–726, 2005.
- THEIL, E.C. Ferritin: at the crossroads of iron and oxygen metabolism. **Journal of Nutrition**, v.133, p.1549S-53S, 2003.

- TOKALIOGLU, S.; CLOUGH, R.; FOULKES, M.; WORSFOLD, P. Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from nutritional supplements by the unified BARGE method. **Food Chemistry**, v.150, p.321–327, 2014.
- TRINIDAD, T. P.; KURILICH, A.C.; MALLILLIN, A.C.; WALCZYK, T.; SAGUM, R.S.; SINGH, N.N.; HARJANI, Y.; DE LEON, M.P.; CAPANZANA, M.V.; FLETCHER, J. Iron absorption from NaFeEDTA-fortified oat beverages with or without added vitamin. **Food Sciences and Nutrition**, v.65, p.124–128, 2013.
- TUERK, M.J., FAZEL, N. Zinc deficiency. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.25, p.136–143, 2009.
- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Tabela de Composição Química de Alimentos. Disponível em: <http://www.intranet.fcf.usp.br/Tabela/> Acesso em: 20 de fevereiro de 2018
- VASILUK, L.; DUTTON, M.D.; HALE, B. *In vitro* estimates of bioaccessible nickel in field-contaminated soils, and comparison with in vivo measurement of bioavailability and identification of mineralogy. **Science of the Total Environment**, v.409, p.2700–2706, 2011.
- VAZ-TOSTES, M.G.; VEREDIANO, T.A.; MEJIAC, E.G.; COSTA, N.M.B. Evaluation of iron and zinc bioavailability of beans targeted for biofortification using *in vitro* and in vivo models and their effect on the nutritional status of preschool children. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.96, p.1326–1332, 2015.
- WILLIAMS, S.R. Fundamentos de nutrição e dietoterapia. Artes Médicas, 6ª edição, 1997.
- WOOD, R.J.; TAMURA, T. Methodological issues in assessing bioavailability of nutrients and other bioactive substances in dietary supplements: summary of workshop discussion. **Journal of Nutrition**, v.131, p.1396S–1398S, 2001.
- YUN, S.; HABICHT, J.P.; MILLER, D.D.; GLAHN, R.P. An *in vitro* digestion/ Caco-2 cell culture system accurately predicts the effects of ascorbic acid and polyphenolic compounds on iron bioavailability in humans. **Journal of Nutrition**, v.134, p.2717–2721, 2004.

3. INTERFERENTES NA BIOACESSIBILIDADE DE FERRO E ZINCO

RESUMO

A bioacessibilidade de ferro e zinco pode ser influenciada por fatores da dieta como promotores e inibidores. Os promotores mais conhecidos de ferro e zinco são o ácido ascórbico e aminoácidos sulfurados, como a cisteína. Neste estudo objetivou-se reproduzir uma refeição típica brasileira adicionando componentes que pudessem elevar a bioacessibilidade de ferro e zinco. Portanto, foram adicionados ao arroz e feijão, tomate, alho e cebola, que possuem em sua composição ácido ascórbico e cisteína, respectivamente. O teor de promotores foi mensurado nos tratamentos e seu conteúdo relacionado com a bioacessibilidade de ferro e zinco. Os inibidores naturalmente presentes nos alimentos: taninos e ácido fítico, também foram mensurados e relacionados com os quatro tratamentos elaborados chamados de T1, T2, T3 e T4. O primeiro, T1, apresentava apenas arroz e feijão, T2 além de conter arroz e feijão, possuía tomate, T3 foi formulado com arroz, feijão, alho e cebola e T4 continha arroz, feijão, alho, cebola e tomate. O ácido ascórbico e a cisteína mostraram-se efetivos no aumento de ferro quando presentes no mesmo tratamento, porém tal promoção não foi vista para o zinco. Quanto aos inibidores, somente o ácido fítico teve associação com o ferro, enquanto que, para zinco não foi notada relação com nenhum dos dois inibidores.

Palavras-chave: Promotores; Inibidores; Minerais; Ácido ascórbico; Cisteína; Arroz; Feijão

ABSTRACT

The bioaccessibility of iron and zinc can be influenced by dietary factors as promoters and inhibitors. The best known promoters of iron and zinc are ascorbic acid and sulfur amino acids, such as cysteine. The objective of this study was to reproduce a typical Brazilian meal by adding components that could increase the bioaccessibility of iron and zinc. Therefore, tomato, garlic and onion, which have in their composition ascorbic acid and cysteine, respectively, were added to rice and beans. The content of promoters was measured in the treatments and their content were related to the bioaccessibility of iron and zinc. Inhibitors naturally present in foods: tannins and phytic acid were also measured and related to the four elaborated treatments called T1, T2, T3 and T4. The first, T1, presented only rice and beans, T2 besides containing rice and beans, possessed tomato, T3 was formulated with rice, beans, garlic and onion and T4 contained rice, beans, garlic, onion and tomato. Ascorbic acid and cysteine showed were effective in increasing iron when present in the same treatment, but such promotion was not seen for zinc. As for inhibitors, only phytic acid was associated with iron, while for zinc no relationship was noted with either of the two inhibitors.

Keywords: Promoters; Inhibitors; Minerals; Ascorbic acid; Cysteine; Rice; Beans

3.1. Introdução

Os teores totais de minerais não podem ser analisados isoladamente para determinar a bioacessibilidade e biodisponibilidade, pois elas podem ser influenciadas por diferentes componentes da dieta. Os fatores dietéticos que inibem a biodisponibilidade dos elementos traços agem na solubilidade desses elementos, diminuindo sua absorção por não transferirem o elemento mineral para os receptores da mucosa intestinal (CLYDESDALE et al., 1991).

Entre os inibidores encontrados em leguminosas destacam-se os compostos fenólicos e o ácido fítico, sendo que este último é observado também em cereais.

Os compostos fenólicos são encontrados em plantas como metabólitos secundários, raramente ativos e são conhecidos pela sua propriedade antioxidante, com papel relevante na diminuição e prevenção de doenças cardiovasculares, degenerativas, câncer e diabetes (LUJÁN et al., 2008; MOURA et al., 2005).

Os taninos destacam-se como os mais importantes compostos fenólicos presente no feijão e estão majoritariamente presentes na casca e em pequenas quantidades nos cotilédones. Eles podem ser classificados como hidrolizáveis ou condensados. Os hidrolizáveis são encontrados somente em quantidades traço, já os condensados estão presentes, geralmente, em plantas dicotiledôneas e em produtos alimentares (DELFINO e CANNIATTI, 2010; RAMÍREZ-CARDENAS, 2008).

Os taninos são flavonóides poliméricos e pertencem à subclasse flavanol (DÍAZ, CALDAS e BLAIR, 2010), sendo difícil estimar seu conteúdo em alimentos, pois podem se apresentar em diversas formas e pesos moleculares. No entanto, dímeros e trímeros são abundantemente encontrados como catequinas, facilitando sua detecção (MANACH et al., 2004).

Taninos, muitas vezes, podem agir como antinutriente ao reduzirem a utilização de proteínas, carboidratos e minerais pelo organismo (LAJOLO e GENOVESE, 2002). Existem estudos na literatura que comprovam que os taninos são inibidores de ferro. No trabalho de Glahn et al. (2002), com células caco-2, foi constatado que o tanino teve maior ação inibitória sobre o ferro em comparação com o ácido fítico e o cloreto de zinco. O ácido tânico produziu inibição máxima (92%) da absorção de ferro na proporção de 1:0,1, a menor proporção estudada.

Quando o feijão é submetido à cocção (97 °C, 35 min) ocorre redução de até 30% do teor de taninos e, quando os grãos são macerados por duas horas, antes da cocção (97 °C, 35 min), há redução de até 70% (SHIMELIS e RAKSHIT, 2007; RAMÍREZ-CÁRDENAS et al., 2008), devido aos taninos migrarem para a água de maceração e para o caldo de cocção durante o tratamento (MKANDA, MINNAAR e KOCK, 2007).

Outro composto antinutricional ligado à absorção de ferro e zinco é o ácido fítico, presente nas leguminosas, tais como feijão, ervilha, lentilha, em algumas nozes, e também nos cereais, como o trigo e o arroz. O ácido fítico também apresenta outros nomes como, fitato, hexafosfato de inositol (IP6), mio-inositol e fosfato de inositol. A degradação de IP6 envolve etapas subsequentes de desfosforilação levando a diferentes produtos de hidrólise, tais como as formas penta (IP5), tetra (IP4), tri (IP3), di (IP2) ou mesmo mono (IP1) (SKOGLUND, CARLSSON e SANDBERG et al., 1997). As formas hexa (IP6) e penta (IP5) dos fosfatos de inositol (IPs) são responsáveis por mais de 90% do conteúdo total de fitatos em grãos crus (AGTE, TARWADI e CHIPLONKAR, 1999). O ácido fítico e os diversos fitatos estão entre os fatores antinutricionais mais importantes da dieta no que tange aos alimentos de origem vegetal, limitando a bioacessibilidade e a biodisponibilidade mineral. As concentrações de fitatos nos alimentos de origem vegetal variam de 1 a 3% (em massa) em cereais e leguminosas, e chegam a até 1% (também em massa) em raízes, tubérculos e hortaliças (SANDBERG, 2002).

Nas células vegetais, o ácido fítico serve como armazenamento de fósforo e também atua em outras funções, como transdução de sinais intra e intercelulares, exportação de RNA, reparação de DNA e recombinação de DNA (RABOY, 2003).

O ácido fítico é apresenta característica antinutricional devido à interação de seu grupos fosfato com amido, minerais e proteínas, ocasionando alteração na solubilidade, funcionalidade, digestibilidade e absorção destes nutrientes (TOGNON, 2012). Alguns estudos averiguaram que uma concentração alta desse composto pode afetar a biodisponibilidade dos minerais, como zinco, cálcio, ferro e magnésio (HELBIG et al., 2008). Brune et al. (1992) mostraram que os fitatos presentes em vários tipos de alimentos inibem a absorção de Fe^{+3} (não-heme) pelo organismo humano durante a digestão. No trabalho de Luo et al. (2010) estimou-se a bioacessibilidade de ferro e zinco, utilizando teste *in vitro*, na farinha e em frações de feijão fava, variando nas amostras o teor de fitatos destes alimentos através do uso artificial de fitases, que são as enzimas responsáveis pela degradação de fitatos. Constatou-se melhora significativa na bioacessibilidade *in vitro* dos elementos citados conforme aumentava a quantidade de fitase nos experimentos, evidenciando a característica antinutricional dos fitatos no que tange à liberação de Fe e Zn da matriz dos alimentos analisados durante a digestão humana. Liang et al. (2010) avaliaram a bioacessibilidade *in vitro* de Ca, Fe e Zn e suas relações com o conteúdo de ácido fítico em arroz, constatando diminuição da bioacessibilidade com o aumento do conteúdo de ácido fítico nas amostras de arroz.

Por outro lado, mesmo diante dos efeitos antinutricionais, alguns estudos têm demonstrado o efeito benéfico do ácido fítico como agente antioxidante, coadjuvante no

tratamento de diabetes (OLIVEIRA et al., 2003) e na prevenção de alguns tipos de cânceres (KUMAR et al., 2010).

Além disso, outros estudos comprovaram que alguns métodos, como cocção, fermentação, germinação e maceração são capazes de reduzir significativamente o conteúdo de ácido fítico, através da ativação da fitase, naturalmente presente em cereais e legumes (SANT'ANA et al., 2000). Esses processos, com subsequente secagem, debulhamento e moagem dos grãos podem reduzir o fitato de 40% a 100% (SHARMA e KAPOOR, 1994; MARERO et al., 1990).

A relação molar fitato/Zn e fitato/Fe é sugerida como um indicador da biodisponibilidade de Zn e Fe, respectivamente. Uma relação maior que 12 poderia resultar na diminuição da biodisponibilidade de Zn em dietas, com redução na velocidade de crescimento e na concentração tecidual de Zn em ratos (COZZOLINO, 2009), e uma razão maior que 1 é considerada crítica para absorção de ferro (HURRELL, 2004).

Assim como os inibidores têm seus mecanismos de ação, os promotores também têm habilidade para aumentar a absorção de elementos na dieta. Os fatores dietéticos que aumentam a biodisponibilidade dos elementos traços, de uma forma geral, são espécies de moléculas que formam compostos solúveis com os minerais, resultando em um complexo que pode ser absorvido intacto, devido o elemento mineral estar na forma solúvel ou transferindo-o para o receptor da mucosa (CLYDESDALE, 1991).

Ácidos cítrico, málico, tartárico, láctico e ascórbico são estimuladores da absorção, sendo que o ascórbico é considerado o mais importante fator potencializador da absorção do ferro não-heme (ACCIOLY, LACERDA e ENGSTROM, 2009).

O ácido ascórbico (AA), L-ascórbico ou L-ascorbato, também conhecido como vitamina C, pode ser obtido através de frutas e vegetais (SPÍNOLA et al., 2014), quando puro apresenta solubilidade em água e é inodoro. O ácido ascórbico é oxidado com facilidade, formando o ácido dehidroascórbico, porém esse processo é reversível (STANA et al., 2014). Fatores como exposição a altas temperaturas, luz, presença de oxigênio ou de metais (Fe^{3+} , Ag^{2+} , Cu^{2+}), são as principais causas que induzem a oxidação. Entretanto, o ácido que é formado pela oxidação (dehidroascórbico) apresenta atividade biológica equivalente ao AA, sendo importante determinar o teor das duas formas do ácido, em alimentos (LEE e KADER, 2000).

O ácido ascórbico, tanto na forma natural ou adicionado durante o processamento na forma cristalina, quando ingerido juntamente com o ferro, potencializa sua absorção (MARTINI, 2002). Seu mecanismo de ação pode envolver processos de redução do pH intestinal, com consequente redução do estado férrico para ferroso ou formação do complexo ferro-ascorbato, por meio da ligação do ferro com os grupos hidroxílicos nas posições 2 e 3 da molécula do ácido

ascórbico e também inibição dos efeitos negativos dos polifenóis e dos fitatos em concentrações iguais ou superiores a 50 µg de ácido ascórbico (HURRELL, 1997).

Estudos com diferentes refeições mostraram aumento exponencial dose dependente da absorção do ferro não-heme pelo aumento de doses de ácido ascórbico (ZIPJ e TIJBURG, 2000). A presença de vitamina C, contida em diversas frutas e hortaliças, pode aumentar três vezes ou mais a absorção do ferro não heme (ACCIOLY, LACERDA e ENGSTROM, 2009).

Além de atuar como promotor de alguns minerais, o ácido ascórbico mostrou-se eficiente em compensar o efeito inibitório dos compostos fenólicos. Foi o que verificou-se no estudo de Kim et al. (2011). Os compostos fenólicos extraídos do chá-verde e semente de uva tiveram sua inibição compensada pelo ácido ascórbico, além disso, ele foi capaz de aumentar a absorção de ferro basolateral nas células caco-2.

A principal razão que o ácido ascórbico promove a biodisponibilidade de ferro é a sua capacidade de reduzir o ferro do estado férrico a ferroso sendo prontamente transportado como Fe^{2+} e assim ser absorvido mais facilmente devido à solubilidade (ENGLE-STONE et al., 2005).

Os aminoácidos sulfurados também têm se mostrados importantes na promoção de absorção de minerais. Os α -aminoácidos, unidades estruturais base das proteínas, são definidos como sendo substâncias biologicamente ativas, que podem ser encontrados em células vivas, mas também em fluídos corporais de animais, em quantidades variáveis de acordo com o tecido em particular. Os α -aminoácidos caracterizam-se por apresentarem uma estrutura geral comum, um carbono central ao qual se ligam dois grupos funcionais, um grupo carboxila e um grupo amina, um átomo de hidrogênio e uma cadeia lateral (R), sendo que esta última influência de forma determinante as características de cada aminoácido (KHAN e FAIZ, 2008; HOU et al., 2009).

A cisteína é considerada como sendo muito específica e única por conter um grupo tiol (-SH) muito reativo na sua cadeia lateral, que lhe confere baixa polaridade (BALD et al., 2004). Além disso, está envolvida em múltiplas funções biológicas desempenhando importante papel em processos biológicos e metabólicos que ocorrem nos organismos vivos (BAKIRDERE et al., 2010).

Histidina e cisteína possuem alta afinidade de ligação com o zinco (MARTELL e SMITH, 1974). Aminoácidos pode aumentar a biodisponibilidade removendo o zinco quelado a partir de constituintes dietéticos de ligação ao zinco, como o ácido fítico. Evidência de tal ação foi apresentada em estudos de absorção de zinco em peixes, no qual os efeitos benéficos da adição de zinco como um aminoácido quelato foram maiores em dietas que continham altos níveis de ácido fítico (PARIPATANANONT e LOVELL, 1995). Este aumento na biodisponibilidade pode ser obtido através de duas formas, aminoácidos podem agir para transportar zinco de componentes

dietéticos com baixa afinidade de ligação ao elemento mineral, levando-o para superfícies com maior afinidade (WAPNIR et al., 1985; ACKLAND e MCARDLE, 1990; BOBILYA et al., 1993), alternativamente, a formação de um aminoácido quelato de zinco pode criar um substrato para o transporte através da superfície epitelial (WAPNIR et al., 1983).

Acredita-se que a alta disponibilidade de ferro oriundo de carne, peixe e frango seja devido aos produtos de digestão que contêm grandes quantidades de peptídeos de cisteína que podem aumentar a absorção de ferro e de aminoácidos que quelam o mineral e são absorvidos intactos por proteínas transportadoras de aminoácidos (LA FRANO et al., 2014).

Porém, assim como o ácido ascórbico, a cisteína quando submetida ao processamento térmico pode perder suas propriedades de promoção devido à oxidação do seu grupo funcional (BOUIS e WELCH, 2010).

É essencial obter uma dieta equilibrada que forneça todos os nutrientes que o organismo necessita, porém deve-se considerar que parte do que ingerimos não está acessível. Desta forma, investir em estratégias que aumentem a biodisponibilidade desses micronutrientes pode ser uma opção de melhoria. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi adicionar alimentos que contém componentes promotores à mistura clássica de arroz e feijão com o intuito de verificar se houve diferença em relação a bioacessibilidade de ferro e zinco e se os inibidores contidos nas misturas estão associados na diminuição desta bioacessibilidade. Para isso, os objetivos específicos desse estudo foram:

- Determinar os teores de antinutrientes, taninos e ácido fítico
- Determinar os teores de promotores, ácido ascórbico e cisteína
- Relacionar os teores acima com a quantidade de ferro e zinco dos tratamentos, bem como com a bioacessibilidade de tais elementos.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Material

Os grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) foram fornecidos pela Embrapa Arroz e Feijão, localizada em Santo Antônio de Goiás, no estado de Goiás e a cultivar escolhida foi a BRS Pontal, comercialmente conhecida como carioca. O arroz branco polido, classe longo fino (*Oryza sativa*), o alho (*Allium sativa*), a cebola (*Allium cepa*) e o tomate variedade Débora (*Solanum lycopersicum*) foram adquiridos em supermercado local (Piracicaba, SP).

3.2.1.1. Preparo das amostras

Feijão: As amostras de feijão (150 g) foram deixadas em maceração na proporção 3:1 (água para feijão), em Erlenmeyer de 250 mL por 10 horas em água destilada, trocou-se a água na proporção 2:1 (água: feijão) e os grãos foram cozidos em autoclave a 121°C por 10 min.

Arroz: Os grãos de arroz (150 g) foram cozidos em panela aberta de alumínio com capacidade de 1 L durante 10 min com a seguinte proporção 1:2 de arroz/água destilada. O cozimento ocorreu na planta piloto do departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, em fogão doméstico. A proporção de arroz-feijão, foi 2:1, pois esta aumenta a biodisponibilidade proteica (COZZOLINO, 2016).

Tomate: O tomate (*Solanum lycopersicum*), variedade Débora, foi utilizado cru, portanto adicionou-se após o tratamento térmico do arroz e feijão. Foram utilizados aproximadamente 230 g de tomate por 100 g da mistura arroz-feijão, após cocção, segundo o proposto por Fantini et al. (2008) e após a adição, a mistura foi homogeneizada com auxílio de *mixer*.

Alho e cebola: O alho (*Allium sativa*) e cebola (*Allium cepa*) foram cortados, conforme descrito item 2.2.1.1 e adicionados ao arroz no momento do cozimento. Foram utilizados 0,5 g de alho e 3 g de cebola para 10 g da mistura arroz-feijão (peso antes da cocção), baseado no estudo de Gautam, Platel e Srinivasan (2010).

Foram propostos quatro tratamentos (Figura 13):

Figura 13. **Composição dos tratamentos T1; T2; T3 e T4**

Para a realização do preparo dos tratamentos, após a pesagem e adição de todos os componentes foi utilizado um *mixer* para homogeneizar as amostras.

3.2.2. Métodos

3.2.2.1. Determinação de fatores antinutricionais

3.2.2.1.1. Taninos

A determinação de taninos foi realizada de acordo com Price, Hagerman e Butler (1980), nas amostras previamente secas (secagem feita de acordo com o item 2.2.2.3). Foram adicionados 0,6 g de amostra a um Erlenmeyer de 250 mL, posteriormente foram adicionados 10 mL de metanol para extração. Em seguida, agitou-se o Erlenmeyer em mesa agitadora por 20 min. Após este tempo, o conteúdo foi centrifugado a 2000 x g por 20 min. O sobrenadante foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e completado com metanol até a marca de aferição. Logo após, a solução obtida foi homogeneizada e transferida para Becker de 50 mL. Posteriormente, transferiu-se 1 mL do extrato obtido para tubo de ensaio. Foi adicionado ao tubo 5 mL da mistura vanilina-HCl 8% 1:1. Homogeneizou-se bem e cobriu-se o tubo com papel filme. Agitou-se por 20 min em banho-maria a 30 °C, e resfriou-se em água corrente e homogeneizou-se bem antes da leitura. A curva de calibração foi construída com padrão de concentrações conhecidas de catequina a 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mg.mL⁻¹. A leitura das amostras e dos pontos da curva foi realizada em espectrofotômetro SHIMADZU, modelo UV-1800 a 500 nm de comprimento de onda.

3.2.2.1.2. Ácido fítico

O método utilizado foi realizado segundo Latta e Eskin, (1980), o qual se baseia na formação de um composto ferro-ácido-sulfossilissílico de coloração azul escuro denominado reagente de Wade. Na presença de fitato o ferro é deslocado, reduzindo a intensidade da coloração.

Foram pesadas 250 mg de amostra em tubos Falcon de 15 mL e a extração foi feita com 10 mL de HCL 0,5 M. Na sequência deixou-se sob agitação durante 3 horas, para que ocorresse a extração e solubilização do fitato. Centrifugou-se a 4520 x g, por 20 min a temperatura de 20 °C. O sobrenadante foi retirado e guardado no freezer a -80 °C. No dia seguinte procedeu-se a análise adicionando a um novo tubo Falcon de 50 mL: 8 mL de água ultrapura e aproximadamente 3 mL de resina de troca aniônica tratada com NaCl 0,07 M e 0,7 M mais 2mL da amostra (sobrenadante). Os tubos foram agitados durante 1 hora em agitador tipo “rocker”, marca Labnet, modelo Labnet International Rocker 25, submetidos à centrifugação nas mesmas condições de extração e descartou-se o sobrenadante. Posteriormente, acrescentou-se à resina (precipitado) 8 mL de NaCl 0,07M, para retirar impurezas como proteínas e fósforo inorgânico. Os tubos foram agitados por 10 min e novamente centrifugados na mesma programação. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se à resina 8 mL de NaCl 0,7M para eluir o fitato da resina e deixá-lo em solução. Agitou-se em “rocker” durante 1 hora e foram centrifugados a 1200 x g, na mesma temperatura e tempo citados acima. Utilizou-se o sobrenadante para fazer a quantificação, retirando uma alíquota de 3 mL. Essa alíquota foi misturada com 2 mL de reagente de Wade e centrifugou-se a 4520 x g, 10 min a temperatura de 20 °C. A curva de calibração foi construída com concentrações conhecidas de padrão de fitato de sódio a 0; 35; 70; 105; 140; 175 e 210 mg.L⁻¹. Em seguida foi realizada a leitura das amostras e do padrão em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1800 a 500 nm de comprimento de onda.

3.2.2.2. Determinação de promotores

3.2.2.2.1. Ácido ascórbico

A determinação de ácido ascórbico foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ-USP.

3.2.2.2.1.1. Extração de ácido ascórbico e dehidroascórbico

A extração de ácido ascórbico e dehidroascórbico foi feita de acordo com o descrito por Bresolin e Hubinger (2014). Foram pesados 5 g de amostra em tubo Falcon de 50 mL e diluídos com 10 mL de ácido metafosfórico 3% (p/v), permanecendo por 10 min em banho ultrassônico a 25°C. Em seguida, o material foi centrifugado por 5 min a 5000 xg a 10°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro micropore de 0,22 µm.

3.2.2.2.1.2. Redução do ácido dehidroascórbico em ascórbico com DL-dithiothreitol (DTT)

A redução com DTT foi feita de acordo com Usaga et al. (2016) e Gutiérrez-Quequezanaa et al. (2017).

A redução foi realizada pela adição de 400 µL de agente redutor (de uma solução 100 mM DTT) a 1 mL de extrato filtrado em vial de cor âmbar. O processo de redução foi realizado em temperatura ambiente por uma hora no escuro.

Os extratos foram feitos em triplicata, sendo que para cada extrato foram feitos dois tratamentos: com e sem DTT. Os tratamentos que não receberam agente redutor, receberam no lugar 400 µL de ácido metafosfórico para igualar a diluição.

3.2.2.2.1.3. Determinação do teor de ácido ascórbico

A determinação do teor de AA foi feita por análise cromatográfica, com base nos procedimentos de Bresolin e Hubinger (2014). As análises cromatográficas foram feitas em um HPLC Shimadzu Prominence - 20 AT, equipado por sistema de bombeamento, injetor automático de amostras, forno de coluna, comunicador e detector UV (ajustado para comprimento de onda de 245 nm). As separações cromatográficas do ácido ascórbico foram feitas utilizando uma coluna Agilent C18 (250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm). Como fase móvel, foi utilizado tampão fosfato pH 2,5 (fosfato de potássio monobásico 0,1 mol/L, KH_3PO_4 , para ajuste do pH foi utilizado ácido ortofosfórico) em modo isocrático por 20 min a um fluxo de 1 mL/min. Todos os métodos cromatográficos foram realizados a 25°C e o volume de injeção foi de 20 µL para o padrão e amostras. A curva de calibração foi construída a partir de um padrão de ácido ascórbico, com os seguintes pontos: 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 e 64 µg.mL⁻¹. As amostras foram comparadas com o tempo de retenção do padrão para identificação e ensaiadas em triplicata. O ácido

dehidroascórbico foi determinado pela diferença entre a concentração de ácido total (extrato tratado com DL-dithiothreitol) e do ácido ascórbico reduzido (sem DL-dithiothreitol). Os cálculos de limite de detecção e quantificação foram baseados no estudo de Ribani et al. (2004). Os valores de limite de detecção e quantificação foram 0,0017 e 0,0052 µg, respectivamente.

3.2.2.2.2. Cisteína

A determinação de cisteína foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Plantas pertencente ao Departamento de Genética localizado na ESALQ-USP.

3.2.2.2.2.1. Extração de aminoácidos

A cisteína solúvel foi extraída segundo o método de Bielecki e Turner (1966) com duas repetições. Foram utilizados 0,4 g de amostra liofilizada em 4 mL de MCA (metanol: clorofórmio: água, na proporção 12:5:3). As misturas foram deixadas durante 1 noite em geladeira. Posteriormente, foram centrifugadas a 10000 g durante 20 min a 4 °C, ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada para cada 4 mL de MCA utilizado. As amostras foram centrifugadas novamente e a fase aquosa formada foi retirada cuidadosamente. A fase coletada foi colocada em banho-maria por 1 hora a 38 °C e em seguida levada ao concentrador de amostras (Concentrador Vacufuge Eppendorf) para completa concentração. As amostras foram ressuspensas em 0,1 mL de água ultrapura, filtrada em Millex 0,22 µm para posterior dosagem de cisteína solúvel, utilizando sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC).

3.2.2.2.2.2. Derivatização e quantificação de cisteína

A quantificação de cisteína foi feita de acordo com Alcântara et al. (2016). A análise por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) foi realizada com o sistema Acquity HClass (Waters), coluna BEH C18 (100 mm x 2,1 mm i.d., 1,7 µm). Para a derivatização foram aplicados em vials 70 µL de tampão borato, 10 µL da amostra ou do padrão em concentrações conhecidas (25, 50, 75 e 100 pmol/µL) e 20 µL do derivatizante (AccQ – Tag Ultra Derivatization Kit – Waters - 6-aminoquinolil-N-hidroxi succinimidilcarbamato). O branco consistiu em 80 µL de tampão borato e 20 µL do derivatizante. A mistura foi agitada imediatamente em vortex por alguns segundos e deixada repousar por 1 min a temperatura ambiente. Após isto, os vials foram colocados em banho a 55 °C por 10 min. O volume da injeção foi de 1 µL e a detecção foi realizada em comprimento de onda de 260 nm. A fase móvel foi composta por 100% Eluent A - AccQ-Tag,

(Waters) (A), 10% Eluent B AccQ-Tag, (Waters) (B), 100 % água ultrapura (C) e 100% Eluent B AccQ-Tag (D) e o modo de eluição gradiente teve a seguinte proporção (Tabela 7):

Tabela 7. Gradiente da corrida para análise de cisteína

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	% Fase móvel A	% Fase móvel B	% Fase móvel C	% Fase móvel D
Início	0,7	10,0	0,0	90,1	0,0
0,29	0,7	9,9	0,0	90,0	0,0
5,49	0,7	9,0	80,0	11,0	0,0
7,10	0,7	8,0	15,6	57,9	18,5
7,30	0,7	8,0	15,6	57,9	18,5
7,69	0,7	7,8	0,0	70,9	21,3
7,99	0,7	4,0	0,0	36,3	59,7
8,59	0,7	4,0	0,0	36,3	59,7
8,68	0,7	10,0	0,0	90,0	0,0
10,20	0,7	10,0	0,0	90,0	0,0

A temperatura da coluna permaneceu a 43 °C e o tempo de corrida foi 10,20 min. A concentração de cisteína nas amostras foi determinada em relação à curva padrão de concentrações conhecida de cisteína com os seguintes pontos: 5; 10; 15 e 20 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$.

3.3. Análise estatística

Os resultados das análises de taninos, ácido fítico, ácido ascórbico e cisteína foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey, no nível de 5% de significância entre os tratamentos.

Para correlacionar os inibidores e promotores com os teores de ferro e zinco bem como a bioacessibilidade destes minerais foi aplicada regressão linear.

Para todas as análises, foi utilizado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS, 1996).

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. Fatores antinutricionais

3.4.1.1. Teores de taninos

O processo de maceração e cozimento reduzem drasticamente a presença de taninos. Oliveira et al. (2001) observaram diminuição no teor de taninos nas amostras que foram submetidas ao processo de cocção e que o melhor tratamento para redução de taninos foi a maceração, seguida da cocção sem a água de maceração, no qual houve diminuição de 88% de taninos na amostra. Esse procedimento foi utilizado para o preparo do feijão neste estudo.

Os teores de taninos encontrados nos tratamentos variam entre si, sendo que o menor valor foi encontrado no tratamento 3 (arroz, feijão, alho e cebola), que diferiu de todos os tratamentos significativamente, enquanto que no tratamento 4 (arroz, feijão, alho, cebola e tomate) observou-se o maior teor. O tratamento 2 (arroz, feijão e tomate) não diferiu significativamente dos tratamentos 1 e 4 e o tratamento 1 (arroz e feijão) diferiu de todos, com exceção do tratamento 2 (Tabela 8).

Tabela 8. Teor de taninos e ácido fítico, resultados em mg/g (taninos) e mg/100g (ácido fítico) de matéria seca.

Tratamento*	Taninos (mg/g)**	Ácido fítico (mg/100g de amostra)**
T1	1,41±0,11 ^b	2,71±0,00 ^b
T2	1,66±0,19 ^{ba}	2,77±0,00 ^b
T3	0,52±0,11 ^c	4,89±0,00 ^a
T4	1,77±0,03 ^a	1,20±0,00 ^b

*T1- Arroz, feijão; T2- arroz, feijão, tomate; T3- arroz, feijão, alho e cebola; T4- arroz, feijão, alho, cebola e tomate; Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa (95% de confiança); ** Média (n=3) e desvio padrão

O tratamento 1 (arroz e feijão) apresentou teor mais elevado de taninos em relação ao tratamento 3 (arroz, feijão, alho e cebola). Isso era o esperado já que o T1 apresentava maior quantidade de feijão em relação ao T3 e esta leguminosa contém taninos em sua composição. Os taninos estão presentes em teores que variam de 0,03 a 38,1 mg de equivalente de catequina/g de feijão seco (DE MEJÍA et al. 2003; RAMÍREZ-CÁRDENAS et al., 2008). O conteúdo de taninos está associado com o tegumento dos grãos e da espécie (BENINGER e HOSFIELD, 2003).

Além do feijão, o tomate também apresenta taninos em sua composição, supondo que este seja o motivo do tratamento 3 ter apresentado o menor valor do antinutriente entre os tratamentos já que ele não contém tomate em sua composição. Além dos ácidos fenólicos e dos flavonoides, os taninos também são encontrados em muitas frutas, sendo caracterizado como

composto fenólico de alto peso molecular, que precipitam proteínas (CHIOCCETTI, 2013). O tomate está entre estas frutas que apresentam altos níveis de taninos e outros polifenóis (PETERSON, BOEHM E STACK, 1997).

O tomate tornou-se um dos legumes mais populares sendo amplamente consumido, devido ao seu sabor, valor nutricional (vitaminas C e A), ciclo de crescimento curto e rendimento relativamente alto (MARSIC' et al., 2005; ORTIZ et al., 2007). No entanto, também contém vários fatores antinutricionais. Diferentes estudos levaram à conclusão de que esses fatores antinutricionais (incluindo taninos) podem se ligar a proteínas e alguns minerais essenciais da dieta e torná-los indisponíveis ou parcialmente disponíveis para absorção (MAGA, 1982; WELCH, 1999). Os teores mais elevados de taninos foram encontrados justamente nos tratamentos que continham tomate.

Nos alimentos, estes compostos podem influenciar a qualidade sensorial e o valor nutritivo, conferindo atributos como cor, textura, amargor e adstringência. Além disso, os compostos fenólicos são os antioxidantes mais abundantes nos vegetais (EVERETTE et al., 2010).

3.4.1.2. Teores de ácido fítico

Os resultados de ácido fítico dos tratamentos estão apresentados na Tabela 8.

O tratamento com teor mais elevado e o único com diferença significativa entre os demais foi o tratamento 3. Os demais tratamentos não diferiram entre si.

O baixo valor de ácido fítico encontrado nos tratamentos pode incluir fatores como cocção e maceração, além da ausência de grãos integrais, já que o arroz utilizado na composição do tratamento era polido e sabe-se que o fitato está presente em maior quantidade em grãos integrais (COZZOLINO, 2016).

Brigide e Canniatti-Brazaca (2006) encontraram o teor de 9,55 mg de ácido fítico por g de feijão e observaram que a cocção não altera a quantidade de fitatos contidos no feijão, porém, a maceração por 12 horas reduz o teor de fitatos em 31% e a maceração por 24 horas reduz em 16%. Neste estudo, os grãos de feijão foram macerados por 10 horas.

Tognon (2012) observou que o processo de cozimento do arroz e outros cereais ocasionou redução do conteúdo de ácido fítico dos mesmos. Os valores encontrados em arroz cru e cozido foram de 0,11 a 0,09 g.100g, respectivamente. Os cereais que foram macerados obtiveram redução ainda maior, em torno de 65%.

Fantini et al. (2008) compararam quatro tratamentos: feijão; feijão e tomate; feijão e arroz e feijão, arroz e tomate. Os valores variaram de 0,94 a 1,99 mg.g⁻¹, sendo que o maior valor de ácido fítico foi encontrado na mistura de arroz e feijão e os menores valores as que continham tomate,

resultado semelhante pode ser visto neste trabalho, já que o tratamento 4 (arroz, feijão, alho, cebola e tomate) apresentou o menor valor de ácido fítico.

O conteúdo de ácido fítico oscilou entre 7,8 a 27,1 mg.g⁻¹, em grãos crus. (DÍAZ-BATALLA et al., 2006; RAMÍREZ-CÁRDENAS et al., 2008; SHIMELIS e RAKSHIT, 2007; ANTON, et al., 2008). Sendo que, 81 a 89% estão presentes como hexafosfato de mioinositol (IP6) (RAMÍREZ-CÁRDENAS et al., 2008) e 26-53% está localizado na casca (ANTON et al., 2008).

As formas IP6 e IP5 são as que apresentam maior efeito negativo sobre a biodisponibilidade de minerais, com capacidade de ligação a minerais ou de formar complexos (PHILLIPPY et al., 1988; KOZLOWSKA et al., 1996).

A desfosforilação do IP6, produzindo compostos como pentafofato (IP5), tetrafofato (IP4), trifosfato (IP3) e difosfato, possivelmente inositol (IP2) e monofosfato (IP1), pode ser desencadeada durante o processamento, no armazenamento, na fermentação, na germinação e na digestão do feijão, pela atividade de fitases endógenas (SHIMELIS E RAKSHIT, 2007; RAMÍREZ-CÁRDENAS et al., 2008).

3.4.1.3. Relação entre minerais e taninos

A fim de testar a associação dos taninos com os teores de ferro, ferritina, zinco e a concentração de zinco absorvido pelas células, aplicou-se regressão (Tabela 9).

A associação de taninos com ferritina, bioacessibilidade de ferro, zinco, zinco bioacessível e bioacessibilidade de zinco não foi significativa, ou seja, o teor de taninos presente nos tratamentos não influencia a bioacessibilidade de minerais contidos nas amostras. Isso pode ter acontecido devido aos grãos de feijão terem sido macerados e a água da maceração ser desprezada além dos grãos terem sido submetidos ao cozimento, diminuindo assim o teor de taninos. Silva, Rocha e Canniatti-Brazaca (2009) avaliaram o teor de taninos em feijões antes e após a cocção e observaram que o teor de taninos reduziu de 0,86 a 0,05 mg.g⁻¹ de feijão BRS Pontal e 0,74 a 0,10 mg.g⁻¹ de BRS Supremo.

Tabela 9. Resultados de regressão do efeito de taninos sobre ferro, ferritina, bioacessibilidade de ferro, zinco, concentração de zinco bioacessível e bioacessibilidade de zinco.

Preditor	Regressão		Estatística		
	a	b	F	p	R ² (%)
Ferro	23,74	7,05	10,95	0,0079*	52,27
Ferritina	0,15	0,39	4,89	0,0514	32,86
Bioacessibilidade Fe	0,93	0,80	2,55	0,1411	20,34
Zinco	22,48	-0,88	0,49	0,5016	4,64
Zinco bioacessível	1,11	-0,06	0,80	0,3919	7,41
Bioacessibilidade Zn	4,92	-0,03	0,01	0,9380	0,06

*Valor de $p < 0,05$, indicando associação entre preditor e taninos

A associação de taninos com o teor total de ferro foi significativa, porém não foi observada inibição e sim o teor de taninos foi diretamente proporcional ao teor de ferro, quanto maior o teor de taninos maior o teor de ferro. Este fato pode ter ocorrido devido aos tratamentos que apresentaram maior teor de ferro serem os que continham tomate, que assim como o feijão, contêm taninos em sua composição (tratamentos 2: arroz, feijão e tomate; tratamento 4: arroz, feijão, alho, cebola e tomate). Nesse caso, constatou-se que o tanino não teve ação inibitória sobre o ferro.

3.4.1.4. Relação entre minerais e ácido fítico

O ácido fítico teve efeito inibitório em ferritina e consequentemente na bioacessibilidade de ferro (Figura 14). Este efeito pode ser explicado pelo fato do tratamento 4 (arroz, feijão, alho, cebola e tomate) que apresentou a maior taxa de bioacessibilidade ser o tratamento com menor valor de ácido fítico. No entanto, o ácido fítico não influenciou o teor total de ferro, sendo que este resultado pode ser atribuído aos valores distintos de ácido fítico encontrados nos tratamentos 2 (arroz, feijão e tomate) e 4 (arroz, feijão, alho, cebola e tomate), que foram os dois que apresentaram maior teor de ferro. Os resultados da regressão sobre o efeito do ácido fítico em relação ao ferro e zinco estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados de regressão do efeito de ácido fítico sobre ferro, ferritina, bioacessibilidade de ferro, zinco, concentração de zinco bioacessível e bioacessibilidade de zinco.

Preditor	Regressão		Estatística		
	a	b	F	p	R ²
Ferro	40,30	-639,19	5,62	0,0555	48,36
Ferritina	1,36	-0,23	11,50	0,0146*	65,72
Bioacessibilidade Fe	3,58	-0,51	8,63	0,0260*	59,00
Zinco	19,42	0,78	4,00	0,0924	40,01
Zinco bioacessível	0,99	0,01	0,11	0,7546	1,75
Bioacessibilidade Zn	5,23	-0,16	0,47	0,5183	7,27

*Valor de $p < 0,05$, indicando associação entre preditor e taninos

Gautam, Platel e Srinivasan (2011), avaliaram dois níveis de ácido fítico exógeno em diversos cereais e leguminosas e avaliaram seu efeito sobre a bioacessibilidade de ferro e zinco. Para as leguminosas notou-se efeito negativo sobre a bioacessibilidade de ferro, porém, para os cereais tal diferença não foi encontrada. O nível mais baixo de ácido fítico reduziu em 33% a bioacessibilidade de ferro, enquanto que o segundo nível não produziu qualquer redução apreciável adicional na bioacessibilidade do ferro. Já para zinco, o ácido fítico gerou efeito negativo apenas para um tipo de leguminosa, sendo que o restante não sofreu influência deste inibidor sobre a bioacessibilidade do mineral.

Figura 14. Gráfico representando a influência de ácido fítico na bioacessibilidade de ferro.

Para a bioacessibilidade de zinco e o zinco bioacessível, o ácido fítico não teve efeito algum, porém para o teor total de zinco, o ácido fítico teve efeito inverso, não atuou como inibidor pois o teor de zinco foi diretamente proporcional ao teor de ácido fítico, ou seja, quanto maior o teor de zinco, maior o teor de ácido fítico. Isto pode ser explicado devido ao tratamento 3 (arroz, feijão, alho e cebola) ter apresentado o maior teor de zinco e de ácido fítico.

Tognon (2012) concluiu que a influência do ácido fítico (e seus fitatos) na bioacessibilidade de minerais depende em qual parte ele está presente no grão de cereais (pericarpo, endosperma ou gérmen). Esta conclusão foi feita depois de correlacionar o conteúdo de ácido fítico com a bioacessibilidade de minerais de cereais, frutas e hortaliças e verificar que em cereais nem sempre se obtém valores inversamente proporcionais, o que também foi encontrado neste estudo. O autor concluiu ainda, que o cozimento foi capaz de aumentar a bioacessibilidade de minerais em cereais (Zn, Fe, Mg e Cu, Ca, K, Na).

A relação molar fitato/Zn e fitato/Fe é sugerida como um indicador da biodisponibilidade de Zn e Fe. Uma relação maior que 12 poderia resultar na diminuição da biodisponibilidade de Zn em dietas (COZZOLINO, 2009), e uma razão maior que 1 é considerada crítica para absorção de ferro (HURRELL, 2004). A razão molar de fitato/Fe e fitato/Zn neste estudo ficou abaixo dos valores considerados críticos, >1 (Fe) e >12 (Zn), provavelmente devido ao baixo teor de ácido fítico encontrado nos tratamentos.

3.4.2. Promotores da absorção de minerais

Na Tabela 11 mostram-se os resultados de ácido ascórbico e cisteína nos tratamentos.

Tabela 11. Teor de ácido ascórbico, expresso em mg.100g e cisteína (n=2) expressa em $\mu\text{g.g}^{-1}$, ambos em matéria seca.

Tratamento*	Ácido ascórbico (AA)**		Cisteína**
	s/dtt	c/dtt ¹	
T1	nd ¹	nd ¹	$0,84 \pm 0,12^c$
T2	$34,21 \pm 4,90^b$	$37,96 \pm 5,43^b$	$6,07 \pm 0,25^b$
T3	$1,15 \pm 0,05^c$	$1,36 \pm 0,06^c$	$5,81 \pm 0,77^b$
T4	$90,62 \pm 2,99^a$	$97,01 \pm 3,87^a$	$11,02 \pm 0,92^a$

*T1- Arroz, feijão; T2- arroz, feijão, tomate; T3- arroz, feijão, alho e cebola; T4- arroz, feijão, alho, cebola e tomate; ¹ o teor de ácido ascórbico ficou abaixo do limite de detecção; ¹ tratamentos submetidos à redução com DL-dithioeritol, que reduz o ácido dehidro-ascórbico a ascórbico

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa (95% de confiança)

**Média (n=3) e desvio-padrão

3.4.2.1. Teor de ácido ascórbico

O tratamento que obteve o maior teor de AA foi o 4, com teor de 97,01 g.100g de amostra seca, seguido pelo tratamento 2 com 37,96 g.100g. Isso era o esperado já que são os dois

tratamentos que contêm tomate e este fruto é fonte de ácido ascórbico. Segundo Usda (2016), o tomate apresenta 250 mg.100g de ácido ascórbico, em base seca.

O tratamento 3 por conter cebola em sua composição, que contém 4,7 mg.100g (Unicamp, 2011), apresentou valor de 1,36 mg.100g de amostra enquanto que o tratamento 1 ficou abaixo do limite de detecção, devido ao arroz e feijão conterem traços desta substância (UNICAMP, 2011).

Figura 15. Perfil cromatográfico do ácido ascórbico do tratamento 2. Tempo de retenção: 4,7 min; comprimento de onda: 245 nm.

Figura 16. Perfil cromatográfico de ácido ascórbico no tratamento 3. Tempo de retenção: 4,7 min; comprimento de onda: 245 nm.

Figura 17. Perfil cromatográfico de ácido ascórbico do tratamento 4. Tempo de retenção: 4,7 min; comprimento de onda: 245 nm.

O principal motivo de deterioração do AA é a oxidação aeróbica ou anaeróbica. Outros fatores como, luz, calor, alcalinidade, catalisadores metálicos, danos físicos e baixa umidade relativa (LEE e KADER, 2000) também ocasionam degradação do AA. Por isso, toda etapa de determinação de ácido ascórbico foi feita na ausência de luz, para evitar possíveis perdas.

Díaz et al. (2003) avaliaram isótopos de ferro em humanos para avaliar o efeito sobre a absorção de ferro, adicionando 25 mg de ácido ascórbico (através de suco de limão) a 2 refeições típicas por dia durante 2 semanas. Os autores observaram que a adição de 25 mg de AA aumentava a absorção de ferro quando ingeridos em duas refeições por dia. É importante o conhecimento sobre o teor de ácido ascórbico em refeições devido aos cálculos de ingestão diária recomendada bem como usar tais dados para programas que visem aumentar a absorção de ferro e outros minerais para grupos específicos, como crianças em idade pré-escolares, grávidas e lactantes.

Fantini et al. (2008) encontraram maior teor de ácido ascórbico na mistura que continha arroz, feijão e tomate (19,43 mg.100g) em relação às que continham apenas feijão (9,9 mg.100g), feijão comum e tomate (15,87 mg.100g) e arroz e feijão (8,78 mg.100g), em base fresca. Resultados semelhantes foram verificados neste estudo que encontrou maior teor de AA no tratamento que continha maior diversidade de alimentos (T4: arroz, feijão, alho, cebola e tomate).

Na Tabela 11 pode-se observar os valores de AA total (c/DTT) e AA sem considerar o ácido dehidroascórbico (s/DTT). Não houve diferença significativa entre os tratamentos com e sem DTT, porém devido ao ácido dehidroascórbico exibir atividade biológica equivalente ao AA, é importante realizar a determinação total desses ácidos em alimentos (LEE e KADER, 2000).

3.4.2.2. Teor de cisteína

Os resultados do teor de cisteína estão apresentados na Tabela 11.

O tratamento 4 (arroz, feijão, alho, cebola e tomate), além de ser o que possui maior teor de ácido ascórbico, também contém o maior teor de cisteína, com valor de $11,02 \mu\text{g.g}^{-1}$ de matéria seca. Em seguida encontramos os tratamentos 2 e 3 com valores de $6,07$ e $5,81 \mu\text{g.g}^{-1}$, que não tiveram diferença significativa entre si. Com o menor teor de cisteína está o tratamento 1 com valor de $0,84 \mu\text{g.g}^{-1}$, de matéria seca.

Os vegetais do gênero *Allium* são conhecidos por conter aminoácidos sulfurados, como a cisteína. O alho apresenta $12,7 \text{ mg.g}^{-1}$ de cisteína em sua composição enquanto que a cebola apresenta $0,56 \text{ mg.g}^{-1}$ em base fresca (KUBEC e DADÁKOVÁ, 2009), isso explica os tratamentos que contêm estes vegetais, apresentarem teores de cisteína maiores ao encontrado no tratamento 1 (arroz e feijão) que não contém esses vegetais.

Com o intuito de promover a absorção de minerais presentes no arroz e feijão foram elaborados os tratamentos 2, 3 e 4. Os três tratamentos apresentaram maior teor de cisteína quando comparados ao tratamento 1, que não continha nenhum promotor.

Segundo o Usda (2018) o arroz cozido possui 0,06; tomate 0,01; alho 0,07; cebola 0,02 e o feijão 0,02 g.100g de cisteína em suas respectivas composições, todos em base fresca.

Joseph e Swanson (1993) observaram que o arroz possui 32% mais aminoácidos sulfurados do que o feijão (metionina e cisteína), e os valores variaram de 0,15 a 0,17 g.100g de cisteína em base seca para mistura de arroz e feijão na mesma proporção utilizada neste trabalho (2:1). O aminograma do tratamento 4 (arroz, feijão, alho, cebola e tomate) está representado pela figura 18.

Figura 18. Aminograma do tratamento 4 (arroz, feijão, alho, cebola e tomate). Tempo de retenção da cisteína: 7,088 min.

3.4.2.3. Relação entre ácido ascórbico e minerais

Os resultados da regressão sobre o efeito do ácido ascórbico em relação ao ferro e zinco estão apresentados na Tabela 12. O ácido ascórbico se encontra associado com ferro, ferritina e na bioacessibilidade de ferro com influência diretamente proporcional. Ou seja, foi verificado efeito promotor do AA em relação ao ferro. Isto, porque o tratamento 4 que apresentou maior teor de ferro, ferritina e bioacessibilidade foi o mesmo tratamento que continha o maior teor de ácido ascórbico.

Tabela 12. Resultados de regressão do efeito de ácido ascórbico sobre ferro, ferritina, bioacessibilidade de ferro, zinco, concentração de zinco bioacessível e bioacessibilidade de zinco.

Preditor	Regressão		Estatística		
	a	b	F	p	R ²
Ferro	27,54	0,10	22,84	0,0411*	91,95
Ferritina	0,41	0,01	57,53	0,0169*	96,64
Bioacessibilidade (Fe)	1,49	0,02	60,40	0,0162*	96,80
Zinco	22,37	-0,03	25,74	0,0367*	92,79
Zinco bioacessível	1,07	0,00	0,00	0,9645	0,13
Bioacessibilidade (Zn)	4,78	0,01	1,61	0,3322	44,60

*Valor de $p < 0,05$, indicando associação entre preditor e ácido ascórbico

Este tratamento apresentou valor de 97,01 mg.100g de ácido ascórbico em sua composição contra 37,96 mg.100g do tratamento 2. Concluindo-se que a quantidade de AA encontrada no tratamento 2 não foi suficiente para promover a absorção de ferro.

O ácido ascórbico esteve associado com o teor total de zinco, porém inversamente proporcional e isto deve-se ao fato de que o tratamento 4 apresentou o maior teor de ácido ascórbico, porém o menor valor de zinco (18,39 mg/Kg).

Enquanto que, para o zinco bioacessível e para a bioacessibilidade de zinco o ácido ascórbico não surtiu efeito.

Outros estudos avaliaram o efeito do ácido ascórbico em relação a ferritina, como o de Jin et al. (2009), que utilizou modelo de células caco-2, e notaram que o ácido ascórbico quando na razão molar 1:20 de Fe: AA resulta em um aumento de 3 a 4 vezes na formação de ferritina em comparação com células não tratadas com ácido ascórbico.

Um estudo objetivou analisar a absorção de ferro com adição de ácido ascórbico em um programa de café da manhã escolar em áreas de baixa renda situadas no Peru. A refeição oferecida no programa continha teor de 14 mg de ferro/refeição, e os autores queriam analisar o quanto de ferro era absorvido além de verificar se haveria aumento da absorção de ferro se aumentasse o teor

de ácido ascórbico. Como resultado, descobriram que, desses 14 mg de ferro, 5% era absorvido (essa refeição continha 0,6:1 de ácido ascórbico = 26 mg de AA) e a absorção aumentou significativamente para 8,1% quando aumentou-se a razão molar de AA para 1,6:1, adicionando 70 mg de AA (DAVIDSSON et al., 2001), resultados semelhantes foram alcançados neste trabalho já que o tratamento 2 (arroz, feijão e tomate) com teor mais baixo de ácido ascórbico (37,96 mg.100g) não apresentou aumento na bioacessibilidade de ferro, enquanto que o tratamento 4 (arroz, feijão, alho, cebola e tomate) com teor mais elevado (97,01 mg.100g) alcançou a concentração mais alta de ferritina.

Na Figura 19 pode ser observado o efeito do ácido ascórbico na bioacessibilidade de ferro.

Figura 19. Gráfico de regressão linear sobre a associação entre ácido ascórbico e bioacessibilidade de ferro

3.4.2.4. Relação entre cisteína e minerais

Verificou-se que a cisteína não está associada com o teor de ferro bem como zinco bioacessível e bioacessibilidade de zinco. Já em relação ao teor de zinco a cisteína esteve associada de forma inversamente proporcional, fato este que se repetiu com o AA (Tabela 12), já que os teores mais altos dos dois promotores foram encontrados no T4 (arroz, feijão, alho, cebola e tomate) enquanto que este foi o tratamento com menor teor de zinco. O fato da cisteína não estar associada de forma inversamente proporcional ao zinco bioacessível e à bioacessibilidade de zinco sugere que ela até pode ter um efeito promotor, porém a quantidade utilizada no estudo não foi suficiente para conseguir tal efeito. Os resultados da regressão sobre o efeito da cisteína em relação ao ferro e zinco podem ser visualizados na Tabela 13.

Tabela 13. Resultados de regressão do efeito de cisteína sobre ferro, ferritina, bioacessibilidade de ferro, zinco, concentração de zinco bioacessível e bioacessibilidade de zinco.

Preditor	Regressão		Estatística		
	a	b	F	p	R ²
Ferro	17,93	1,84	9,15	0,0942	82,06
Ferritina	-0,54	0,18	23,67	0,0398*	92,21
Bioacessibilidade (Fe)	-0,72	0,41	53,75	0,0181*	96,41
Zinco	26,10	-0,68	347,65	0,0029*	99,43
Zinco bioacessível	1,05	0,00	0,02	0,9106	0,80
Bioacessibilidade (Zn)	3,70	0,20	2,28	0,2701	53,28

*Valor de p <0,05, indicando associação entre preditor e cisteína

Em relação à bioacessibilidade de ferro e ferritina a cisteína esteve associada de forma diretamente proporcional, evidenciando-se como promotor deste mineral, esta relação pode ser vista através do gráfico 20.

Figura 20. Gráfico de regressão linear sobre a associação entre cisteína e bioacessibilidade de ferro

Em estudo com humanos, a cisteína foi administrada durante a ingestão de alimentos e aumentou cerca de 2 vezes, a absorção do ferro não-heme e também aumentou significamente o ferro heme quando uma grande quantidade de aminoácido foi adicionada. No entanto, nenhum efeito intensificador foi obtido quando o aminoácido foi misturado com o alimento antes do cozimento final. Assim, sugere-se que a cisteína, quando em contato com o alimento, é rapidamente oxidada, perdendo seu efeito promotor na absorção de minerais (MARTINEZ- TORRES et al.,

1981), sugerindo que quando o alimento passa pelo processo de cocção há perda desse aminoácido. O alho e a cebola foram adicionados antes da cocção para simulação real de uma refeição, portanto pode ter havido perda de cisteína no processo de cocção, sendo o valor insuficiente para aumentar a absorção de zinco.

Iyengar, Pullakhandam e Nair (2010) analisaram quelantes dietéticos, como ácido ascórbico, cisteína, ácido tânico, tartárico e fítico, metionina e histidina na absorção de ferro e zinco separados e juntos na mesma solução através de células caco-2. Enquanto os minerais estavam sozinhos, a cisteína diminuiu a absorção do zinco e aumentou a do ferro, porém quando juntos o contrário foi observado, a cisteína aumentou a absorção de zinco e diminui a de ferro. O estudo tentou compreender os mecanismos de interação entre ferro e zinco e suas absorções quanto à adição de promotores.

Moura e Canniatti-Brazaca (2006) avaliaram cinco tratamentos, 1: carne bovina, 2: feijão cozido, 3: feijão cozido com cisteína, 4: feijão cozido com ácido ascórbico e 5: feijão cozido com cisteína e ácido ascórbico. O teor de ferro dializável só aumentou significativamente quando os dois promotores (cisteína e ácido ascórbico) estiveram no mesmo tratamento. Portanto, o tratamento 5 se igualou ao tratamento 1 que, por ter ferro heme e aminoácidos em sua composição, já era esperado o alto teor de ferro dialisável. Essa pesquisa está de acordo com os encontrados neste estudo, no qual a bioacessibilidade de ferro aumentou significativamente na presença de cisteína e ácido ascórbico.

3.5. Conclusão

Em relação aos inibidores mensurados neste estudo, o ácido fítico esteve relacionado à diminuição na bioacessibilidade de ferro, porém não foi encontrada tal relação com zinco. Os taninos não estiveram associados com a diminuição da bioacessibilidade de ferro nem de zinco, sugerindo que a maceração e cocção podem ter auxiliado na redução destes compostos.

Tanto o ácido ascórbico como a cisteína atuaram como promotores na absorção de ferro, porém somente surtiram efeito quando no mesmo tratamento. O maior teor de ácido ascórbico e cisteína foram identificados no tratamento 4 (arroz, feijão, alho, cebola e tomate) e associados ao maior teor de e bioacessibilidade de ferro.

O conteúdo de ácido ascórbico no tratamento 2 (arroz, feijão e tomate) (37,96 mg.100g) não se mostrou eficaz para promover a absorção de ferro, bem como o conteúdo de cisteína nos tratamentos 2 ($6,07 \mu\text{g.g}^{-1}$) e 3 (arroz, feijão, alho e cebola) ($5,81 \mu\text{g.g}^{-1}$) não se mostrou eficaz para aumentar a absorção de ferro.

O teor de zinco total entre os tratamentos ficou próximo e a bioacessibilidade não diferiu significativamente, sugerindo que a quantidade de ácido ascórbico e cisteína presentes na composição não foram suficientes para promover aumento na bioacessibilidade.

Referências

- ACCIOLY, E.; LACERDA, E.M.A.; ENGSTROM, E.M. **Aspectos fisiopatológicos e epidemiológicos da deficiência de Ferro**. In: RAMALHO, A. Fome Oculta: diagnóstico, tratamento e prevenção. Editora Atheneu, 2009. Capítulo 2.2, 3343p.
- ACKLAND, M. L; MCARDLE, H. J. Significance of extracellular zinc-binding ligands in the uptake of zinc by human fibroblasts. **Journal of Cellular Physiology**, v.145, p.409–413, 1990.
- AGTE, V.V.; TARWADI, K.V.; CHIPLONKAR, S.A. Phytate degradation durin traditional cooking: significance of the phytic acid profile in cereal-based vegetarian meals. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.12, p.161–167, 1999.
- ALCÂNTARA, B.K.; RIZZI, V.; GAZIOLA, S.A.; AZEVEDO, R.A. Soluble amino acid profile, mineral nutrient and carbohydrate content of maize kernels harvested from plants submitted to ascorbic acid seed priming. **Academia Brasileira de Ciências**, v.89, p.695-704, 2016.
- ANTON, A. A. et al. Effect of pre-dehulling treatments on some nutritional and physical properties of navy and pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p.771-778, 2008.
- BAKIRDERE, S.; BRAMANTI, E.; D'ULIVO, A.; ATAMAN, O.Y.; MESTER, Z. Speciation and determination of thiols in biological samples using high performance liquid chromatography – inductively coupled plasma-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography – Orbitrap MS. **Analytica Chimica Acta**, v.680, p. 41–47, 2010.
- BALD, E.; CHWATKO, G.; GLOWACKI, R.; KUŚMIEREK, K. Analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v.1032, p.109–115, 2004.
- BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L. Antioxidant Activity of Extracts, Condensed Tannin Fractions, and Pure Flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. Seed Coat Color Genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7879-7883, 2003.
- BIELESKI, R.L.; TURNER, N.A. Separation and Estimation of Amino Acids in Crude Plant Extracts by Thin-Layer Electrophoresis and Chromatography, Fruit Research Division. **Analytical Biochemistry**, v.17, p.278-293, 1966.
- BOUIS, H.E.; WELCH, R.M. Biofortification—A Sustainable Agricultural Strategy for Reducing Micronutrient Malnutrition in the Global South. **Crop Science**, v.50, p.20-32, 2010.

- BRESOLIN, J.D.; HUBINGER, S.Z. Metodologia para determinação de ácido ascórbico em sucos de citrus utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Simpósio Nacional de Instrumentação Agrícola (SIAGRO). **Anais do SIAGRO: ciência, inovação e mercado, Embrapa Instrumentação**, 2014. p. 497-500. 2014.
- BRIGIDE, P.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Antinutrients and *in vitro* availability of iron in irradiated common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Chemistry**, v. 98, p. 85-89, jan. 2006.
- BRUNE, M.; ROSSANDER-HULTHÉN, L.; HALLBERG, L.; GLEERUP, A.; SANDBERG, A. S. Iron absorption from bread in humans - inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. **Journal of Nutrition**, v.122, p.442-449, 1992.
- CHIOCCHETTI, G.M. **Potencial de utilização de subprodutos agroindustriais na alimentação: estudo da disponibilidade de nutrientes**. 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- CLYDESDALE, F.M.; HO, C.T.; LEE, C.Y.; MONDY, N.I.; SHEWFELT, R.L. The effects of postharvest treatment and chemical interactions on the bioavailability of ascorbic acid, thiamin, vitamin A, carotenoids, and minerals. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.30, p.599-638, 1991.
- COZZOLINO, S.M.F.; MICHELAZZO, F.B. **Biodisponibilidade: conceitos, definições e aplicabilidade**. Editora Manole. 3ª edição, Capítulo 1, 2009. 3-11p.
- COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Editora Manole, 5ª edição, revisada e atualizada, 2016. 878p.
- DAVIDSSON, L.; WALCZYK, T.; ZAVALITA, N.; HURRELL, R.F. Improving iron absorption from a Peruvian school breakfast meal by adding ascorbic acid or Na₂EDTA. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.283–287, 2001
- DELFINO, R.A.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Interação de polifenóis e proteínas e o efeito na digestibilidade proteica do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Pérola. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p.401-407, 2008.
- DE MEJÍA, E. G.; GUZMÁN-MALDONADO, S.H.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; REYNOSO-CAMACHO, R.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, E.; PONS-HERNÁNDEZ, J.L.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.M.; CASTELLANOS, J.Z.; KELLY, J.D. Effect of Cultivar and Growing Location on the Trypsin Inhibitors, Tannins, and Lectins of Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Grown in the Semiarid Highlands of Mexico. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 20, p. 5962-5966, 2003.

- DÍAZ, A.M.; CALDAS, G.V.; BLAIR, M.W. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. **Food Research International**, v.43, p.595-601, 2010.
- DÍAZ-BATALLA, L. et al. Chemical Components with Health Implications in Wild and Cultivated Mexican Common Bean Seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2045-2052, 2006.
- DIAZ, M.; ROSADO, J.L.; ALLEN, L.H.; ABRAMS, S.; GARCÍA, O.P. The efficacy of a local ascorbic acid-rich food in improving iron absorption from Mexican diets: a field study using stable isotopes. **American Journal Clinical Nutrition**, v.78, p.436-440, 2003.
- EVERETTE, J.D.; BRYANT, Q.M.; GREEN, A.M.; ABBEY, Y.A.; WANGILA, G.W.; WALKER, R.B. Through study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58. p.8; 139-148, 2010.
- FANTINI, A.P., CANNIATTI-BRAZACA, S.G., SOUZA, M.C., MANSI, D.N. Disponibilidade de ferro em misturas de alimentos com adição de alimentos com alto teor de vitamina C e de cisteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.435-439, 2008.
- GAUTAM, S., PLATEL, K., SRINIVASAN, K. Higher Bioaccessibility of Iron and Zinc from Food Grains in the Presence of Garlic and Onion. **Food Chemistry**, v.58, p.8426-8429, 2010.
- GAUTAM, S., PLATEL, K., SRINIVASAN, K. Influence of combinations of promoter and inhibitor on the bioaccessibility of iron and zinc from food grains. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.62, p.826-834, 2011.
- GLAHN, R.P.; WORTLEY, G.M.; SOUTH, P.K.; MILLER, D.D. Inhibition of Iron Uptake by Phytic Acid, Tannic Acid, and ZnCl₂: Studies Using an *In Vitro* Digestion/Caco-2 Cell Model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.390-395, 2002.
- GUTIÉRREZ-QUEQUEZANAA, L.; VUORINENA, A.L.; KALLIOA, H.; YANG, B. Improved analysis of anthocyanins and vitamin C in blue-purple potato cultivars. **Food Chemistry**, v.242, p.217-224, 2017.
- HELBIG, E.; BUCHWEITZ, M.R.D.; GIGANTE, D.P. Análise dos teores de ácidos cianídrico e fítico em suplemento alimentar: multimistura. **Revista de Nutrição**, v.21, p.323-328. 2008.
- HOU, S.; HE, H.; ZHANG, W.; XIE, H.; ZHANG, X. Determination of soil amino acids by high performance liquid chromatography-electro spray ionization-mass spectrometry derivatized with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. **Talanta**, v.80, p.440-477, 2009.
- HURRELL, R.F. Bioavailability of iron. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.51, p.S4-S8, 1997.

- HURRELL, R.F. Phytic acid degradation as a means of improving iron absorption. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.74, p.445-452, 2004.
- IYENGAR, V.; PULLAKHANDAM, R.; NAIR, K.M. Dietary Ligands as Determinants of Iron–Zinc Interactions at the Absorptive Enterocyte. **Journal of Food Science**, v.75, p.260-264, 2010.
- JIN, F.; FROHMAN, C.; THANNHAUSER, T.W.; WELCH, R.M.; GLAHN, R.P. Effects of ascorbic acid, phytic acid and tannic acid on iron bioavailability from reconstituted ferritin measured by an *in vitro* digestion–Caco-2 cell model. **British Journal of Nutrition**, v.101, p.972–981, 2009.
- JOSEPH, E.; SWANSON, B.G. Growth and nitrogen retention of rats fed bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and bean and rice diets. **Food Research International**, v.26, p.261-269, 1993.
- KHAN, A.; FAIZ, F. Amino acid analysis using ion exchange resins, **Journal of Natural Sciences and Mathematics**, v.48, p.1–17, 2008.
- KOZLOWSKA, H.; HONKE, J.; SADOWSKA, J.; FRÍAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C. Natural fermentation of lentils: influence of time, concentration and temperature on the kinetics of hydrolysis of inositol phosphates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.71, p.367–375, 1996.
- KUBEC, R.; DADÁKOVÁ, E. Chromatographic methods for determination of S-substituted cysteine derivatives—A comparative study. **Journal of Chromatography**, v.1216, p.6957–696, 2009.
- KUMAR, V.; SINHA, A.K.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Dietary roles of phytate in human nutrition: a review. **Food Chemistry**, v.120, p.945-959. 2010.
- LA FRANO, M.R.; DE MOURA, F.F.; BOY, E.; LÖNNERDAL, B.; BURRI, B.J. Bioavailability of iron, zinc and provitamin A carotenoids in biofortified staple crops. **Nutrition Review**, v.72, p.289-307, 2014.
- LAJOLO, F.M. GENOVESE, M.I. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.6592-6598, 2002.
- LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1313-1315, 1980.
- LAYRISSE, M.; GARCIA-CASAL, M. N.; SOLANO, L.; BARON, M. A.; ARGUELLO, F.; LLOVERA, D.; RAMIREZ, J.; LEETS, I.; TROPPER, E. Iron bioavailability in humans from breakfasts enriched with iron bisglycine chelate, phytates and polyphenols. **Journal of Nutrition**, v.130, p.2195-2199, 2000.

- LEE, S. K., KADER, A. A.; Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, v.20, p.207– 220, 2000.
- LIANG, J.; HAN, B.Z.; NOUT, M. J. R.; HAMER, R. J.; *In vitro* solubility of calcium, iron and zinc in relation to phytic acid levels in rice-based consumer products in China. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.61, p.40-51, 2010.
- LUO, Y., XIE, W., CUI, Q., Effects of phytases and dehulling treatments on *in vitro* iron and zinc bioavailability in Faba Bean (*Vicia faba* L.) Flour and Legume Fractions. **Journal of Food Science**, v.75, p.191-198, 2010.
- LUJÁN, D.L.B.; LEONEL, A.J.; BASSINELO, P.K.; COSTA, N.M.B.; Variedades de feijão e seus efeitos na qualidade proteica, na glicemia e nos lipídios sanguíneos em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28. p.142-149, 2008.
- MAGA, J.A. Phytate: Its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance and methods of analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.30, p.1-9, 1982.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of clinical Nutrition**, v.79, p.727-747, 2004.
- MARERO, L.M.; PAYUMO, E.M.; AGUINALDO, A.R.; HOMMA, S. Maltooligosaccharide composition of flours, weaning foods and gruels prepared from germinated rice, corn, mungbean and cowpea. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.36. 55-64. 1990.
- MARŠIČ, N.K.; OSVALD, J.; JAKŠE, M. Evaluation of ten cultivars of determinate tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.), grown under different climatic conditions. **Acta Agriculturae Slovenica**, v.85, p.321-328, 2005
- MARTELL, A. E; SMITH, R. M. **Critical Stability Constants, Amino Acids**. Plenum Press, v.1, 1974.
- MARTINEZ-TORRES, C.; ROMANO, E.; LAYRISSE, M. Effect of cysteine on iron absorption in man. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.34, p.322-327, 1981.
- MARTINI, F.C.C. **Comparação entre a disponibilidade de ferro na presença de vitamina A e beta-caroteno em alimentos e medicamentos**. 2002. 113p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- MKANDA, A.V.; MINNAR, A.; KOCK, H.L. Relating consumer preferences to sensory and physicochemical properties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.87, p.2868-2879, 2007.

- MOURA, N.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; SPOTO, M.H.F.; ARTHUR, V. Avaliação sensorial de feijão preto submetido à radiação de Cobalto-60. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.370-374, 2005.
- OLIVEIRA, A. C.; QUEIROZ, K.S.; HELBIG, E.; REIS, S.M.; CARRARO, F. O processamento doméstico do feijão comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência rafinose, estaquiose e verbascose. **Archives Latinoamericanas de Nutrición**, v.51, p.276-283, 2001.
- OLIVEIRA, A.C.; REIS, S.M.P.M.; CARVALHO, E.M.; PIMENTA, F.M.V.; RIOS, K.R.; PAIVA, K.C.; SOUSA, L.M.; ALMEIDA, M; ARRUDA, S.F. Adições crescentes de ácido fítico à dieta não interferiram na digestibilidade da caseína e no ganho de peso em ratos. **Revista de Nutrição**, v.16, p.211-217, 2003.
- ORTIZ, R.; CROSSA, J.; VARGAS, M.; IZQUIERDO, J. Studying the effect of environmental variables on the genotype environment interaction of tomato. **Euphytica**, v.153, p.119-134, 2007.
- PARIPATANANONT, T.; LOVELL, R. T. Chelated zinc reduces the dietary requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v.133, p.73–82, 1995.
- PETERSON, D.G.; BOEHM, K.S.; STACK, S.M. Isolation of Milligram Quantities of Nuclear DNA from Tomato (*Lycopersicon esculentum*), A Plant Containing High Levels of Polyphenolic Compounds. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.15, p.148-153, 1997.
- PHILLIPPY, B.Q.; JOHNSTON, M.R.; TAO, S.H.; FOX, M.R.S. Inositol phosphates in processed foods. **Journal of Food Science**, v.53, p.496-499, 1988.
- PRICE, M.L.; HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Tannin content of cowpeas, chickpeas, pigeon peas and mung beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.28, p.459-461, 1980.
- RABOY, V. Myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. **Phytochemistry**, v.64, p.1033-1043, 2003.
- RAMÍREZ-CÁRDENAS, L.; LEONEL, A.J.; COSTA, N.M.B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.200-213, 2008.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; FONTES, JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p.771-780, 2004.
- SANDBERG, A.S. Bioavailability of minerals in legumes, **British Journal of Nutrition**, v.88, p.281-285, 2002.

- SANT'ANA, L.F.R.; COSTA, N.M.B; OLIVEIRA, M.G.A.; GOMES, M.R.A. Valor nutritivo e fatores antinutricionais de multimisturas utilizadas como alternativa alimentar. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.3, p.129-135, 2000.
- SHARMA, A.; KAPOOR, A.S. Effects of various types of fermentation on in vivo protein and starch digestibility of different processed pearl millet. **Nahrung**, v.40, p.142-145. 1994.
- SHIMELIS, E. A.; RAKSHIT, S. K. Effect of processing on antinutrients and *in vitro* protein digestibility of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. **Food Chemistry**, v.103, p.161-172, 2007.
- SILVA, A.G.; ROCHA, L.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Caracterização físico-química, digestibilidade protéica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição**, v.20, p.591-598, 2009.
- SKOGLUND, E.; CARLSSON, N.G.; SANDBERG, A.S. Determination of isomers of inositol mono- to hexaphosphates in selected foods and intestinal contents using high-performance ion chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.431–436, 1997.
- SPÍNOLA, V.; EULOGIO J. LORENT- MARTÍNEZ, E. J.; CASTILHO, P. C. Determination of vitamin C in foods: Current state of method validation. **Journal of Chromatography A**, v.1369, p.2–17, 2014.
- STANA, M.; SORANA, M. L.; MARUTOIUB, C. Extraction and HPLC Determination of the Ascorbic Acid Content of Three Indigenous Spice Plants. **Journal of Analytical Chemistry**, v.69, p.998–1002, 2014.
- TOGNON, A.L. **Quantificação e avaliação da bioacessibilidade *in vitro* de micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais**. 2012. 108f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- USAGA, J.; MANNS, D.C.; MORARU, C.I.; WOROBO, R.W.; PADILLA-ZAKOUR, O.I. Ascorbic acid and selected preservatives influence effectiveness of UV treatment of apple juice. **Food Science and Technology**, v.75, p.9-16, 2016.
- USDA. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28, 2016. Disponível em <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3223?manu=&fgcd=&ds=>, acesso em 10 de abril de 2018.
- USDA. National Nutrient Database for Standard Reference, Release v0.0, Março, 2018. Disponível em <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/nutrients/report?nutrient1=507&nutrient2=&nutrient3=&fg>

=20&max=25&subset=0&offset=75&sort=f&totCount=141&measureby=g>, acesso em 11 de abril de 2018.

- WAPNIR, R. A.; GARCIA-ARANDA, J. A.; MEVORACH, D. E. K.; LIFSHITZ, F. Differential absorption of zinc and low-molecular weight ligands in the rat gut in protein-energy malnutrition. **Journal of Nutrition**, v.115, p.900–908, 1985.
- WAPNIR, R. A.; KHANI, D. E.; BAYNE, M. A.; LIFSHITZ, F. Absorption of zinc by the rat ileum: effects of histidine and other lowmolecular-weight ligands. **Journal of Nutrition**, v.113, p.1346–1354, 1983.
- WELCH, R.M. Making harvest more nutritious. **Agricultural Research**, v.47, p.4-6, 1999.
- ZIPJ, I.M.; TIJBURG, L.B.M. Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. **Food Science and Nutrition**, v.40, p.371-398, 2000.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação ao ferro, os tratamentos que continham tomate, apresentaram maior teor de ferro, devido ao fruto conter boa quantidade de ácido ascórbico, porém em termos de bioacessibilidade somente a mistura com arroz, feijão, alho, cebola e tomate obteve formação de ferritina maior e, conseqüentemente a taxa de bioacessibilidade mais elevada. Tal resultado pode ser explicado devido a este tratamento conter maior teor de ácido ascórbico ou por estar combinado com outro promotor, no caso a cisteína. Quanto aos inibidores, o ácido fítico influenciou o teor de ferro, comprovando dados da literatura que o classificam como agente quelante de ferro. Em síntese, a resposta obtida neste estudo para ferro corresponde ao objetivo proposto que era ofertar alimentos na mesma refeição que promovessem a absorção do mineral.

Os resultados de zinco nesse estudo não são conclusivos, pois os teores totais e a bioacessibilidade ficaram próximos entre os tratamentos. São necessários mais estudos em relação à absorção de zinco que abranjam a descoberta de alimentos com potencial de aumentar a absorção deste micronutriente, bem como a quantidade necessária do composto bioativo para provocar tal efeito.

O estudo de bioacessibilidade se revela importante, pois confirma que a matriz alimentar e os processos que envolvem o preparo dos alimentos, como cocção e maceração, influenciam a taxa de absorção dos minerais na dieta. Além do conteúdo de compostos bioativos ou nutrientes presentes nos alimentos não está integralmente disponível para absorção pelo organismo, refletindo diretamente nos seus efeitos benéficos à saúde do consumidor.