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

Bioacessibilidade de ferro na farinha de trigo com adição de ácido ascórbico
proveniente de subprodutos de frutas

Talita Costa Negri

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

Piracicaba
2018

Talita Costa Negri
Bacharela em Ciências dos Alimentos

Bioacessibilidade de ferro na farinha de trigo com adição de ácido ascórbico proveniente
de subprodutos de frutas

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

Negri, Talita Costa

Bioacessibilidade de ferro na farinha de trigo com adição de ácido ascórbico proveniente de subprodutos de frutas / Talita Costa Negri. - - Piracicaba, 2018.

87 p.

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

1. Minerais 2. Microencapsulação 3. Spray drying 4. Coacervação complexa 5. Vitamina C 6. Anemia I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me proporcionar tantas bênçãos, inclusive a de estudar em uma universidade maravilhosa como a ESALQ.

Agradeço meus pais pela educação que me foi dada, minha irmã, meu namorado, pelo apoio nos momentos de dificuldade, por não me deixarem desistir. Agradeço os meus primos e primas que me distraíram e animaram nos períodos de cansaço.

Agradeço minha orientadora profa. Dra. Solange Brazaca, por ter me orientado desde o período da graduação, pela sua paciência e generosidade durante todos esses anos. Sou muito grata professora!

Agradeço às profas. Dra. Carmem Fávaro-Trindade da USP-FZEA, Dra. Talita Aline Comunian da USP-FZEA, Dra. Carla Botolli da UNICAMP pela recepção em seus laboratórios e por toda a ajuda que me ofereceram, com muita paciência e dedicação.

Agradeço à profa. Dra. Sônia Piedade da USP-ESALQ pelo auxílio na análise dos dados estatísticos e delineamento experimental.

Agradeço os docentes da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN), aos técnicos de laboratórios e aos secretários do LAN. Obrigada por auxiliar sempre que precisei.

Agradeço minhas amigas e amigos queridos e companheiros – Jessica, Flávia, Larissa, Amanda, José Eduardo. Compartilhamos alguns fins de semana no laboratório, angústias, medos e felicidade. Obrigada por tudo, principalmente pelo companheirismo de sempre, pelos conselhos, risadas e comemorações.

Agradeço minhas companheiras de trabalho no Cepea, que me entenderam e sempre me ajudaram neste período. Obrigada em especial a Profa. Dra. Mirian Bacchi, que confia no meu trabalho e responsabilidade.

Agradeço todos os membros da banca examinadora pelas contribuições que enriqueceram este trabalho.

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

Agradeço à todos que fizeram meus dias mais leves durante esses longos sete anos de ESALQ.

EPÍGRAFE

A verdadeira motivação vem de realização, desenvolvimento pessoal, satisfação no trabalho e reconhecimento.

Frederick Herzberg

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
REFERÊNCIAS.....	14
2. OBJETIVO GERAL	17
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS	19
3.1.1. Subprodutos de abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L. Merrill)	19
3.1.2. Subprodutos de mamão (<i>Carica papaya</i> L.).....	20
3.1.3. Aproveitamento dos subprodutos agroindustriais.....	20
3.2. VITAMINA C	21
3.3. LIOFILIZAÇÃO OU FREEZE DRYING	22
3.4. TECNOLOGIA DE MICROENCAPSULAÇÃO	23
3.4.1. Secagem por atomização ou spray drying.....	25
3.4.2. Emulsão dupla seguida da coacervação complexa.....	27
3.4.3. Polímeros mais utilizados nos processos de microencapsulação	28
3.4.4. Aplicações da microencapsulação	28
3.5. BIOACESSIBILIDADE DOS NUTRIENTES	29
3.5.1. Ferro e sua bioacessibilidade	30
3.5.2. Promotores da absorção do ferro não-heme.....	31
3.5.3. Inibidores da absorção do ferro não-heme	31
3.5.4. Anemia ferropriva	32
3.6. FARINHA DE TRIGO	33
REFERÊNCIAS.....	34
4. MICROENCAPSULAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO EXTRAÍDO DE SUBPRODUTOS DE FRUTAS	45
RESUMO.....	45
ABSTRACT	45
4.1. INTRODUÇÃO	46
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.2.1. Material.....	47
4.2.2. Métodos.....	48
4.2.2.1. Liofilização e moagem das cascas	48
4.2.2.1.1. Umidade das farinhas de subprodutos de frutas.....	48
4.2.2.2. Obtenção do extrato das farinhas de subprodutos de frutas	48
4.2.2.3. Quantificação de ácido ascórbico por CLAE	48
4.2.2.3.1. Quebra das micropartículas coacervadas	49
4.2.2.3.2. Rendimento das micropartículas secas por atomização	50
4.2.2.4. Microencapsulação do extrato líquido da farinha de subprodutos de mamão	50
4.2.2.4.1. Secagem por atomização ou spray drying.....	50
4.2.2.4.2. Microencapsulação por emulsão dupla seguida da coacervação complexa	51
4.2.2.5. Desidratação do extrato através da liofilização	53
4.2.2.6. Caracterização dos tratamentos.....	53
4.2.2.6.1. Umidade	53
4.2.2.6.2. Atividade de água (Aw).....	54
4.2.2.6.3. Solubilidade.....	54
4.2.2.6.4. Higroscopicidade	54

4.2.2.6.5. Análises morfológicas	54
4.2.2.6.5.1. Microscopia óptica.....	54
4.2.2.6.5.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	55
4.2.2.6.6. Tamanho das micropartículas.....	55
4.2.2.7. Análises estatísticas.....	55
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.3.1. <i>Processamento das cascas, liofilização e obtenção das farinhas</i>	56
4.3.2. <i>Quantificação de ácido ascórbico por CLAE</i>	57
4.3.3. <i>Caracterização das micropartículas e extrato desidratado</i>	61
4.3.4. <i>Análises morfológicas</i>	64
4.3.5. <i>Tamanho das partículas</i>	67
4.4. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	69
5. BIOACESSIBILIDADE DO FERRO NA FARINHA DE TRIGO COM ADIÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO.....	73
RESUMO	73
ABSTRACT	73
5.1. INTRODUÇÃO	74
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS	76
5.2.1. <i>Material</i>	76
5.2.2. <i>Métodos</i>	76
5.2.2.1. Digestão in vitro	77
5.2.2.2. Cultivo das células intestinais humanas Caco-2	78
5.2.2.3. Fase experimental.....	79
5.2.2.4. Análise de ferritina	80
5.2.2.5. Análise de proteína.....	80
5.2.2.6. Análises estatísticas.....	80
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.4. CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	83
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87

RESUMO

Bioacessibilidade de ferro na farinha de trigo com adição de ácido ascórbico proveniente de subprodutos de frutas

A nutrição é essencial na promoção da saúde da população para estimular o crescimento e desenvolvimento adequado, sendo necessário o planejamento de ações e programas em saúde pública. A falta ou consumo inadequado dos nutrientes pode desencadear distúrbios fisiológicos que levam a doenças. Com o objetivo de prevenir a anemia ferropriva devido à elevada incidência de deficiência de ferro, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil criou uma resolução para que as farinhas de trigo e milho sejam adicionadas de ferro (Fe) e ácido fólico. Na dieta é possível encontrar dois tipos de ferro, sendo o ferro-heme e o ferro não-heme. O ferro heme é bem absorvido pelo organismo e pouco influenciado pelas reservas de Fe ou outros constituintes da dieta. Já o ferro não-heme apresenta variado grau de absorção, dependente de outros componentes da dieta e das reservas de Fe dos indivíduos. Estudos que testam a bioacessibilidade dos nutrientes têm sido realizados para avaliar a quantidade de nutrientes que é liberada da matriz alimentar no processo de digestão e está disponível para ser absorvida pelo intestino, utilizando a simulação do processo de digestão gastrointestinal aliada as culturas de células Caco-2. Os hábitos saudáveis estimulam o consumo de frutas e vegetais, aumentando também a produção de subprodutos agroindustriais como cascas, sementes, caroço e bagaço que são ricos em vitaminas, minerais, fibras e compostos antioxidantes necessários para funções fisiológicas. O aproveitamento de subprodutos agroindustriais para a obtenção de nutrientes vem sendo aplicado na elaboração de diversos produtos alimentícios, como barras nutritivas e hambúrgueres enriquecidos. O ácido ascórbico pode ser encontrado em subprodutos agroindustriais, mas, por ser instável e muito suscetível a oxidação necessita da aplicação de técnicas como a microencapsulação e liofilização para a preservação do composto. Além disso, o ácido ascórbico quando ingerido juntamente com o ferro não-heme possibilita aumento na absorção deste mineral. O objetivo deste trabalho foi extrair ácido ascórbico de subprodutos agroindustriais, aplicar a tecnologia de microencapsulação (spray drying e emulsão dupla seguida da coacervação complexa) e liofilização a este extrato e adicioná-lo na farinha de trigo comercial, observando a bioacessibilidade do ferro presente na farinha no final deste processo. Primeiramente, foram obtidas farinhas de frutas a partir dos subprodutos de mamão e abacaxi liofilizados. Foi extraído o ácido ascórbico das farinhas das frutas, o qual foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O extrato de mamão foi liofilizado e microencapsulado, pelos métodos de spray drying e emulsão dupla seguida da coacervação complexa. Os tratamentos obtidos foram: micropartículas secas por atomização na proporção 1:1 (T1), micropartículas secas por atomização na proporção 1:2 (T2), micropartículas secas por atomização na proporção 1:3 (T3), micropartículas obtidas por emulsão dupla seguida da coacervação complexa com 50% de emulsão extrato líquido + óleo de milho em relação ao polímero (T4), micropartículas obtidas por emulsão dupla seguida da coacervação complexa com 75% de emulsão extrato líquido + óleo de milho em relação ao polímero (T5) e extrato da farinha de subprodutos de mamão liofilizado (T6). Foram realizadas análises de caracterização tratamentos: umidade, atividade de água, solubilidade, higroscopicidade, análises morfológicas, teor de ácido ascórbico, tamanho das partículas. Para avaliar a bioacessibilidade de ferro, realizou-se o processo de digestão das amostras com a farinha de trigo e o cultivo de células Caco-2, no final do processo o material digerido foi fornecido as células. A bioacessibilidade do ferro foi mensurada pela ferritina. Como resultados, o extrato da farinha de subprodutos de mamão apresentou maior concentração de ácido ascórbico ($p < 0,05$) sendo selecionado para as próximas etapas (microencapsulação e teste in vitro). Os resultados para umidade (inferiores a 13%) e atividade de água (inferiores a 0,3) mostraram segurança para todos os tratamentos quanto ao crescimento microbiológico. Os tratamentos obtidos por spray drying mostraram-se mais solúveis quando comparados aos coacervados e ao extrato liofilizado ($p < 0,05$). O extrato liofilizado de mamão apresentou a maior concentração de ácido ascórbico ($p < 0,05$) e maior higroscopicidade ($p < 0,05$) quando comparado aos outros tratamentos. Quanto a morfologia, os tratamentos apresentaram diferenças principalmente devido à técnica aplicada e aos materiais utilizados. Para a bioacessibilidade do mineral presente na farinha de trigo, o teor médio de ferritina formado variou entre 0,02 e 1,19 ng por mg de proteína. Não houve diferenças significativas positivas dos tratamentos realizados em relação a farinha de trigo comercial ($p < 0,05$). Como conclusão, foi possível extrair o ácido ascórbico de subprodutos agroindustriais e aplicar a microencapsulação e liofilização a este extrato sem grandes

perdas do composto para alguns tratamentos. Quanto aos ensaios de bioacessibilidade, pode-se concluir que enriquecer a farinha de trigo com ácido ascórbico nas condições e proporções utilizadas neste estudo não foram suficientes para aumentar a bioacessibilidade do ferro presente na farinha de trigo comercial.

Palavras-chave: Minerais; Microencapsulação; Spray drying; Coacervação complexa; Vitamina C; Anemia

ABSTRACT

Bioaccessibility of iron in wheat flour with addition of ascorbic acid from fruit by-products

Nutrition is essential for the promotion of the health of populations in order to encourage the adequate growth and development, turning necessary the planning of public health actions and programs. The lack or the inadequate consumption of nutrients can cause physiological disorders that leads to diseases. With the objective of preventing the anemia occurred due to the elevated incidence of iron deficiency, the Brazilian Health Regulatory Agency has created a resolution for the addition of iron and folic acid in wheat and corn flours. In the diet, it is possible to find two types of iron: heme iron and non-heme iron. The heme iron is well absorbed by the organism and is minimally influenced by the iron reserves and other components of the diet. On the other hand, the non-heme iron presents variable degrees of absorption being dependent of the other components of the diet and the iron reserves of the individuals. Studies that test the bioaccessibility of nutrients have been conducted in order to evaluate the quantity of nutrients that are released from the food matrix in the digestive process and are available to be absorbed by the intestine, using simulations of gastrointestinal digestion processes allied to cultures of Caco-2 cells. The healthy habits encourage the consumption of fruits and vegetables, also increasing the production of fruit by-products, such as peels, seeds, cores, and bagasses which are rich in vitamins, minerals, fibers, and antioxidant compounds that are necessary for physiological functions. The exploitation of fruit by-products for the obtainment of nutrients have been applied in the elaboration of various food products, such as nutrition bars and enriched burgers. The ascorbic acid can be found in fruit by-products and because it is unstable and very susceptible to oxidation, it requires the application of techniques for the preservation of the compound, such as microencapsulation and lyophilization. Moreover, when the ascorbic acid is ingested together with the non-heme iron it allows an increase in the absorption of this mineral. The objective of this work was to extract ascorbic acid from fruit by-products, apply the microencapsulation (spray drying and double emulsion followed by complex coacervation) and lyophilization techniques to it, and add it to the commercial wheat flour, to observe the bioaccessibility of the iron in the end of the process. First, flours were obtained from lyophilized papayas and pineapples by-products. The ascorbic acid was extracted from the flours and it was quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The papaya extract was microencapsulated by the methods of spray drying and complex coacervation, and lyophilized. The treatments obtained were: spray dried microparticles in the ratio 1:1 (T1), spray dried microparticles in the ratio 1:2 (T2), spray-dried microparticles in the ratio 1:3 (T3), microparticles obtained by double emulsion followed by complex coacervation with 50% emulsion liquid extract + corn oil in relation to the polymer (T4), microparticles obtained by double emulsion followed by complex coacervation with 75% emulsion liquid extract + corn oil in relation to the polymer (T5) and lyophilized extract of papaya by-products flour (T6). Characterization analyses of the treatments were performed: humidity, water activity, solubility, hygroscopicity, morphological analyses, ascorbic acid content and particle size. For the evaluation of the bioaccessibility, the process of digestion of the treatments together with the wheat flour was performed by the cultivation of Caco-2 cellular tissues; at the end of the process the material digested was given to the cells. The bioaccessibility of the iron was measured by the ferritin. As results, the papaya lyophilized extract presented a higher concentration of ascorbic acid ($p < 0.05$), being selected for the next stages (microencapsulation and in vitro test). The results for humidity (less than 13%) and water activity (less than 0.3) showed microbiological security for all treatments. The treatments obtained by spray drying was more soluble when compared to the coacervated treatments and to the lyophilized extracts ($p < 0.05$). The papaya lyophilized extract present higher concentration of ascorbic acid ($p < 0.05$), and higher hygroscopicity ($p < 0.05$) when compared to the other treatments. Regarding the morphology, the treatments presented differences mainly due to the technique applied, the used materials and the particle size. For the bioaccessibility of the mineral, the mean content of ferritin ranged from 0.02 to 1.19 ng per mg of protein. There were no positively significant differences in the treatments conducted in relation with the commercial wheat flour ($p < 0.05$). In conclusion, it was possible to extract ascorbic acid from fruit by-products and apply the microencapsulation and lyophilization to this extract, keeping the ascorbic acid levels for some treatments. In terms of the bioaccessibility experiments, it can be concluded that enhancing the wheat flour with ascorbic acid in the conditions and proportions used in this study is not enough to increase the bioaccessibility of the iron present in the commercial wheat flour.

Keywords: Minerals; Microencapsulation; Spray drying; Complex coacervation; Vitamin C; Anemia

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURAS DAS MICROESFERAS E MICROCÁPSULAS (COMUNIAN E FAVARO-TRINDADE, 2016).	24
FIGURA 2. FORMAS QUE AS MICROPARTÍCULAS PODEM SE APRESENTAR (GIBBS ET AL., 1999).	24
FIGURA 3. ESQUEMA DO MÉTODO DE SECAGEM POR SPRAY DRYING (COMUNIAN E FAVARO-TRINDADE, 2016).	26
FIGURA 4. ESQUEMA DA MICROENCAPSULAÇÃO POR COACERVAÇÃO COMPLEXA (COMUNIAN E FAVARO-TRINDADE, 2016).	27
FIGURA 5. PRODUÇÃO DE GRÃOS DE TRIGO EM TONELADAS PELO BRASIL – ANOS SAFRA 2000/2017 (IBGE, 2017).	34
FIGURA 6. EQUAÇÃO REFERENTE AO CÁLCULO DO RENDIMENTO MÉDIO POR TRATAMENTO.	50
FIGURA 7. FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS COACERVADAS.	52
FIGURA 8. EQUAÇÃO DO CÁLCULO DE SOLUBILIDADE.	54
FIGURA 9. MATERIAL UTILIZADO PARA A EXTRAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO.	56
FIGURA 10. PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO LIOFILIZADO DA FARINHA DE SUBPRODUTOS DE MAMÃO.	58
FIGURA 11. PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO LIOFILIZADO DA FARINHA DE SUBPRODUTOS DE ABACAXI.	58
FIGURA 12. PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS POR SPRAY DRYING (T1).	59
FIGURA 13. PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS POR SPRAY DRYING (T2).	60
FIGURA 14. PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS POR SPRAY DRYING (T3).	60
FIGURA 15. PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA COACERVADAS (T4).	60
FIGURA 16. PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA COACERVADAS (T5).	61
FIGURA 17. MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR SPRAY DRYING OBSERVADAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.	65
FIGURA 18. EMULSÃO SIMPLES A/O.	65
FIGURA 19. MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA.	66
FIGURA 20. MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA.	66
FIGURA 21. ESTRUTURA DO EXTRATO DA FARINHA DE SUBPRODUTOS DE MAMÃO LIOFILIZADO NA MAGNITUDE DE 42X.	67
FIGURA 22. DISTRIBUIÇÃO DOS DIÂMETROS DAS PARTÍCULAS SECAS POR ATOMIZAÇÃO DO T1.	68
FIGURA 23. DISTRIBUIÇÃO DOS DIÂMETROS DAS PARTÍCULAS SECAS POR ATOMIZAÇÃO DO T2.	68
FIGURA 24. DISTRIBUIÇÃO DOS DIÂMETROS DAS PARTÍCULAS SECAS POR ATOMIZAÇÃO DO T3.	68
FIGURA 25. CRESCIMENTO DO TECIDO CELULAR CACO-2.	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. TRATAMENTOS APLICADOS NA SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO	51
TABELA 2. CONDIÇÕES DE PROCESSO PARA OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS SECAS POR ATOMIZAÇÃO	51
TABELA 3. TRATAMENTOS REFERENTES A PRODUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA	52
TABELA 4. DESCRIÇÃO DOS TRATAMENTOS PARA CARACTERIZAÇÃO	53
TABELA 5. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO INICIAL (BASE SECA).	57
TABELA 6. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO DOS TRATAMENTOS APLICADOS.	59
TABELA 7. RESULTADOS OBTIDOS NA CARACTERIZAÇÃO DOS TRATAMENTOS	62
TABELA 8. TRATAMENTOS APLICADOS NA DIGESTÃO	77
TABELA 9. TEORES DE FERRITINA FORMADA PELAS CULTURAS CELULARES CACO-2 APÓS 2H HORAS DE INCUBAÇÃO COM MEIO DE CULTURA CONTENDO 25% DA AMOSTRA E 22H DE INCUBAÇÃO COM MEIO BASAL DMEM. VALORES EXPRESSOS EM NG DE FERRITINA POR MG DE PROTEÍNA CELULAR.	81

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A nutrição possui papel fundamental e definitivo na promoção da saúde da população, necessitando de planejamento de ações e programas em saúde pública. Quando a alimentação é nutricionalmente adequada durante a infância e adolescência, ocorre o crescimento e desenvolvimento de acordo com o potencial genético, causando menor risco de doenças na fase adulta e proporcionando melhor qualidade de vida (VELLOZO e FISBERG, 2010).

São necessários ao ser humano 49 nutrientes conhecidos para suprir suas necessidades metabólicas, mas a falta ou o consumo inadequado de um desses elementos pode desencadear alguns distúrbios fisiológicos que levam a doenças, elevação das taxas de mortalidade, rendimento produtivo baixo, retardo mental, crescimento inadequado e outros (OIKEH et al., 2003; LONG et al., 2004; WELCH e GRAHAM, 2004). O ferro (Fe) é um mineral que desempenha diversas funções no organismo, dentre elas, o transporte de oxigênio realizado pela proteína hemoglobina nos eritrócitos e mioglobina nos músculos, participa de reações de oxidação e redução como um carregador de elétrons no citocromo e apresenta-se nas formas Fe^{+2} e Fe^{+3} (HENRIQUES e COZZOLINO, 2009).

Na dieta há dois tipos de ferro, ferro-heme e ferro não-heme, o qual 90% do Fe dos alimentos encontram-se na forma de sais de Fe, forma não-heme, com grau de absorção variável, e na maior parte das vezes baixa, de 1 a 5%, dependente de outros componentes da dieta e das reservas de Fe dos indivíduos. Já os outros 10% estão na forma de Fe heme, provenientes da hemoglobina e mioglobina, forma bem absorvida, sendo pouco influenciado pelas reservas de Fe ou outros constituintes da dieta (CARDOSO, 2006). Frente a importância do Fe na dieta, adotou-se a fortificação das farinhas de trigo e milho no Brasil, visando o aumento da ingestão de Fe, já que estas são empregadas em diversas preparações e consumida pela maior parte da população (BRASIL, 2017; CAFÉ et al., 2003).

Para Antunes e Sgarbieri (1980) quando a vitamina C é ingerida junto ao ferro não-heme, a absorção deste é potencializada, pois o Fe é mantido na forma de quelato solúvel no intestino delgado. Possíveis fontes de vitamina C são os subprodutos do processamento de frutos, como a casca, caroço, sementes e bagaço. Além da vitamina C, estes materiais têm sido reportados como fontes de vitaminas, minerais, fibras e alguns compostos antioxidantes necessários para funções fisiológicas, mas que, na maioria dos casos, são desperdiçados (MATIAS et al., 2005). A produção e o consumo de frutas in natura têm apresentado crescimento, assim como seu mercado de produtos processados como o de sucos, polpas, conservas e frutas minimamente processadas, que oferecem ao consumidor praticidade e vida saudável. Aliado a estes novos hábitos e o crescimento deste mercado, a quantidade de resíduos, que se não tratados/descartados da forma correta podem causar danos ao ambiente.

Estes resíduos acabam gerando problemas ambientais para as agroindústrias, já que estas tem investido no aumento da capacidade de processamento, elevando ainda mais a geração de subprodutos (LOUSADA JUNIOR et al., 2005; SENA e NUNES, 2006). Sendo assim, tem-se realizado pesquisas agregar valor ao sistema reduzindo os problemas ambientais (SAITO et al., 2006).

Como exemplos de aplicação de subprodutos agroindustriais em benefício a saúde humana, tem-se as cascas e de bagaço de abacaxi, utilizadas para obtenção de vitamina C (DA COSTA et al., 2007) e as farinhas de subprodutos de mamão ricas em fibras insolúveis, potássio, cobre, vitamina C e compostos fenólicos (DOS SANTOS et al., 2014). Além destes, outros subprodutos de frutas estão sendo estudados na obtenção de nutrientes. O extrato aquoso da casca da goiaba, fruta tropical, apresentou capacidade protetora das células hepáticas e diminuiu significativamente os níveis de triglicérides, colesterol total (HDL e LDL), sendo considerado um extrato benéfico a pacientes com diabetes tipo II (RAI, MEHTA e WATAL, 2010). Estudos recentes mostram que as cascas de abacate, um fruto de áreas

tropicais, também são ricas em compostos fenólicos (mais de sessenta identificados), o qual demonstra potencial para a exploração pelas indústrias de alimentos e cosméticos (FIGUEIROA et al., 2018).

É indiscutível o aporte de minerais que estes subprodutos apresentam. Na comparação entre polpa e subprodutos de diversas frutas, Chiocchetti et al. (2013) concluíram que a concentração de elementos químicos como o Ca e Zn estavam presentes em maior quantidade nas cascas e sementes quando comparados aos resultados obtidos para polpa.

Os subprodutos agroindustriais, além de beneficiar a saúde, podem ser utilizados pelas indústrias alimentícias para enriquecer a formulação de alguns alimentos, como os subprodutos agroindustriais de abacaxi e manga que foram estudados por Selani et al. (2015), como substitutos de gordura através da incorporação na formulação de hambúrgueres bovinos, os quais favoreceram as propriedades de cozimento e sensoriais dos hambúrgueres.

A romã, uma fruta nativa do Oriente Médio, teve suas cascas liofilizadas estudadas quanto ao potencial antioxidante e antimicrobiano, mostrando-se eficazes contra o crescimento de *Staphylococcus aureus* em estudo realizado por Marchi et al. (2015). Em regiões ibéricas, outras frutas têm sido estudadas quanto ao seu potencial antioxidante e fonte de compostos fenólicos, como o extrato da polpa e semente dos frutos de Crowberries, consumidos localmente, que apresentaram elevada bioacessibilidade destes compostos após ensaio in vitro, principalmente no caso do extrato da semente (ANDRADE, GUINÉ e GONÇALVES, 2017).

São necessários estudos que testem a bioacessibilidade de nutrientes essenciais como o ferro, com o objetivo de auxiliar na absorção destas substâncias adicionadas em produtos de alto consumo tal como a farinha de trigo, contribuindo com a nutrição e saúde humana. Além disso, o aproveitamento de subprodutos agroindustriais para a obtenção de nutrientes, como minerais e compostos antioxidantes, é uma prática que vem sendo aplicada por pesquisadores reduzindo simultaneamente os danos ambientais e os custos que estes subprodutos geram para as empresas.

Os subprodutos agroindustriais como os de mamão e abacaxi apresentam potencial elevado para exploração, tanto para sua incorporação em outros alimentos como a extração de seus compostos. Diante disso, este trabalho sugere o aproveitamento destes subprodutos, para a extração de ácido ascórbico e sua incorporação na farinha de trigo, com o intuito de aumentar a bioacessibilidade do ferro.

Referências

- ANDRADE, S. C.; GUINÉ, R. P. F.; GONÇALVES, F. J. A. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioaccessibility in white crowberry (*Corema album*). **Food Measure**, v. 11, p. 1936-1946, 2017.
- ANTUNES, P. L.; SGARBIERI, V. C. Effect of heat treatment on the toxicity and nutritive value of dry bean (*Phaseolus vulgaris* var. Rosinha G2) proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 5, p. 935-938, 1980.
- BRASIL. Resolução nº 150, de 13 de abril de 2017. Regulamento técnico para o enriquecimento das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico. **Diário Oficial da União, Brasília**, 13 de abril de 2017. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=37&data=17/04/2017>> Acesso em: 10 de maio de 2018.
- CAFÉ, S.L.; DA FONSECA, P. S. M.; AMARAL, G. F.; MOTTA, M. F. dos S. R.; ROQUE, C. A. L.; ORMOND, J. G. P. Cadeia produtiva do trigo. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 18, p. 193-220, 2003.

- CARDOSO, M. A. Ferro. In: CARDOSO, M. A. *Nutrição e metabolismo: **Nutrição Humana***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2. ed., cap. 16, p. 258-275. 2006.
- CHIOCCHETTI, G. de M.; FERNANDES, E. A. de N.; BACCHI, M. A.; PAZIM, R. A.; SARRIE'S, S.R.; TOME, T. M. Mineral composition of fruit by-products evaluated by neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 297, p. 399-404, 2013.
- FIGUEROA, J. G.; BORRÁS-LINARES, I.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; SEGURA-CARRETERO, A. Comprehensive identification of bioactive compounds of avocado peel by liquid chromatography coupled to ultra-high-definition accurate-mass QTOF. **Food Chemistry**, v. 245, p. 707-716, 2018.
- HENRIQUES, G.; COZZOLINO, S. M. F. Ferro. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. Barueri: Manoele, 3. ed, cap. 26, p. 569-596, 2009.
- LONG, J.K.; BAZINGER, M.; SMITH, M.E. Diallel analysis of grain iron and zinc density in southern African-adapted maize inbreds. **Crop Science**, v. 44, p. 2019-2026, 2004.
- LOUSADA JUNIOR, J.E.; NEIVA, J.N.N.; RODRIGUEZ, N.M.; PIMENTEL, J.C.M.P.; LÔBO, R.N.B. Consumo e digestibilidade de subprodutos do processamento de frutas em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n.2, p.659-669, 2005.
- MARCHI, L. B.; MONTEIRO, A. R. G.; MIKCHA, A. R. S.; CHINELLATO, M. M.; MARQUES, D. R.; DACOME, A. S.; COSTA, S. C. Evaluation of antioxidant and antimicrobial capacity of pomegranate peel extract (*Punica Granatum* L.) under different drying temperatures. **The Italian Association of Chemical Engineering**, v. 44, 2015.
- MATIAS, M.F.O.; OLIVEIRA, E.L.; GERTRUDES, E.; MAGALHÃES, M.A. Use of fibers obtained from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) and guava (*Psidium guajava*) fruits for enrichment of food products. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, p.143-150, 2005.
- OIKEH, S.O.; MENKIR, A.; MAZIYA-DIXON, B.; WELCH, R.; GLAHN, R.P. Assessment of concentrations of iron and zinc and bioavailable iron in grains of early-maturing tropical maize varieties. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 51, p. 3688- 3694. 2003.
- RAI, P. K.; MEHTA, S.; WATAL, G. Hypolipidaemic & hepatoprotective effects of *Psidium guajava* raw fruit peel in experimental diabetes. **Indian Journal of Medical Research**, v. 131, p. 820-824, 131, 2010.
- SAITO, I.; CABELO, C.; FUKUSHIMA, R. S. Caracterização das fibras do farelo de mandioca residual após tratamento hidrotérmico. **Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2006.
- SELANI, M.M.; MARGIOTTA, G.B.; PIEDADE, S.M.S.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Physicochemical, sensory and cooking properties of low fat beef burgers with addition of fruit byproducts and canola oil. **International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering**, p. 58–65, 2015.
- SENA, R.F.; NUNES, M.L. Utilização de resíduos agroindustriais no processamento de rações para carcinicultura. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Bahia, v.7, n.2, p.94-102, 2006.
- VELLOZO, E.P.; FISBERG, M. O impacto da fortificação de alimentos na prevenção da deficiência de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São Paulo, v. 32 supl.2, 2010.
- WELCH, R.M.; GRAHAM, R.D. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 353-364, 2004.

2. OBJETIVO GERAL

Extrair o ácido ascórbico das cascas de mamão e abacaxi, testar diferentes formas de beneficiar os extratos obtidos e incorporá-lo na farinha de trigo comercial e avaliar a bioacessibilidade do ferro após o processo.

2.1. Objetivos específicos

- Extrair e quantificar o teor de ácido ascórbico dos extratos e selecionar o mais concentrado para as etapas seguintes;
- Microencapsular o extrato líquido por spray drying e por emulsão dupla seguida da coacervação complexa;
- Caracterizar o teor de umidade, atividade de água, solubilidade, higroscopicidade e análises morfológicas das micropartículas de ácido ascórbico e o extrato concentrado desidratado;
- Avaliar a bioacessibilidade do ferro na farinha de trigo com e sem adição de ácido ascórbico.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Subprodutos agroindustriais

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de frutas, dentre elas a banana, maçã, uva, melão e abacate. O abacaxi e mamão são muito importantes em termos de volume de produção no mercado brasileiro, sendo absorvidos principalmente pelo mercado interno, contribuindo principalmente para as necessidades nutricionais da população rural e urbana (FAO, 2015).

Em virtude do crescimento populacional, a demanda por alimentos e recursos naturais aumenta a cada dia, porém são limitados. Novas tecnologias têm sido adotadas com o objetivo de aumentar a produtividade dos alimentos, em termos de quantidade e qualidade para atender a demanda populacional, porém, este incremento da produção tem gerado o desperdício e as indústrias de alimentos e bebidas em alguns países chegam a produzir cerca de 90% de subprodutos, sendo a maior parte deste montante considerado como reutilizável ou reciclável (BÔAS e ESPOSITO, 2000; MARTINS e FARIAS, 2002; MBULIQWE e KASEVA, 2006). Produtos de alta perecibilidade como as frutas e hortaliças acabam gerando grandes quantidades de resíduos, pela falta de cuidado na colheita, uso de equipamentos e transporte inadequados (MARTINS e FARIAS, 2002). Dentre estas frutas, podem ser citados o abacaxi e o mamão.

As agroindústrias de alimentos vegetais possuem paralelamente à sua linha convencional de produtos, a geração de resíduos e subprodutos, que possuem características nutritivas. Porém, estes subprodutos agroindustriais não podem ser consumidos diretamente, devendo passar por tratamentos que garantem a segurança microbiológica e nutricional, como processos térmicos ou o uso da radiação gama (GIUNTINI, LAJOLO e MENEZES, 2003; EVANGELISTA, 2005; DE CAMARGO et al., 2015). Além do mais, estes subprodutos têm causado preocupação para as indústrias, já que quando não são utilizados para alimentação de animais ou utilizado como fertilizante, muitas vezes são descartados a céu aberto ou em rios agredindo o meio ambiente (SOUZA e SANTOS, 2002; GIUNTINI, LAJOLO e MENEZES, 2003; EVANGELISTA, 2005).

Os subprodutos têm sido desprezados e descartados como se não tivessem propriedades interessantes, porém, diversos estudos estão sendo realizados para comprovar a riqueza nutricional deste material. Da Silva et al. (2014) cita que os subprodutos agroindustriais mostraram-se boas fontes de nutrientes e compostos bioativos que podem ser explorados para a comercialização tanto para empresas alimentícias como farmacêuticas diminuindo, consequentemente, a quantidade de subprodutos descartados como lixo.

O processamento da cana-de-açúcar no Brasil, por exemplo, gera o bagaço, que tem sido reaproveitado desde a alimentação animal até à co-geração de energia elétrica para venda que satisfaz demandas regionais (CEREDA, 2000). Os subprodutos contêm muitas substâncias de alto valor nutritivo; e quando submetidos a tecnologias adequadas, estes materiais podem ser transformados em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários (LAUFENBERG, KUNZ e NYSTROEM, 2003). Diante disto, pode-se concluir que estes subprodutos agroindustriais possuem compostos nutricionais e não nutricionais que podem ser aproveitados.

3.1.1. Subprodutos de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill)

O abacaxi pertence à família *Bromeliaceae* muito cultivado nas regiões tropicais do Brasil e do mundo, apresenta polpa suculenta, aromática e de sabor doce, além disso, é rico em vitaminas e bromelina, uma enzima

proteolítica com diversas aplicações na indústria de alimentos, como no amaciamento da carne, sendo o abacaxi “Pérola” a variedade mais cultivada no Brasil (LORENZI et al., 2006). Na última safra de 2016, foram produzidos pelo Brasil cerca de 1,8 milhões de toneladas de abacaxi (IBGE, 2017).

Como subprodutos do abacaxi, podem ser citados a coroa, que pode ser utilizada na propagação vegetativa do fruto, as cascas, o eixo central e o bagaço da polpa que podem ser utilizadas na extração de bromelina e produção de suco. Além disso, a mistura destes subprodutos pode ser destinada a alimentação de ruminantes como fonte de nutrientes (MARTINS e FARIAS, 2002).

Estudos tem sido realizados para a aplicação de subprodutos industriais do abacaxi como as cascas, utilizadas na produção de bolos ricos em fibras (MARTIN et al., 2012), em hambúrgueres bovinos enriquecidos com subprodutos de abacaxi como substitutos de gorduras (SELANI et al., 2015), na fermentação e produção de biobutanol (KHEDKAR et al., 2017) e a farinha das cascas que podem ser empregadas na produção de barras de cereais (DAMASCENO et al., 2016). Com isso, torna-se necessário garantir que o consumo dos subprodutos seja seguro antes de aplicá-los em qualquer produto alimentício.

Da Costa et al. (2007) realizaram uma pesquisa com objetivo de elaborar pós alimentícios obtidos de casca e de bagaço de abacaxi e compará-los em termos físico-químicos e químicos, para posterior aproveitamento no desenvolvimento de novos produtos alimentícios. Como resultado, encontraram concentrações de vitamina C entre 18,61 mg de AA.100 g⁻¹ de pós alimentícios de bagaço de abacaxi e 27,07 mg de AA.100 g⁻¹ de pós alimentícios de casca de abacaxi, mostrando que os dois pós alimentícios elaborados podem ser utilizados como fonte dessa vitamina.

3.1.2. Subprodutos de mamão (*Carica papaya* L.)

Os frutos do mamoeiro, pertencentes a família *Caricaceae* são originários da América Tropical, muito cultivados de forma caseira e comercial no Brasil (LORENZI et al., 2006). Os frutos são apreciados devido ao seu valor nutricional, características sensoriais e por promover benefícios na digestão (PAES, DA CUNHA e VIOTTO, 2015). Observa-se aumento de produtos derivados do mamão tanto em produtos alimentícios como cosméticos, demonstrando o potencial que os frutos apresentam (CALVACHE et al., 2016).

A polpa e as cascas do mamão foram estudados por Calvache et al. (2016), obtendo através de processamento prévio, concentrados de fibras alimentares e no caso dos concentrados provenientes das cascas do fruto, os teores foram mais elevados de ácido ascórbico, compostos fenólicos, carotenóides e até compostos não presentes na polpa, demonstraram também maior capacidade antioxidante quando comparados aos concentrados provenientes da polpa.

Os subprodutos agroindustriais de mamão, como as cascas, foram utilizados como substrato sólido para a otimização da produção de enzimas de interesse e aplicação industrial (PATIDAR et al., 2016). Dos Santos et al. (2014) estudaram a composição de farinhas de subprodutos de mamão de duas cultivares, obtendo farinhas ricas em fibras insolúveis, potássio, cobre e detectaram a presença de vitamina C e compostos fenólicos.

3.1.3. Aproveitamento dos subprodutos agroindustriais

Os pesquisadores têm focado seus estudos no aproveitamento dos resíduos agroindústrias com o objetivo de torná-los um subproduto, isto é, visando não encarar mais esses materiais como descarte, mas sim, com novas

estratégias para seu aproveitamento. Morais et al. (2015) mostram que as cascas e sementes de frutas analisadas apresentam compostos fenólicos em maiores concentrações quando comparadas as concentrações do composto das polpas das frutas e a capacidade antioxidante pode mudar de acordo com os processos como a secagem e o congelamento, no qual as cascas de abacaxi, maracujá e melão liofilizadas apresentaram maiores valores de compostos orgânicos e maior capacidade antioxidante em relação aos frutos in natura.

As farinhas de subprodutos agroindústrias são ricas em K, Zn, Ca e Mg em sua composição podendo ser consideradas melhores fontes de minerais quando comparadas as farinhas da polpa dos frutos de acordo com Chiocchetti et al. (2013) e Sabino et al. (2015). Morais et al. (2017) também concluíram que boa parte das sementes e cascas de frutas estudadas, dentre elas as de mamão e abacaxi, apresentaram quantidades maiores de micronutrientes quando comparadas à polpa, tal como, o cálcio e o potássio.

Sabino et al. (2015) analisaram os compostos bioativos e atividade antioxidante das farinhas de subprodutos de frutas como manga, mamão, melão e abacaxi e como resultado, a farinha de subprodutos de mamão apresentou a maior concentração de vitamina C e elevada quantidade de polifenóis. Da Silva et al. (2014) quantificaram compostos bioativos em polpas e subprodutos de frutas tropicais brasileiras e os teores de antocianinas foram superiores em subprodutos de mamão, manga, caju, maracujá e pitanga do que na polpa do fruto, o que pode ser aplicados na fabricação de suplementos nutracêuticos, entre outros. Além disso, Da Silva et al. (2014) encontraram flavonóides amarelos nos subprodutos de frutas como acerola, goiaba, maracujá, caju, mamão, manga e pitanga.

Subprodutos de pitanga, abacaxi, acerola, caju, goiaba, mamão, manga e maracujá mostraram-se fonte de β -caroteno e no caso de subprodutos de abacaxi e mamão, podem ser considerados boas fontes de compostos fenólicos (DA SILVA et al., 2014). Sousa et al. (2011) realizaram a caracterização nutricional e de compostos antioxidantes presentes em subprodutos de polpas de frutas tropicais como acerola, goiaba, abacaxi, cupuaçu, bacuri e graviola, obtendo subprodutos industriais com quantidades variáveis dos macronutrientes, elevado teor de água e reduzido teor de calorias, destacam-se ainda como fontes potenciais de compostos antioxidantes como carotenóides, fenólicos e vitamina C.

De acordo com Ferrari, Colussi e Ayubi (2004), as cascas e sementes de maracujá são considerados subprodutos industriais resultantes do esmagamento da fruta para a obtenção do suco, material que tem sido utilizado por produtores rurais na suplementação da alimentação animal como ração para bovinos e ave e o estudo de Da Silva et al. (2014), concluiu que as cascas de maracujá podem apresentar compostos termogênicos em sua composição, despertando nos pesquisadores interesse econômico, científico e tecnológico em agregar valor a estes subprodutos.

Entre os nutrientes encontrados nos subprodutos da indústria de alimentos a vitamina C é um deles, composto que foi explorado neste trabalho.

3.2. Vitamina C

A vitamina C apresenta diversas funções no organismo humano, dentre elas, atuação na conversão de colesterol em ácidos biliares, no metabolismo de minerais, como agente redutor prevenindo contra doenças crônicas não transmissíveis, na defesa do organismo por apresentar a característica de doar elétrons, como co-fator ou co-substrato para enzimas, na síntese do colágeno, síntese da carnitina e outras funções (LEVINE et al., 1996; CARDOSO, 2006; SILVA e COZZOLINO, 2009).

Suplementos de vitamina C e vitamina E foram investigados e sua utilização protegeu contra o risco do desenvolvimento da doença de Alzheimer, demência podendo reduzir o risco de comprometimento cognitivo em

função de atuarem como compostos antioxidantes (BASAMBOMBO et al., 2017). Com isso, a ingestão de vitamina C proveniente dos alimentos ou suplementos é essencial para o bom funcionamento do organismo humano (PHILLIPS et al., 2010).

A vitamina C é um importante composto conhecido pela sua degradação não elucidada no processamento dos alimentos e sua deficiência no organismo causa o escorbuto (GOOKMEN et al., 2000; SILVA e COZZOLINO, 2009; HERBING e RENARD, 2017). Mesmo sendo um composto muito instável, tem sido utilizado como ingrediente ativo em alguns alimentos por possuir importante característica antioxidante (COMUNIAN et al., 2013).

A vitamina C apresenta a fórmula $C_6H_8O_6$, faz parte do grupo das vitaminas hidrossolúveis e não apresenta odor (CARDOSO, 2006). Os animais e a maioria das plantas possuem a capacidade de sintetizar vitamina C a partir da glicose ou galactose. Por outro lado, os seres humanos são incapazes de produzir esta vitamina, que deve ser obtida pela dieta através do consumo de frutas e legumes conhecidos como fontes deste micronutriente (BALL, 1994; SILVA e COZZOLINO, 2009; CAMPOS et al., 2009; PHILLIPS et al., 2010; BRIONES-LABARCA et al., 2013).

Nos alimentos, a vitamina C pode estar presente na forma de L-ácido ascórbico (AA) o qual apresenta a maior atividade ou, na sua forma oxidada, o ácido dehidroascórbico (DHA) que apresenta atividade antioxidante própria. Sendo assim, deve-se computar as duas formas para quantificar a concentração total de vitamina C de uma amostra. Por sua vez, o DHA pode ser oxidado irreversivelmente em ácido dicetogulônico que não possui atividade antioxidante. No caso da acerola, as concentrações são altíssimas de AA e DHA, principalmente no caso dos frutos de cultivo orgânico (DEUTSCH, 2000; NYSSONEN et al., 2000; CARDOSO et al., 2011). Outra fonte de vitamina C conhecida são os frutos de camu-camu, principalmente para frutos cultivados em ambientes secos os quais apresentam maior concentração da vitamina (RIBEIRO et al., 2016).

A extração do ácido ascórbico tem sido realizada com diversos solventes, tal como a água deionizada, ácido metafosfórico, ácido oxálico e a mistura de alguns solventes (HERNÁNDEZ, LOBO e GONZÁLEZ, 2006) (GOEKMEN et al., 2000; GIANNAKOUREU e TAOUKIS et al., 2003; HERNÁNDEZ, LOBO e GONZÁLEZ, 2006; CAMPOS et al., 2009; PHILLIPS et al., 2010; BRIONES-LABARCA et al., 2013). Para analisar o conteúdo de vitamina C dos alimentos são necessários cuidados, já que o composto é sensível a luz, pH, temperatura, oxigênio, metais e enzimas oxidativas. Portanto, a preparação das amostras e as condições das análises devem ser controladas para evitar a oxidação do composto e os erros nos resultados analíticos (CAMPOS et al., 2009; PHILLIPS et al., 2010).

Os cuidados com as temperaturas empregadas no processo de extração da vitamina C são muito importantes devido a propriedade termolábil do composto. Segundo Aguilar et al. (2017) que estudaram a sonicação aliada ao tratamento térmico de amostras de suco concentrados para avaliar a concentração de ácido ascórbico os tratamentos térmicos brandos, temperaturas de até 55°C; não afetaram a concentração de ácido ascórbico das amostras. Diante do exposto, processos de microencapsulação e concentração do composto são apontados como possíveis meios para superar os desafios impostos devido à instabilidade e fragilidade do ácido ascórbico.

3.3. Liofilização ou freeze drying

O processo de liofilização pode ser definido como a secagem de um material sem aplicação do calor, diminuindo sua atividade de água e mantendo a qualidade nutricional e características sensoriais. Basicamente, os liofilizadores são compostos por: câmara a vácuo, no qual os materiais destinados à secagem ficam em bandejas, aquecedores para suprir o calor latente de sublimação, serpentinas de refrigeração para condensar os vapores em gelo e bomba a vácuo para remover os vapores não-condensáveis (FELLOWS, 2006).

O processo de liofilização envolve algumas etapas. Primeiramente, antes do processo o material deve ser congelado rapidamente visando a produção de pequenos cristais de gelo, reduzindo assim, os danos a estrutura celular dos componentes. Em seguida, o material é submetido ao vácuo iniciando a secagem através da sublimação do gelo sólido em vapor, sem se fundir. O vapor de água é então removido do alimento mantendo-se a pressão na câmara do liofilizador abaixo da pressão de vapor da superfície do gelo, através da bomba vácuo e a condensação do vapor é realizada pela serpentina de refrigeração (FELLOWS, 2006).

O processo conserva os compostos aromáticos voláteis, já que estes não são absorvidos no vapor d'água ficando presos à matriz alimentar, e mantém a textura dos alimentos, pois há pequeno encolhimento, não forma crostas na superfície do material e as alterações nas proteínas, amidos e carboidratos são mínimas. No caso de tiamina e ácido ascórbico, as perdas são consideradas moderadas. Ainda, independente do material, a estrutura porosa formada permite sua rápida e completa reidratação (FELLOWS, 2006). Além disso, materiais liofilizados apresentam boa aparência, são fáceis de empacotar e podem ser armazenados por períodos longos (GUTCHO, 1977).

Em suma, apesar de manter as características e propriedades dos alimentos, a liofilização é um processo lento e custoso, isto é, durante a secagem a camada seca vai aumentando exigindo maior tempo de processo e energia para o compressor e refrigerador, tornando o processo caro comercialmente. Sendo assim, utiliza-se a liofilização para produtos que podem ser comercializados com preços superiores ou que suportam pequena perda na qualidade sensorial (COHEN e YANG, 1995). Estudos confirmam o crescimento da aplicação da liofilização principalmente na área alimentícia, mostrando ser uma área industrial promissora, segundo de Oliveira et al. (2012).

3.4. Tecnologia de microencapsulação

A microencapsulação pode ser descrita como o revestimento de partículas ou gotículas de material líquido ou gasoso com materiais poliméricos de revestimentos finos, formando estruturas pequenas chamadas de micropartículas, que libertam o conteúdo de forma controlada ou sob condições específicas (GHARSALLAOUI et al., 2007; FAVARO-TRINDADE et al., 2008). O material encapsulado é chamado de recheio, núcleo ou material ativo e o material que forma a cápsula é denominado de encapsulante, cobertura, carregador ou parede (GIBBS et al., 1999; MADENE et al., 2006).

Existem algumas técnicas que são utilizadas na microencapsulação, que são classificadas em três diferentes métodos: os físicos, como spray drying, encapsulamentos de fluídos supercríticos e dispositivos microfluídicos; os químicos, como polimerização e os físico-químicos, como coacervação complexa, emulsões, entre outros (COMUNIAN e FAVARO-TRINDADE, 2016). Neste trabalho, o foco será na microencapsulação por spray drying e coacervação complexa.

As micropartículas podem ser subdivididas em dois grupos (microcápsulas ou microesferas), de acordo com sua estrutura e a técnica a qual foi obtida. As microesferas são do tipo matriz polimérica, na qual o composto ativo se espalha por toda a estrutura inclusive na superfície (Figura 1), podendo ser obtida pelas técnicas de spray drying e spray chilling (SUAVE et al., 2006, ALVIM et al., 2016).

Nas microcápsulas, o núcleo fica envolto pelo polímero (Figura 1), os quais atuam como uma película de proteção isolando o núcleo e evitando os efeitos da sua exposição, liberando o ativo no lugar e/ou momento ideais a partir de um estímulo específico. Neste caso, pode apresentar um ou mais núcleos. Como exemplo de técnica que pode gerar microcápsulas são a coacervação complexa e dispositivos microfluídicos (RÉ, 2000; SUAVE et al., 2006; COMUNIAN et al., 2013; COMUNIAN et al., 2014; COMUNIAN e FAVARO-TRINDADE, 2016).

Figura 1. Estruturas das microesferas e microcápsulas (COMUNIAN e FAVARO-TRINDADE, 2016).

Ainda, as micropartículas podem ser classificadas de acordo com o seu tamanho, menores que $0,2\ \mu\text{m}$ chamadas de nanopartículas, de 1 a $100\ \mu\text{m}$ são micropartículas e maiores que $100\ \mu\text{m}$ são classificadas como macropartículas (SANTOS et al., 2000; FAVARO-TRINDADE et al., 2008). As micropartículas podem ser compostas por apenas uma parede ou múltiplas paredes, apresentando-se no formato esférico ou irregular (Figura 2). Além disso, podem apresentar diversos núcleos e diferentes materiais que compõem a parede. É possível encapsular inúmeros materiais visando isolamento, purificação ou liberação lenta (GIBBS et al., 1999).

Figura 2. Formas que as micropartículas podem se apresentar (GIBBS et al., 1999).

A microencapsulação pode ser aplicada em áreas diferentes como farmacêutica, agrícola, alimentos e indústrias médicas. Tem sido utilizada na encapsulação de óleos essenciais, corantes, aromatizantes, edulcorantes, micro-organismos e outros (AZEREDO, 2005). Nas indústrias alimentícias a técnica ganhou destaque devido à variedade de matérias e compostos ativos que tem sido estudados e que podem ser encapsulados, como as antocianinas, β -caroteno, compostos fenólicos, ácido ascórbico, vitamina E, óleos essenciais, probióticos e peptídeos como a nisina (COMUNIAN et al., 2011; HEIDEBACH, FORST e KULOZIK, 2012; COMUNIAN et al., 2013; AMARA et al., 2017; KUJUR et al. 2017; GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2017; RAIKOS, 2017; ASHWAR et al., 2018; DE MOURA et al., 2018; RODSAMRAN e SOTHORNVIT, 2018).

O processo de encapsulação de compostos pode ocorrer através de diferentes maneiras: gelificação iônica, extrusão, revestimento em leito fluidizada, spray drying, spray chilling, coacervação complexa além de emulsão simples e dupla, entre outras. Além disso, muitos materiais podem ser utilizados como parede, dentre eles estão os açúcares, gomas, proteínas, polissacarídeos naturais e modificados, lipídios, polímeros sintéticos, polissacarídeos aniônicos como pectina e alginato, amido resistente, concentrado de proteínas do soro do leite, goma arábica, amido modificado, maltodextrina, proteína isolada de ervilha e gelatina, entre outros (GIBBS et al., 1999; COMUNIAN et al., 2011; ARSLAN et al., 2015; ALVIM et al., 2016; BEN AMARA et al., 2017; GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2017; RAIKOS, 2017; ASHWAR et al., 2018; DE MOURA et al., 2018; RODSAMRAN e SOTHORNVIT, 2018).

Como vantagens da microencapsulação tem-se: modificação e melhorias na aparência e nas propriedades das substâncias, facilidade na aplicação dos materiais sólidos e proteção contra umidade e calor (SHAHIDI e HAN, 1993; GIBBS et al., 1999). Algumas vitaminas são altamente oxidáveis e assim se beneficiam da encapsulação, pois aumentam na estabilidade desses compostos, além de mascarar sabores ou odores estranhos (BRAZEL, 1999). Além disso, as micropartículas protegem o ativo de interagir com outros componentes dos alimentos e pode aumentar a biodisponibilidade deste material (AUGUSTIN, SANGUANSRI e LOCKETT, 2013).

O uso da microencapsulação na área de alimentos tem como principais objetivos reduzir a reatividade do material interesse (ativo) com o ambiente retardando assim alterações que levam a perda de aroma, alteração de cor ou perda do valor nutricional; diminuir a velocidade de evaporação (ou transferência) do material de ativo (quando volátil) para o meio; facilitar a manipulação do material encapsulado; promover liberação de forma controlada; segregar componentes reativos ou incompatíveis; e também, promover a diluição homogênea do material encapsulado em uma formulação alimentícia ou sistemas secos. Os ingredientes ativos adicionados aos alimentos incluem aromas, vitaminas, minerais, microrganismos probióticos e peptídeos bioativos (PSZCZOLA, 1998; RÉ, 1998; FAVARO-TRINDADE e GROSSO, 2002; DEPYPERE et al., 2003; ARIMOTO, ICHIKAWA e FUKUMORI, 2004; KAILASAPATHY, 2006).

Na indústria farmacêutica, a técnica é utilizada como proteção frente aos agentes atmosféricos como a luz, oxidação, redução da volatilidade e auxílio na dispersão de substâncias insolúveis em água em meios aquosos (BURGESS e HICKEY, 1994; KAS e ONER, 2000). Os métodos de microencapsulação por spray drying e emulsão dupla seguida da coacervação complexa, podem, portanto, ser empregados para a encapsulação do ácido ascórbico.

3.4.1. Secagem por atomização ou spray drying

A tecnologia de spray drying é amplamente utilizada por indústrias na fabricação de alimentos em pó, e ainda, por ser considerada uma técnica de secagem econômica devido as baixas despesas operacionais, originando produtos altamente estáveis, com baixa atividade de água, baixos teores de umidade, propriedade de solubilidade

instantânea, seguros das degradações químicas e biológicas; e com reduzido custo de armazenamento/transporte já que o volume de material é diminuído (GHARSALLAOUI et al., 2007; SHISHIR e CHEN, 2017).

A secagem por atomização é um processo no qual uma solução, emulsão ou suspensão é atomizada em uma corrente de ar quente, obtendo-se um pó fino de 10 a 50 μm ou partículas maiores de até 3 mm. A técnica visa diminuir o teor de água e atividade de água do produto, garantindo assim maior estabilidade microbiológica, evita a degradação química e ainda reduz os custos de operação, transporte e armazenamento já que o volume é reduzido. A tecnologia utiliza altas temperaturas, com tempo de contato muito curto de apenas alguns segundos suficientes para a evaporação da água, o que permite a aplicação da técnica para materiais sensíveis ao calor. Com isso, essa técnica de secagem vem sendo aplicada principalmente para ingredientes instáveis e fármacos (GHARSALLAOUI et al., 2007; ARSLAN et al., 2015; GUL et al., 2015; COMUNIAN e FAVARO-TRINDADE, 2016).

Muitos tipos de ativos podem ser encapsulados por spray drying, mas, de acordo com Cohen e Yang (1995), materiais muito oleosos necessitam de tratamento prévio antes da secagem para a remoção da quantidade excessiva de gordura. A técnica de encapsulação por spray dryer se resume na homogeneização do ativo com o material de parede, essa mistura é alimentada no equipamento sendo atomizada com um bico atomizador. A água é evaporada quando o fluxo de ar quente e seco (temperaturas superiores a 120 °C) entra em contato com o material pulverizado e as partículas secas formadas são coletadas no fundo do secador ou ciclone (GIBBS et al., 1999; GHARSALLAOUI et al., 2007) como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3. Esquema do método de secagem por spray drying (COMUNIAN e FAVARO-TRINDADE, 2016).

Diversos polissacarídeos e proteínas e suas misturas podem ser aplicados como materiais de parede sendo alguns exemplos a maltodextrina, inulina, goma arábica, amido de tapioca, isolado de proteína de soja e amidos provenientes do grão de arroz (WANI et al., 2012; GUL et al., 2015; TIMILSENA et al., 2017). O processo de spray drying confere aos produtos propriedades como solubilidade instantânea como no caso do leite em pó, no qual a gordura do leite é protegida por uma série de proteínas do leite e lactose, que agem como materiais de parede (GHARSALLAOUI et al., 2007). Este processo é aplicado eficientemente para as proteínas do soro do leite, que são concentradas através da remoção da água (GANJU e GOGATE, 2017).

3.4.2. Emulsão dupla seguida da coacervação complexa

A coacervação é considerada o “método original e verdadeiro” de encapsulação de compostos (RISCH, 1995), pode ocorrer de forma simples envolvendo apenas um tipo de polímero, ou complexa, onde são adicionados dois ou mais polímeros (MADENE et al., 2006). Os coacervados complexos são formados através da interação entre polímeros de cargas opostas, tornando-se mais ativos, emulsionantes e estabilizantes do que quando o polissacarídeo ou proteína são utilizados individualmente aumentando assim a eficiência da microencapsulação, fornecendo ao núcleo maior estabilidade oxidativa (BENICHO et al., 2007; TIMILSENA et al., 2017).

A coacervação complexa, na literatura, tem sido mais aplicada para ativos lipofílicos (Figura 4). No caso de materiais hidrofílicos como o ácido ascórbico, o estudo de Comunian et al. (2013) propôs uma adaptação, isto é, antes da coacervação foi realizada uma emulsão de água em óleo (A/O), na qual o ácido ascórbico se encontra, e em seguida preparou-se uma emulsão água em óleo em água (A/O/A) (dupla emulsão) seguida da coacervação complexa, como adotado neste trabalho.

Figura 4. Esquema da microencapsulação por coacervação complexa (COMUNIAN e FAVARO-TRINDADE, 2016).

Para a promoção da coacervação complexa, são necessários um polímero de carga positiva e um carregado negativamente e propriedades de formação de gel para a formação da estrutura das partículas, na qual a gelatina é a proteína mais aplicada e apropriada, e a goma arábica e carboximetilcelulose os polissacarídeos mais utilizados (SCHROOYEN, VAN DER MEER e KRUIF, 2001; BARROW, NOLAN e JIN, 2007). Pesquisas avançadas sobre a coacervação complexa envolvem a preparação de coacervados a partir de proteínas vegetais e gomas extraídas de plantas para microencapsular óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados (SALEH et al., 2016; TIMILSENA et al., 2017). Porém, o principal polímero aplicado no processo é a gelatina (BARROW, NOLAN e JIN, 2007).

A vantagem da coacervação complexa é que a quantidade ativo que pode ser encapsulada é relativamente alta e o invólucro exterior pode ser espesso, diferentemente das partículas secas por atomização, no qual o material é distribuído uniformemente pela matriz da partícula, isto é, o material de interesse pode ficar inclusive na superfície da estrutura. No caso dos coacervados, o invólucro exterior é composto geralmente por uma casca espessa e o material de interesse fica bem protegido no centro da partícula. Sendo assim, este invólucro é capaz de proteger as substâncias dos métodos de processamentos como extrusão, congelamento, pasteurização e possíveis oxidações (BARROW, NOLAN e JIN, 2007). Ainda entre os benefícios, a coacervação complexa agrega alto valor aos produtos, pode ser aplicada em ingredientes funcionais lábeis, mascara sabores desagradáveis, protege compostos como fitoesteróis da degradação durante o processamento dos alimentos (SCHROOYEN, VAN DER MEER e KRUIF, 2001).

3.4.3. Polímeros mais utilizados nos processos de microencapsulação

Existem muitos polímeros que podem ser aplicados na microencapsulação de substâncias, como a gelatina e goma arábica. A gelatina é um dos polímeros mais utilizados no processo de microencapsulação, devido ao seu baixo custo. Além disso, o gel formado derrete a temperaturas corpóreas, liberando mais facilmente os compostos encapsulados. Essas propriedades são favoráveis ao encapsulamento, principalmente por coacervação complexa. Este material pode ser obtido a partir da pele de porco, ossos, pele de vacas e de peixes através da hidrólise do colágeno. Além disso, apresenta uma carga negativa acima do seu ponto isoelétrico e uma positiva abaixo do ponto isoelétrico (COMUNIAN e FAVARO-TRINDADE, 2016).

A goma arábica, por sua vez, é um exsudado da árvore de acácia, encontrada em regiões tropicais e subtropicais, como no Sudão e Nigéria. Este polímero é composto basicamente por duas frações, a primeira e maior fração (cerca de 70%) da cadeia de polissacarídeos, como D-galactose, L-arabinose, ácido D-galacturônico e outros, e a segunda composta basicamente por proteínas (BEMILLER e HUBER, 1996). A goma arábica é muito solúvel em meios aquosos, apresenta boas propriedades emulsificantes devido à formação de sua cadeia, na qual os polissacarídeos apresentam caráter hidrofílico e as proteínas apresentam características hidrofóbicas, conferindo a propriedade anfílica ao composto. Além disso, pode formar soluções de baixa viscosidade, mesmo quando muito concentradas, melhorando a produtividade do processo (BEMILLER e HUBER, 1996; COMUNIAN e FAVARO-TRINDADE, 2016).

As técnicas de microencapsulação permitem a combinação de polímeros, entre elas, a gelatina com a goma arábica, muito aplicada nos estudos principalmente de coacervação complexa, já que a goma arábica é carregada negativamente e a gelatina possui uma carga positiva abaixo do seu ponto isoelétrico. Quando o pH é ajustado ao ótimo da coacervação, os complexos são formados devido ao ajuste do balanço de cargas (pH) e a força iônica, sendo a temperatura, concentração e interação entre os dois polímeros fatores adjuvantes (COMUNIAN e FAVARO-TRINDADE, 2016).

3.4.4. Aplicações da microencapsulação

O processo de microencapsulação pode ser visto como solução para minimizar a instabilidade do ácido ascórbico, controlar sua liberação no meio e mascarar sua característica ácida, aumentando a estabilidade e concentração desse nutriente nos alimentos (TRINDADE e GROSSO, 2000; COMUNIAN et al., 2013). Estevinho et al. (2016) estudaram a microencapsulação de vitamina B12 e vitamina C com diferentes polímeros, como quitosana, quitosana modificada e alginato de sódio, pelo processo de spray drying com boa eficiência e concluindo a possibilidade de microencapsular vitaminas.

Park et al. (2017) desenvolveram nanopartículas lipídicas para encapsular e controlar a liberação de vitamina D3, no qual as partículas apresentaram resistência a aglomeração, estabilidade e potencializaram a absorção da vitamina pelo corpo. Alvim et al. (2016) estudaram micropartículas contendo ácido ascórbico obtidas por spray drying e spray chilling e sua aplicação em produtos forneados, obtendo boa eficiência de microencapsulação sem perdas significativas do ácido ascórbico em ambos processos, além disso, observou-se que as técnicas protegeram o composto durante o assamento de biscoitos em comparação com os biscoitos que foram produzidos com a substância ativa livre, o que evidencia que a técnica é capaz de proteger substâncias mesmo com a aplicação de altas temperaturas de processamento.

Santos et al. (2015) concluíram que foi possível realizar a microencapsulação do xilitol, que, assim como a vitamina C também é uma substância hidrofílica, através da dupla emulsão seguida pela coacervação complexa e liofilização. Os autores obtiveram boa eficiência de microencapsulação tornando o resultado positivo quanto a liberação do núcleo das micropartículas. Comunian et al. (2013), realizaram a microencapsulação da vitamina C utilizando o processo de coacervação complexa, concluindo que é possível produzir estas cápsulas com o uso da técnica de emulsão dupla antes da coacervação por ser um material hidrofílico e, além disso, o ácido ascórbico obteve proteção maior em comparação com a forma livre.

Com base nos estudos citados, pode-se observar que o processo de microencapsulação auxilia na preservação dos componentes desejados, capaz de preservar as propriedades destes materiais, e apresenta ser um processo benéfico, mesmo com o emprego de temperaturas elevadas no processamento. Além disso, os resultados são positivos para a microencapsulação de componentes ativos alimentícios, porém poucos trabalhos investigam a ação destes produtos sobre a bioacessibilidade de nutrientes.

3.5. Bioacessibilidade dos nutrientes

A bioacessibilidade é definida como a quantidade de um determinado nutriente liberado de sua matriz alimentar durante o processo digestivo e está disponível para a absorção intestinal (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012), sendo possível determiná-la por métodos *in vitro*. Biodisponibilidade por sua vez, é um conceito diferente, já que é definida como a proporção dos nutrientes nos alimentos que é absorvida e utilizada efetivamente englobando liberação da matriz, assimilação, absorção pelas células do intestino, transporte e conversão do nutriente para sua forma ativa biologicamente no corpo (COZZOLINO e PEDROSA, 1995; ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012). Sendo assim, a biodisponibilidade não pode ser medida diretamente com os métodos de ensaios *in vitro*, já que dependerá também dos fatores apresentados por cada indivíduo como estado nutricional, idade, fisiologia, apresentação de doenças infecciosas, crônicas, agudas e outras variáveis (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012).

Para mensurar a bioacessibilidade do ferro dietético existem algumas técnicas como modelagem matemática, bioensaios com animais e testes *in vitro*, os quais simulam as condições fisiológicas durante a digestão no trato intestinal humano (QUINTAES, BARBERÁ e CILLA, 2017). As vantagens trazidas pelos métodos *in vitro* são a rapidez nas análises, controle das variáveis experimentais quando comparados aos estudos realizados *in vivo* podendo ser considerados boa ferramenta para estudos. Ainda, o método *in vitro* não pode substituir ensaios *in vivo* mas são utilizados para prospectar possíveis resultados. Com isso, métodos *in vitro* fornecem conhecimentos sobre interações entre nutrientes, efeitos de fatores como pH e ação de enzimas, efeitos do processamento dos alimentos dentre outros (SANDBERG, 2005; ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012; QUINTAES, BARBERÁ e CILLA, 2017).

Existem diversos métodos *in vitro* que podem mensurar a bioacessibilidade de nutrientes, dentre eles, os modelos que utilizam a simulação do processo de digestão gástrica e intestinal aliados às culturas de células Caco-2. Estas células pertencem a uma linhagem celular desenvolvida a partir de um adenocarcinoma humano; que, em condições adequadas, são capazes de se diferenciar em monocamadas polarizadas, desenvolve microvilosidades e atuar de forma semelhante às células epiteliais do intestino delgado (GLAHN, 1998; VAN CAMPEN; GLAHN, 1999; ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012).

Estudos *in vitro* estão sendo realizados para diagnosticar a bioacessibilidade de alguns nutrientes, dentre eles, o ferro. Glahn et al. (1998) desenvolveram um modelo de digestão *in vitro* aliado a cultura de células Caco-2 para verificar a solubilidade e absorção de Fe utilizando a ferritina como marcador da absorção de Fe pelas células.

As condições de temperaturas, pH e enzimas propostas pelo modelo simulam a superfície absorviva do ambiente gastrointestinal humano tornando o sistema viável em termos de tempo e custos quando comparado aos ensaios *in vivo* (BERNE e LEVY, 1993; GUYTON e HALL, 1996; GLAHN et al., 1998).

No estudo realizado por Gangloff et al. (1996), o ácido ascórbico e a carne aumentaram a captação de ferro pelas células Caco-2. Andre et al. (2015) realizaram a digestão gastrointestinal *in vitro*, culturas de células Caco-2 e a formação de ferritina para observar a bioacessibilidade e absorção de ferro das amostras de batatas biofortificadas, observando que o ferro foi liberado da matriz tubercular na digestão podendo ser prontamente absorvido. Além disso, a vitamina C das batatas foi associada de forma positiva para os valores de ferritina encontrados no mesmo estudo, frisando a ação deste componente como facilitador da absorção de Fe.

3.5.1. Ferro e sua bioacessibilidade

As funções do ferro no organismo estão ligadas às funções das proteínas que contém este mineral como a hemoglobina, mioglobina, citocromos e enzimas que possuem ferro, enxofre e proteínas ligadas ao transporte e armazenamento do ferro como transferrina, lactoferrina e ferritina (HENRIQUES e COZZOLINO, 2009).

Dentre algumas funções deste mineral estão a atuação como transportador de oxigênio, já que a combinação do ferro com a hemoglobina é de fácil dissociação, o que permite que o oxigênio transportado seja fornecido aos tecidos de acordo com suas necessidades; catalisar oxidações; intervindo em diversas reações, por meio das quais libera energia dos constituintes alimentares (GUYTON e HALL, 1997). Segundo Beard, Dawson e Piñero (1996), a atividade de enzimas envolvidas nestas reações bioquímicas é diminuída com a falta de ferro nos tecidos.

Diante da importância do ferro no organismo, surge alternativas para aumentar o consumo de Fe como a fortificação de alimentos com nutrientes, prática aceita e empregada por processadores de alimentos desde o século XX (REILLY, 1996). O objetivo da fortificação é reforçar o valor nutritivo e prevenir ou corrigir deficiências de um ou mais nutrientes (ROSELL e BENEDITO DE BARBER, 2001). Esta técnica vem sendo utilizada como um recurso de baixo custo na prevenção de carências nutricionais em diversos países, onde vários alimentos têm sido utilizados na fortificação, mostrando-se eficientes e bem tolerados (VELLOZO e FISBERG, 2010).

No caso do ferro a biodisponibilidade depende de alguns fatores fisiológicos do organismo tal como idade, sexo, doenças e as próprias necessidades do organismos. Além disso, depende dos fatores dietéticos dos indivíduos que pode afetar a solubilidade e/ou o estado de oxidação do mineral (VELLOZO e FISBERG, 2010; ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012).

Nos alimentos, o ferro está presente na forma de ferro ferroso ou ferro-heme (Fe^{2+}) e ferro férrico ou ferro não-heme (Fe^{+3}), sendo a forma ferrosa mais absorvida pelo organismo, já que o ambiente intraluminal favorece sua bioacessibilidade, pois em pH acima de 2 o ferro férrico sofre hidrólise e acaba se precipitando. Neste caso, apenas o Fe solúvel em moléculas de heme ou ligado a quelatos de baixo peso molecular podem ser absorvidos no duodeno e jejuno proximal (CARDOSO, 2006). O ferro heme pode ser encontrado em alimentos de origem animal, como carnes, aves e peixes, sob a forma de hemoglobina e mioglobina, representando cerca de 40% do ferro do tecido animal, sendo uma forma bem absorvida e pouco influenciada pelas reservas de ferro dos indivíduos ou outros constituintes da dieta (CARPENTER; MAHONEY, 1992; CARDOSO, 2006).

O maior aporte de ferro na dieta humana é da forma não-heme, encontrado em alimentos de origem vegetal ou animal, no leite e derivados, ovos e em 60% do teor de ferro das carnes em geral estando na forma de sais de ferro ou ligados a proteínas. O ferro presente em cereais e hortaliças não é absorvido em sua totalidade, cerca de 10% é

aproveitado, já que o ferro não-heme apresenta absorção variável fortemente dependente de outros componentes da dieta e das reservas de ferro dos indivíduos (HADLER, JULIANO e SIGULEM, 2002; CARDOSO, 2006; ACCIOLY; LACERDA; ENGSTROM, 2009). O ferro não-heme é absorvido na forma ferrosa, com isso, compostos redutores do lúmen, como por exemplo a vitamina C, no momento da absorção podem auxiliar nesta etapa (HENRIQUES e COZZOLINO, 2009).

3.5.2. Promotores da absorção do ferro não-heme

Alguns alimentos atuam de maneira positiva na absorção do Fe não-heme, como a carne, pois no momento da digestão libera cisteína e peptídeos com cisteína, formando quelatos peptídeo-Fe que são facilmente absorvidos, além disso, ácidos orgânicos como cítrico, málico, láctico, tartárico e especialmente o ácido ascórbico possuem ação benéfica na absorção do mineral (CARDOSO, 2006), ainda, a vitamina E, A e ácido fólico podem facilitar esta absorção (FIALHO, 2009).

O ácido ascórbico transforma o Fe^{+3} em Fe^{+2} tornando-o solúvel no meio alcalino do intestino delgado, potencializando a absorção do mineral já que forma um quelato solúvel (ANTUNES e SGARBIERI, 1980; CARDOSO, 2006), exercendo função de agente redutor. O aumento da absorção do ferro não-heme na presença da vitamina C parece ter uma relação direta, sendo independente do estado nutricional do indivíduo (HENRIQUES e COZZOLINO, 2009).

Segundo Bianchi (1988) e Bianchi, Silva e Dutra de Oliveira (1992), a absorção do ferro aumenta de 3,7% para 10,4% em refeições com pão, ovo e chá quando é adicionado de 40 a 50 mg de ácido ascórbico. De acordo com Toth et al. (1995), a vitamina C aumenta diretamente a biodisponibilidade do ferro não-heme presente nos alimentos, já que consegue influenciar no transporte e armazenamento do Fe no organismo. Observações realizadas em estudos in vitro sugerem que o ácido ascórbico é importante na modulação e síntese de ferritina, auxiliando no armazenamento do Fe. Fantini et al. (2008) estudaram a disponibilidade de ferro em misturas de alimentos com adição de alimentos com alto teor de vitamina C e de cisteína e concluíram que ao acrescentar estes compostos ocorreu aumento significativo da disponibilidade de ferro medida pela diálise para arroz, feijão e tomate.

3.5.3. Inibidores da absorção do ferro não-heme

Existem alguns fatores que interferem de maneira negativa na absorção do Fe não-heme. Os chamados fatores antinutricionais são compostos presentes em alimentos de origem vegetal cujo consumo pode reduzir o valor nutritivo destes alimentos interferindo na digestibilidade de proteínas, absorção de nutrientes e minerais, causar lesões na mucosa intestinal, afetando de maneira negativa na eficiência dos processos biológicos (SGARBIERI, 1987; SANTOS, 2006).

O ácido fítico ou fitatos são compostos presentes em cereais e sementes de leguminosas, sendo considerados um dos principais inibidores da absorção do Fe não-heme, já que reagem com o ferro formando sais insolúveis como fitato di e tetraférrico, que precipitam no intestino impedindo a absorção do mineral (CARDOSO, 2006; ACCIOLY; LACERDA; ENGSTROM, 2009).

Metabólitos secundários de origem vegetal como os compostos fenólicos e polifenóis que podem ser encontrados em cereais integrais, leguminosas, frutas e hortaliças também são potentes inibidores de absorção do Fe

não-heme pois podem formar complexos insolúveis e estáveis no lúmen intestinal com o Fe através dos grupos carboxílicos e hidroxílicos que possuem (CARDOSO, 2006; ACCIOLY; LACERDA; ENGSTROM, 2009). Os taninos, que pertencem ao grupo dos compostos fenólicos, presentes em alimentos como chá e café apresentam efeitos adversos na digestibilidade de proteínas e também inibem a absorção de Fe dos alimentos (BRAVO, 1998; CARDOSO, 2006).

Nos ovos, leite e derivados os fosfatos ligados a proteínas formam complexos insolúveis com Fe e o cálcio, quando em excesso, inibem a absorção do ferro (CARDOSO, 2006). Os oxalatos presentes em alimentos de origem vegetal são conhecidos como antinutrientes quelantes de minerais como o cálcio e magnésio e também foram investigados em relação a sua atividade com o ferro, mas mostraram-se pouco influentes sobre a inibição da absorção do mineral (BONSMANN et al., 2007; HENRIQUES e COZZOLINO, 2009).

3.5.4. Anemia ferropriva

A anemia é uma doença considerada um problema global de saúde pública, afetando tanto países desenvolvidos ou em desenvolvimento, atingindo pessoas em todas as fases do ciclo de vida, porém é mais comum ocorrer em mulheres grávidas e crianças pequenas (WHO, 2008). De acordo com dados estatísticos de 2011, a anemia afeta 273,2 milhões de crianças e mais de 500 milhões de mulheres em idade reprodutiva em todo o mundo (WHO, 2015). A maior proporção de mulheres grávidas afetadas pela anemia é encontrada na região sudeste da Ásia, cerca de 98% destas apresentam a doença, seguida pelas mulheres grávidas da região Pacífica Ocidental (95%), Africanas (94%), Mediterrânea Oriental (69%) e Americanas (65%) (WHO, 2015).

De acordo com Accioly, Lacerda e Egstrom (2009), a anemia pode afetar pessoas dos diversos estratos sociais, porém sua alta prevalência está associada as condições socioeconômicas e sanitárias baixas. No Brasil, de acordo com estimativa do Ministério da Saúde, cerca de 10 milhões de crianças até 5 anos (45%) têm anemia, problema de saúde pública severo que interfere no desenvolvimento, desempenho intelectual e aumenta a vulnerabilidade às infecções (ANVISA, 2002; WHO, 2008).

Esta enfermidade pode ocorrer em decorrência da deficiência de ferro, que é o resultado de um longo tempo de balanço negativo entre a quantidade de ferro existente para manter o bom funcionamento dos tecidos e a necessidade do organismo, sendo a principal causa desta situação o baixo consumo e/ou a baixa absorção do ferro proveniente da dieta (WHO, 2008). Dietas ricas em fitato, compostos fenólicos e deficientes em micronutrientes também podem levar ao aparecimento da anemia, assim como o período da vida como fase do crescimento, gravidez, idade fértil no caso das mulheres, e doenças como malária, câncer, HIV, tuberculose, infecções parasitárias, agudas e crônicas podem diminuir o teor de hemoglobina no sangue levando a anemia (WHO, 2008).

Em média, os adultos possuem pelo menos 3000 mg (45 mg/Kg) do elemento ferro em seus corpos, salvo as mulheres que apresentam níveis mais baixos devido as perdas durante a menstruação, gestações e lactação (ALLEYNE, HORNE e MILLER, 2008). Em síntese, a anemia pode ser definida como resultado da falta de hemoglobina na circulação sanguínea causando diminuição do transporte de oxigênio para os tecidos, provocando sintomas como cansaço, respiração ofegante, palpitações, dores de cabeça, tontura e irritabilidade (HENRIQUES e COZZOLINO, 2009).

Recomenda-se algumas abordagens para suprir o aporte de ferro, sendo elas: modificação da dieta através do consumo de alimentos que melhorem o aporte de ferro e sua biodisponibilidade; suplementação e fortificação de alimentos, isto é, adição do elemento em alimentos processados, como por exemplo o leite e outros produtos lácteos

(ABBASI e AZARI, 2011). A suplementação de ferro é recomendada para mulheres e adolescentes em idade reprodutiva, com doses diárias de 30-60 mg do ferro elementar (ou 150-300 mg de sulfato ferroso, 90-180 mg de fumarato ferroso ou 250-500 mg de gluconato ferroso) por três meses consecutivos (WHO, 2016).

O combate da anemia no Brasil está sendo realizada através da educação nutricional da população a qual visa o consumo de alimentos que apresentam maior biodisponibilidade de ferro, pela suplementação de medicamentos e pela fortificação de alimentos, medidas que devem ser realizadas em conjunto para que o aporte de ferro seja aumentado no organismo a partir de um plano médico após o diagnóstico, podendo ser uma doença evitada e reversível (OMS, 2001; ALLEYNE, HORNE e MILLER, 2008; VELLOZO e FISBERG, 2010). Szarfarc (1972) diagnosticou anemia em 52,1% das parturientes em São Paulo, e em 21% nos recém-nascidos. Rodrigues (1989) por sua vez, realizou um estudo com gestantes do mesmo estado e verificou a ocorrência de anemia em 29,2%. No caso de Arruda (1990), o estudo foi realizado em Recife, e constatou-se anemia em 30,3% e 38,4% das gestantes e parturientes, respectivamente. Sultana, DeVita e Michelis (2016) realizaram estudo com pacientes com deficiência de ferro funcional e concluíram que baixas doses de vitamina C oral são eficientes contra a anemia, dados que afirmam a prevalência da anemia na população brasileira e a busca por soluções para esta doença.

A fortificação ou enriquecimento dos alimentos é definida como a “adição de um ou mais nutrientes essenciais, estejam eles contidos naturalmente ou não, em um alimento, com a proposta de prevenir ou corrigir alguma deficiência comprovada de um ou mais nutrientes em uma população ou em grupos específicos da população” (BRASIL, 1998; CODEX ALIMENTARIUS, 2015). A adição de vitaminas e minerais em alguns alimentos estão sendo bem aceitas já que com as mudanças na alimentação, como a ingestão de alimentos industrializados e as perdas nutricionais durante o processamento dos alimentos, há a necessidade suprir estes nutrientes perdidos de alguma maneira sendo uma estratégia de prevenção de doenças (VELLOZO e FISBERG, 2010).

3.6. Farinha de trigo

O trigo (*Triticum vulgare*) é uma planta monocotiledônea, pertencente à família *Gramineae*, possui grãos compostos por epicarpo, endocarpo e embrião, perfil ovoide alongado, com 5 mm a 8 mm eixo longitudinal e 2,5 mm a 4,5 mm no eixo transversal e apresenta cerca de 7 a 18% de proteína bruta, 60 a 68% de amido, 8 a 18% de umidade, 1,5 a 2% de extrato etéreo, 1,5 a 2% de minerais e 2 a 2,5% de celulose (D'ARCE e LIMA, 2014).

O grão de trigo é utilizado na alimentação humana e animal, apresentando valor nutritivo semelhante ao milho. Além disso, o trigo pode ser utilizado por indústrias na fabricação de bebidas alcoólicas, etanol, obtenção de amido e colas e matéria prima para indústrias moageiras (D'ARCE e LIMA, 2014). De acordo com dados do IBGE (2017), na safra de 2016 foram produzidos mais de 6,8 milhões de toneladas de grão de trigo pelo Brasil, quantidade bem superior ao visto no ano de 2000, de apenas 1,7 milhões de toneladas, evidenciando o aumento da produção deste grão no Brasil (Figura 5).

A farinha de trigo é o “produto obtido a partir da espécie *Triticum aestivum* ou de outras espécies do gênero *Triticum* reconhecidas (exceto *Triticum durum*) através do processo de moagem do grão de trigo beneficiado” e a farinha destinada a uso doméstico como a farinha de trigo integral é “obtida a partir do cereal limpo e com teor máximo de cinzas de 2,0% na base seca”; e a farinha de trigo especial (ou de primeira) é “obtida a partir do cereal limpo, desgerminado com teor máximo de cinzas de 0,65% na base seca, 98% do produto deverá passar através de peneira com abertura de malha de 250 µm” (BRASIL, 1996).

A farinha de trigo é composta nutricionalmente em média por 13% de umidade, 9,8% de proteínas, 1,4% de lipídeos, 0,8% de cinzas, 2,3% de fibras e praticamente 75% de carboidratos, sendo este seu maior constituinte (TACO, 2011). A qualidade da farinha está ligada a qualidade do grão, moagem e extração, já que é basicamente o endosperma moído, isto é, o grão é quebrado e reduzido a grânulos pequenos, menores ainda a cada passagem pelos moinhos, com umidade de até 15% para segurança microbiológica, formando uma farinha fina rica em proteína formadoras do glúten, a qual é empregada nos produtos de panificação, confeitaria, bolos e massas alimentícias (LIMA, 2014).

Figura 5. Produção de grãos de trigo em toneladas pelo Brasil – Anos safra 2000/2017 (IBGE, 2017).

Por serem consumidas por boa parte da população, de forma direta ou indireta, através de seus derivados, por exemplo em massas, pães e biscoitos as farinhas de trigo e milho foram escolhidas para a fortificação com o ferro no Brasil, com objetivo de aumentar a ingestão do mineral pela população. As farinhas devem obrigatoriamente ser enriquecidas em ferro (de 4 a 9 mg.100g⁻¹ de farinha) e ácido fólico (140 a 220 µg.100g⁻¹ de farinha), de acordo com a RDC n° 150 de 2017 visando a prevenção de anemia ferropriva e patologias do tubo neural (BRASIL, 2017; CAFÉ et al., 2003). O ácido fólico por sua vez, é necessário para o crescimento normal durante a fase reprodutiva que engloba gestação, lactação e na formação dos anticorpos, age como coenzima no metabolismo de aminoácidos, como a glicina, síntese de DNA e RNA, muito importante para a divisão celular, com isso, sua falta no organismo pode ocasionar alterações na síntese de DNA e cromossômicas (VÍTOLO, 2003).

Historicamente, a cultura do trigo era caracterizada como de inverno e produzida exclusivamente na Região Sul do Brasil. Porém, através de pesquisas para melhoramento genético, as plantações de trigo se espalharam por várias regiões do Brasil, como o Centro-Oeste e Sudeste. A produção concentra-se em Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo, de forma irrigada. Com a ampliação do cultivo do trigo para áreas além da região subtropical, é possível abastecer o mercado interno; evitar problemas de pragas e doenças e evitar problemas com condições climáticas. Além disso, é possível solucionar questões referentes à logística, armazenamento, beneficiamento e distribuição do trigo e seus derivados (CONAB, 2015).

Referências

ABBASI, S.; AZARI, S. Efficiency of novel iron microencapsulation techniques: Fortification of milk, **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 1927–1933, 2011.

- 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. Cap. 2.2, pag. 33-43.
- AGUILAR, K.; GARYÍN, A.; IBARZ, A.; AUGUSTO, P. E. D. Ascorbic acid stability in fruit juices during thermosonication. **Ultrasônicos Sonochemistry**, v. 37, p. 375-381. 2017.
- ALLEYNE, M.; HORNE, M. K.; MILLER, J. Individualized treatment for iron-deficiency anemia in adults. **The American Journal of Medicine**, v. 121, n. 11, 2008.
- ALVIM, I. D.; STEIN, M. A.; KOURY, I. P.; DANTAS, F. B. H.; CRUZ, C. L. de C. V. Comparison between the spray drying and spray chilling microcapsules contain ascorbic acid in a baked product application. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 689-694, 2016.
- ANDRE, C.M.; EVERS, D.; ZIEBEL, J.; GUIGNARD, C.; HAUSMAN, J.F.; BONIERBALE, M.; FELDE, T.Z.; BURGOS, G. In vitro bioaccessibility and bioavailability of iron from potatoes with varying vitamin C, carotenoid, and phenolic concentrations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n.41, p. 9012-9021, 2015.
- ANTUNES, P. L.; SGARBIERI, V. C. Effect of heat treatment on the toxicity and nutritive value of dry bean (*Phaseolus vulgaris* var. Rosinha G2) proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 5, p. 935-938, 1980.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farinha terá ácido fólico para combater anencefalia em bebês. **Diário Oficial da União**. Brasília, 28 de maio de 2002. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2002/120602.htm> > Acesso em: 01 de agosto de 2015.
- ARIMOTO, M.; ICHIKAWA, H.; FUKUMORI, Y. Microencapsulation of water-soluble macromolecules with acrylic terpolymers by the wurster coating process for colon-specific drug delivery. **Powder Technology**, Lausanne, v. 141, n. 3, p. 177-186, 2004.
- ARRUDA, I.K.G. Prevalência de anemia em gestantes de baixa renda: algumas variáveis associadas e sua repercussão no recém-nascido. **[Dissertação de Mestrado]**. Recife: Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco; 1990.
- ARSLAN, S.; ERBAS, M.; TONTUL, I.; TOPUZ, A. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. **Food Science and Technology**, v. 63, p. 685-690, 2015.
- ASHWAR, B. A.; GANI, A.; SHAH, A.; MASOODI, F. A. Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics. **Food Chemistry**, v. 239, p. 287-294, 2018.
- AUGUSTIN, M. A.; SANGUANSRI, L.; LOCKETT, T. Nano- and micro-encapsulated systems for enhancing the delivery of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1290, p. 107-112, 2013.
- AZEREDO, HMC Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n.1, p. 89-97, 2005.
- BALL, G. F. M. X. **Water-soluble vitamin assays in human nutrition**. Chapman & Hall: London, 1994.
- BARROW, C. J.; NOLAN, C.; JIN, Y. Stabilization of highly unsaturated fatty acids and delivery into foods. **Lipid Technology**, n. 5, v. 19, 2007.
- BASAMBOMBO, L. L.; CARMICHAEL, P.H.; CÔTÉ, S.; LAURIN, D. Use of vitamin E and C supplements for the prevention of cognitive decline. **Annals of Pharmacotherapy**. v. 51, n. 2, p. 118-124. 2017.
- BEARD, J.L.; DAWSON, H.; PIÑERO, D.J. Iron metabolism: A comprehensive review. **Nutrition Reviews**. v.54, n.10, p.295-317, 1996.

- BEM AMARA, C.; KIM, L.; OULAHAL, N.; DEGRAEVE, P.; GHARSALLAOUI, A. Using complexation for the microencapsulation of nisin in biopolymer matrices by spray-drying. **Food Chemistry**, v. 236, p. 32-40, 2017.
- BEMILLER, J. N.; HUBER, K. C. Carbohydrates. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's Food Chemistry**. 4. ed. New York: Crc Press, Cap. 3. p. 83-154. 2008.
- BENICHO, A.; ASERIN, A.; LUTZ, R.; GARTI, N. Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 3, p. 379-391, 2007.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Digestion and absorption**. In: Physiology, 3rd ed. (Berne, R. M. & Levy, M. N., eds.), pp. 688–716. Mosby-Year Book Inc., St. Louis, MO. 1993.
- BIANCHI, M.L.P. Biodisponibilidade de ferro em produtos industrializados de soja. São Paulo, 1988, 187 p. **Dissertação (doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)**. Universidade de São Paulo, USP.
- BIANCHI, M.L.P.; SILVA, H.C.; DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. Considerações sobre a biodisponibilidade do ferro dos alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 42, n. 2, p. 94-100, 1992.
- BÔAS, S.G.V.; ESPOSITO, E. Bioconservação do bagaço de maçã. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v.1, n. 14, p. 38-42, 2000.
- BONSMANN, S. S. G.; WALCZYK, T.; RENGGLI, S.; HURRELL, R. F. Oxalic acid does not influence nonhaem iron absorption in humans: a comparison of kale and spinach meals. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 62, p. 336–341, 2007.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 345 de 18 de julho de 1996. **Diário Oficial da União**; 22 de julho de 1996. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/portarias/354_96.htm> Acesso em 01 de fevereiro de 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 31 de 13 de janeiro de 1998. Aprova o regulamento técnico referente a alimentos adicionados de nutrientes essenciais. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 16 de janeiro de 1998. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/41aa2e004aaa77199e71de4600696f00/Portaria_SVS_MS_31_de_13_de_janeiro_de_1998.pdf?MOD=AJPERES > Acesso em: 17 de agosto de 2015.
- BRASIL. Resolução nº 150, de 13 de abril de 2017. Regulamento Técnico para o enriquecimento das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 de abril de 2017. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=37&data=17/04/2017>> Acesso em: 10 de maio de 2018.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- BRAZEL, C.S. Microencapsulation: offering solutions for the food industry. **Cereal Foods World**, v. 44, n. 6, p. 388-393, 1999.
- BRIONES-LABARCA, V.; GIOVAGNOLI-VICUÑA, C.; FIGUEROA-ALVAREZ, P.; QUISPE-FUENTES, I.; PÉREZ-WON, M. Extraction of carotene, vitamin C and antioxidant compounds from *Physalis peruviana* (Cape Gooseberry) assisted by high hydrostatic pressure. **Food and Nutrition Sciences**, v.4, p.109-118, 2013.
- BURGESS, D. J.; HICKEY, A. J. Microsphere technology and applications. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C., eds. **Encyclopedia of Pharmaceutical technology**. New York: Marcel Dekker, 1994. v. 10, p. 1-29.
- CAFÉ, S.L.; da FONSECA, P. S. M.; AMARAL, G. F.; MOTTA, M. F. dos S. R.; ROQUE, C. A. L.; ORMOND, J. G. P. Cadeia produtiva do trigo. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 18, p. 193-220, 2003.

- CALVACHE, J. N.; CUETO, M.; FARRONI, A.; PLA, M. de E.; GERSCHENSON, L. N. Antioxidant characterization of new dietary fiber concentrates from papaya pulp and peel (*Carica papaya* L.) **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 319–328, 2016.
- CAMPOS, F.M.; RIBEIRO, S.R.M.; LUCIA, C.M.D.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M.; STRINGHETA, P.C. Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 87- 91, 2009.
- CARDOSO, M. A. Ferro. In: CARDOSO, M. A. Nutrição e Metabolismo: **Nutrição humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2. ed. Cap. 16, p. 258-275. 2006.
- CARDOSO, P. C.; TOMAZINI, A. P. B.; STRINGHETA, P. C.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Vitamin C and carotenoids in organic and conventional fruits grown in Brazil. **Food Chemistry**, v. 126, p. 411–416, 2011.
- CARPENTER, C.E.; MAHONEY, A.W. Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v.31, n.4, p.333-367, 1992.
- CEREDA, M. P. **Manejo, uso e tratamento da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, v. 4, 320 p., 2000.
- CHIOCCHETTI, G. de M.; FERNANDES, E. A. de N.; BACCHI, M. A.; PAZIM, R. A.; SARRIES'S, S.R.V.; TOME, T. M. Mineral composition of fruit by-products evaluated by neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 40, p. 297-399. 2013.
- CODEX ALIMENTARIUS. **General principles for the addition of essential nutrients to foods**. Disponível em: < <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/> > Acesso em: 17 de agosto de 2015.
- COHEN, J. S.; YANG, T. C. S. Progress in food dehydration - review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, 1995.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento Safra Brasileira de Grãos**, Décimo primeiro levantamento Safra 2014/15, v. 2, n. 11, 2015.
- COMUNIAN, T. A.; ABBASPOURRAND, A.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; WEITZ, D. A. Fabrication of solid lipid microcapsules containing ascorbic acid using a microfluidic technique. **Food Chemistry**, v. 152, p 271-275, 2014.
- COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and ômega-3 fatty acids: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 442-457, 2016.
- COMUNIAN, T. A.; MONTERREY-QUINTERO, E.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; PICCONE, P.; PITTIA, P.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried chlorophyllide, a natural food colourant, using gum arabic, maltodextrin and soy protein isolate-based carrier systems. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 1259-1265, 2011.
- COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; ALVES, A. J. G.; MATOS JUNIOR, F. E.; BALIEIRO, J. C. de C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v. 52, n.1, p. 373–379. 2013.
- COZZOLINO, S.M.F.; PEDROSA, L.F.C. Grupo de trabalho: biodisponibilidade de nutrientes. **Boletim SBCTA**, v.29, n.1, p.53-56, 1995.

- DA COSTA, J. M. C.; FELIPE, É. M. de F.; MAIA, G. A.; BRASIL, I. M.; HERNANDEZ, F. F. H. Comparação dos parâmetros físico-químicos e químicos de pós alimentícios obtidos de resíduos de abacaxi. **Revista Ciência Agronômica**, v.38, n.2, p. 228-232, 2007.
- DA SILVA, J. K.; CAZARIN, C. B. B.; BATISTA, A. G.; MAROSTICA JUNIOR, M. Effects of passion fruit (*Passiflora edulis*) byproduct intake in antioxidant status of Wistar rats tissues, **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 1213-1219, 2014.
- DA SILVA, L. M. R.; DE FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G. P.; DE FIGUEIREDO, R. W.; BRASIL, I. M.; GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, p. 398–404, 2014.
- DAMASCENO, K. A.; GONÇALVES, C. A. A.; PEREIRA, G. S., COSTA, L. L.; CAMPAGNOL, P. C. B.; DE ALMEIDA, P. L., ARANTES-PEREIRA, L. Development of cereal bars containing pineapple peel flour (*Ananas Comosus L. Merrill*) **Journal of Food Quality**. v. 39, p.417-424. 2016.
- D'ARCE, R. D.; LIMA, U. de A. Matérias-primas amiláceas. In: LIMA, Urgel de Almeida. **Matérias-Primas dos alimentos: Parte I: Origem Vegetal Parte II: Origem Animal**. São Paulo: Blucher, 2. ed., cap. 4, p. 33-117. 2014.
- DE CAMARGO, A. C.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; GALLO, C. R.; SHAHIDI, F. Gamma-irradiation induced changes in microbiological status, phenolic profile and antioxidant activity of peanut skin. **Journal of functional foods**, v. 12, p. 129-143, 2015.
- DE MOURA, S. C. R.; BERLING, C. L.; GERMERC, S. P. M.; ALVIM, I. D.; HUBINGERA, M. D. Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by ionic gelation: pigment stability during storage of microparticles. **Food Chemistry**, v. 241, p. 317-327, 2018.
- DE OLIVEIRA, G. R.; SANTOS, J. T. S.; CAMPOS, A. F. P.; NUNES, T. P.; RUSSO, S. L.; JUNIOR, A. M. de O. Prospecção tecnológica: processo de liofilização na indústria de alimentos. **Revista Geintec - Gestão, inovação e tecnologia**, v.3, n.1, p. 92-102, 2012.
- DEPYPERE, F.; DEWETTINCK, K.; RONSSE, F.; PIETERS, J. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. **Applied Biotechnology Food Science and Policy**, v.1, n.2, p.75-94, 2003.
- DEUTSCH, J. Dehydroascorbic acid: review. **Journal of Chromatography A**, v. 881, 299–307. 2000.
- DOS SANTOS, C. M.; de ABREU, C. M. P.; FREIRE, J. M.; QUEIROZ, E. de R.; MENDONÇA, M. M. Chemical characterization of the flour of peel and seed from two papaya cultivars. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 34, n. 2, p. 353-357, 2014.
- ESTEVINHO, B.N.; CARLAN, I.; BLAGA, A.; ROCHA, F. Soluble vitamins (vitamin B12 and vitamin C) microencapsulated with different biopolymers by a spray drying process. **Powder Technology**, v. 289, p.71-78. 2016.
- 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, p.1-22, 2012.
- EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2.ed, 652 p. 2005.
- 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**, Campinas, v.28 n.2, 2008.

- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015**. OECD Publishing, Paris, 2015.
- FAVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 19, n. 4, p. 485-494, 2002.
- FAVARO-TRINDADE, C.S. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. Tecnologia de Alimentos. **Revista Brasileira**, v.11, n.2, p.103-112, 2008.
- FELLOWS, P. J. Liofilização e concentração por congelamento. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Práticas**, ed. 2, p. 453-462, Porto Alegre: Artmed, 2006.
- FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUN, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá – aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 101-102, 2004.
- FIALHO, E. Fontes alimentares, biodisponibilidade de alimentos e fome oculta. In: RAMALHO, A. **Fome Oculta: diagnóstico, tratamento e prevenção**. Editora Atheneu, Cap. 3, p. 99-120, 2009.
- GANGLOFF, M.; GLAHN, R.; MILLER, D.; VAN CAMPEN, D. Assessment of iron availability using combined in vitro digestion and Caco-2 cell culture. **Nutrition Research**, v. 16, p. 479-487. 1996.
- GANJU, S.; GOGATE, P. R. A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. **Journal of Food Engineering**, v. 215, p. 84-96, 2017.
- GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A., SAUREL, R. Aplicações de spray-drying em microencapsulação de ingredientes alimentares: uma visão geral. **Food Research International**, v.40, n.9, p.1107-1121, 2007.
- GIANNAKOUROU, M.C.; TAOUKIS, P. S. Kinetic modelling of vitamin C loss in frozen green vegetables under variable storage conditions. **Food Chemistry**, v.83, p. 33–4. 2003.
- GIBBS, B.F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.50, p.213-224, 1999.
- GIUNTINI, E.B.; LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. Potencial de fibra alimentar em países Íbero-Americanos: alimentos, produtos e resíduos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.53, n.1, p.1-7, 2003.
- 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**, Philadelphia, v. 128, n.9, p. 1555–1561, 1998.
- GOKMEN, V.; KAHRAMAN, N.; DEMIR, N.; ACAR, J. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 309-316. 2000.
- GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; HERNÁNDEZ-ROJAS, M.; TARANCÓN, P.; TENON, M.; FEUILLÉRE, N.; VELEZ RUIZ, J. F.; FISZMAN, S.; LÓPEZ-RUBIO, A. Impact of microencapsulation within electrosprayed proteins on the formulation of green tea extract-enriched biscuits. **Food Science and Technology**, v. 81, p. 77-86, 2017.
- GUL, K.; TAK, A.; SINGH, A. K.; SINGH, P.; YOUSUF, B.; WANI, A. A. Chemistry, encapsulation, and health benefits of β -carotene - a review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 1, p. 1-12, 2015.
- GUTCHO, M. H. **Freeze Drying processes for the food industry**. n. 41, New Jersey: Noyes Data, 1977.
- GUYTON, A. C., HALL, J. E. **Secretory functions of the alimentary tract**. In: Textbook of Medical Physiology, 9th ed. (Guyton, A. C. & Hall, J. E., eds.), p. 815–832. W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA. 1996.

- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9.ed, 1014 p. 1997.
- HADLER, M.C.C.M.; JULIANO, Y.; SIGULEM, D. M. Anemia do lactente: etiologia e prevalência. **Jornal de pediatria**, v. 78, n. 4, p. 321-326, 2002.
- HEIDEBACH, T.; FORST, P.; KULOZIK. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. 4, v.52, p. 291-311, 2012.
- HERBING, A.L.; RENARD, C. M. G. C. Factors that impact the stability of vitamin C at intermediate temperatures in a food matrix. **Food Chemistry**, v. 220, p. 444-451. 2017.
- HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. **Food Chemistry**, v. 96, p. 654-664. 2006.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1612#resultado> Acessado em 20 de dezembro de 2017.
- KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 39, n. 10, p. 1221-1227, 2006.
- KAS, H. S.; ONER, L. Microencapsulation using coacervation / phase separation: an overview of the technique and applications. In: WISE, D. L., ed. **Handbook of Pharmaceutical controlled release technology**. New York: Marcel-Dekker. p. 301-328, 2000.
- KHEDKAR, M. A.; NIMBALKAR, P. R.; GAIKWAD, S. G.; CHAVAN, P. V.; BANKAR, S. B. Sustainable biobutanol production from pineapple waste by using *Clostridium acetobutylicum* B 527: Drying kinetics study. **Bioresource Technology**. v. 225, p. 359-366, 2017.
- KUJUR, A.; KIRAN, S.; DUBEY, N. K.; PRAKASH, B. Microencapsulation of *Gaultheria procumbens* essential oil using chitosan-cinnamic acid microgel: improvement of antimicrobial activity, stability and mode of action. **Food Science and Technology**, v. 86, p. 132-138, 2017.
- LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p.167-198, 2003.
- LEVINE, M.; RUMSEY, S.; WANG, Y.; PARK, J.; KWON, O.; XU, W.; AMANO, N. Vitamina C. In: Ziegler, E.E.; FILER JR, L. J. **Present knowledge in nutrition**, ILSI Press, p. 147-159. 1996.
- LIMA, U. de A. Matérias-primas amiláceas. In: LIMA, Urgel de Almeida. **Matérias-Primas dos alimentos: Parte I: Origem Vegetal Parte II: Origem Animal**. São Paulo: Blucher, 2. ed, cap. 4, p. 33-117. 2014.
- LORENZI, H.; BACHER, L. B.; LACERDA, M. T. C.; SARTORI, S. F. Brazilian fruit and exotic cultivated. **Instituto Plantarum de Estudos da flora Ltda**. SP. 640 p. 2006.
- MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – A review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1-21, 2006.
- MARTIN, J.G.P.; MATTA JÚNIOR, M.D.; ALMEIDA, M.A.; SANTOS, T.; SPOTO, M.H.F. Avaliação sensorial de bolo com resíduo de casca de abacaxi para suplementação do teor de fibras. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.14, n.3, p.281-287, 2012.
- MARTINS, C. R.; FARIAS, R. de M. Produção de alimentos x desperdício: Tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola – revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 9, n. 1, p. 20-32. 2002.
- MBULIGWE, S. E.; KASEVA, M. E. Assessment of industrial solid waste management and resource recovery practices in Tanzania. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 47, p. 260-276, 2006.

- MORAIS, D. R.; ROTTA, E. M.; SARGI, S.C.; BONAFE, E. G.; SUZUKI, R. M.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V. Proximate composition, mineral contents and fatty acid composition of the different parts and dried peels of tropical fruits cultivated in Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, No. 2, 308-318, 2017.
- MORAIS, D.R.; ROTTA, E. M.; SARGI, S. C.; SCHMIDT, E. M.; BONAFE, E. G.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. H. F.; VISENTAINER, J. V. Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI(–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. **Food Research International**, v.77, p. 392-399, 2015.
- NYSSONEN, K.; SALONEN, J.T.; PARVIAINEN, M.T. Ascorbic acid. In: Leenheer, A.P.D., Lambert, E., Boclaer, J.F. (Eds.), **Modern Chromatographic Analysis of Vitamins**. Marcel Dekker, New York, NY, USA, p. 271–300. 2000.
- ORGANIZAÇÃO MUNDAL DA SAÚDE (OMS). Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control. A guide for programme managers. Geneva. **World Health Organization**. 2001.
- PAES, J.; CUNHA, C. R.; VIOTTO, L. A. Concentration of lycopene in the pulp of papaya (*Cariaca papaya* L.) by ultrafiltration on a pilot scale. **Food and Bioproducts Processing**, v. 96, p. 296–305, 2015.
- PARK, S. J.; GARCIA, C.V.; SHIN, G. H.; KIM, J. T. Development of nanostructured lipid carriers for the encapsulation and controlled release of vitamin D3. **Food Chemistry**, v. 225 p. 213–219. 2017.
- PATIDAR, M. K.; NIGHOJKAR, S.; KUMAR, A.; NIGHOJKAR, A. Papaya peel valorization for production of acidic pectin methyltransferase by *Aspergillus tubingensis* and its application for fruit juice clarification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.6, p.58–67 2016.
- PHILLIPS, K. M.; TARRAGO-TRANI, M. T.; GEBHARDT, S.E.; EXLER, J.; PATTERSON, K. Y.; HAYTOWITZ, D. B.; PEHRSSON, P. R.; HOLDEN, J. M. Stability of vitamin C in frozen raw fruit and vegetable homogenates. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 253–259. 2010.
- PSZCZOLA, D. Encapsulated ingredients: providing the right fit. **Food Technology**, v.52, n.12, p.70-77, 1998.
- QUINTAES, K. D., BARBERÁ, R.; CILLA, A. Iron bioavailability in iron-fortified cereal foods: The contribution of in vitro studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. 57, v. 10, p. 2028-2041, 2017.
- RAIKOS, V. Encapsulation of vitamin E in edible orange oil-in-water emulsion beverages: Influence of heating temperature on physicochemical stability during chilled storage. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 155-162, 2017.
- RÉ, M. I. Microencapsulação: Em busca de produtos inteligentes. **Ciência Hoje**, v. 27, n. 162, p. 24-29, 2000.
- RÉ, M. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 195-236. 1998.
- REILLY, C. Too much of a good thing? The problem of trace element fortification of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p. 139-142, 1996.
- RIBEIRO, P. F. A.; STRINGHETA, P.C.; MENDONÇA, A. C.; SANT'ANA, H. M .P. Levels of vitamin C, β -carotene and minerals in camu-camu cultivated in different environments. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.3, p.567-572, 2016.
- RISCH, S. J. **Encapsulation: Overview of Uses and Techniques**. Cap. 1, 1995.
- RODRIGUES, O.T.S. Estudo da influência de anemia de desnutrição materna sobre o peso ao nascer. **[Dissertação de Mestrado]**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 1989.
- RODSAMRANA, P.; SOTHORNVIT, R. Microencapsulation of thai rice grass (O. Sativa cv. Khao Dawk Mali 105) extract incorporated to form bioactive carboxymethyl cellulose edible film. **Food Chemistry**, v. 242, p. 239-246, 2018.

- ROSELL, C.M.; ROJAS, J.A.; BENEDITO DE BARBER, C. Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.75-81, 2001.
- SABINO, L.B.S.; GONZAGA, M.L.C.; SOARES, D.J.; LIMA, A.C.S.; LIMA, J.S.S.; ALMEIDA, M.M.B.; SOUSA, P.H.M.; FIGUEIREDO, R.W. Bioactive compounds, antioxidant activity and minerals in flours prepared with tropical fruit peels. **Acta Alimentaria**, v. 44, n. 4, p. 520–526. 2015.
- SALEH, M.; AL-ISMAIL, K.; EL-DIJANI, L.; AL-KHATIB, H. Effect of microencapsulation of vitamin C with gum arabic, whey protein, isolate and some blends on its stability. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 75, p. 176-180, 2016.
- SANDBERG, A.S. Methods and options in vitro dialyzability benefits and limitations. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 75, p. 395–404. 2005.
- SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C.R.F. Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 16, p. 26-30, 2000.
- SANTOS, M. G.; BOZZA, F.T.; THOMAZINI, M.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. **Food Chemistry**, v. 171, p. 32–39, 2015.
- SANTOS, M.A.T. Efeito do cozimento sobre alguns fatores antinutricionais em folhas de brócoli, couve-flor e couve. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n. 2, p. 294-301, 2006.
- SCHROOYEN, P. M. M.; VAN DER MEER, R.; KRUIF, C. G. De. Microencapsulation: its application in nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, p. 475-479, 2001.
- SELANI, M.M.; MARGIOTTA, G.B.; PIEDADE, S.M.S.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Physicochemical, sensory and cooking properties of low fat beef burgers with addition of fruit byproducts and canola oil. **International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering**, p. 58–65, 2015.
- SGARBIERI, V.C. **Alimentação e Nutrição**. São Paulo: Almed; 1987.
- SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.
- SHISHIR, M. R. I.; CHEN, W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science & Technology**, v. 65, p. 49-67, 2017.
- SILVA, V. L.; COZZOLINO, S. M. F. Vitamina C (ácido ascórbico). In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3. ed. Barueri: Manole, p. 253-97, 2009.
- SOUSA, M.B.; VIEIRA, L.M.; da SILVA, M. de J. M.; de LIMA, A. Nutritional characterization and antioxidant compounds in pulp residues of tropical fruits. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 554-559, 2011.
- SOUZA, O.; SANTOS, IE. Importância dos subprodutos agropecuários na alimentação de animais. **Comunicado Técnico**: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aracajú-CE, 2002.
- SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, n. 2, p. 12-20, 2006.
- SULTANA, T.; DEVITA, M.V.; MICHELIS, M.F. Oral vitamin C supplementation reduces erythropoietin requirement in hemodialysis patients with functional iron deficiency. **International Urology and Nephrology**, v. 48, n. 9, p. 1519–1524. 2016.

- SZARFARC, S.C. Anemia ferropriva em parturientes e recém-nascidos de um grupo populacional de baixo nível sócio-econômico em São Paulo. **[Tese de Doutorado]** São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 1972.
- TACO. **Tabela Brasileira de Composição de alimentos**. Campinas: UNICAMP (Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação), 4ª Edição. 161 p. 2011.
- TIMILSENA, Y. P.; WANG, B.; ADHIKARI, R.; ADHIKARI, B. Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 369-381, 2017.
- TOTH, I., ROGERS, J., MCPHEE, J.A., ELIOTT, S. M., ABRAMSON, S.L., BRIDGES, K. R. Ascorbic acid enhances iron-induced ferritin translation in human leukemia and hepatoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 6, p. 2846-52, 1995.
- TRINDADE, M. A.; GROSSO, C. R. F. The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice starch and in gum arabic. **Journal of Microencapsulation**, v. 17, n. 2, p. 169-176. 2000.
- VAN CAMPEN, D.R.; GLAHN, R.P. Micronutrient bioavailability techniques: accuracy, problems and limitations. **Field Crops Research**. V.60, p.93-113, 1999.
- VELLOZO, E.P.; FISBERG, M. O impacto da fortificação de alimentos na prevenção da deficiência de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São Paulo, v. 32 supl.2, 2010.
- VÍTOLO, M.R. **Nutrição: da gestação à adolescência**. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso Editores, 2003.
- WANI, A. A.; SINGH, P.; SHAH, M. A.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U.; GUL, K.; WANI, I. A. Rice starch diversity: Effects on structural, morphological, thermal, and physicochemical properties—A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO. **Guideline: Daily iron supplementation in adult women and adolescent girls**. Geneva, World Health Organization, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO. **The Global prevalence of anemia in 2011**. Geneva, World Health Organization, 2015.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO. **Worldwide prevalence of anemia 1993-2005**. Geneva, World Health Organization, 2008.

4. MICROENCAPSULAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO EXTRAÍDO DE SUBPRODUTOS DE FRUTAS

RESUMO

Os hábitos saudáveis promovem maior consumo de frutas e vegetais, aumentando também a quantidade dos subprodutos produzidos industrialmente como cascas, bagaços, sementes e caroços. Os resíduos agroindustriais podem ser utilizados como subprodutos nas indústrias ou como fonte de nutrientes, por apresentarem em sua composição fibras, proteínas, minerais, vitaminas, carboidratos e compostos bioativos que favorecem o bem estar e a saúde. Um exemplo desses nutrientes é o ácido ascórbico, composto antioxidante, muito instável e suscetível a oxidação. A aplicação da tecnologia da microencapsulação visa preservar as características dos compostos de interesse, aumentar sua estabilidade, facilitar o manuseio e proteger contra umidade e calor. A secagem por atomização e emulsão dupla seguida da coacervação complexa são técnicas utilizadas para microencapsular compostos hidrofílicos. A liofilização é uma técnica de secagem que não utiliza o calor para a evaporação da água e preserva as qualidades sensoriais dos alimentos. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo realizar a extração do ácido ascórbico a partir de subprodutos agroindustriais de frutas e aplicar a tecnologia da microencapsulação e liofilização ao extrato obtido. Primeiramente, foram obtidas farinhas de cascas de frutas de mamão e abacaxi liofilizadas para o prosseguimento das análises. O extrato hidrofílico de mamão (extraído com ácido oxálico 0,5%) foi selecionado para as etapas de microencapsulação e liofilização, pela maior concentração de ácido ascórbico determinada pela análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os tratamentos aplicados foram: micropartículas obtidas por atomização na proporção de 1:1 (T1), micropartículas obtidas por atomização na proporção de 1:2 (T2), micropartículas obtidas por atomização na proporção de 1:3 (T3), micropartículas obtidas por coacervação complexa com 50% de emulsão extrato líquido + óleo de milho em relação ao polímero (T4), micropartículas obtidas por coacervação complexa com 75% de emulsão extrato líquido + óleo de milho em relação ao polímero (T5) e extrato da farinha de subprodutos de mamão liofilizado (T6). Foi realizada a caracterização dos tratamentos pelas análises: umidade, atividade de água, solubilidade, higroscopicidade, análises morfológicas, tamanho das partículas e teor de ácido ascórbico. As amostras apresentaram teores de umidade e atividade de água que garantem a segurança do produto como ingrediente alimentício. A solubilidade das micropartículas produzidas por spray drying foi significativamente superior à dos outros tratamentos (T4, T5 e T6) aplicados ($p < 0,05$). O extrato liofilizado apresentou maior teor de ácido ascórbico e higroscopicidade em relação aos resultados obtidos pelos outros tratamentos ($p < 0,05$). Os tratamentos mostraram diferenças morfológicas entre si, devido aos métodos diferentes aplicados e os materiais de parede utilizados. Como conclusão, foi possível extrair o ácido ascórbico de subprodutos agroindustriais de mamão e aplicar a microencapsulação e liofilização, mantendo concentrações do composto ativo para alguns tratamentos.

Palavras-chave: Vitamina C; Compostos bioativos; Spray drying; Coacervação complexa; Liofilização

ABSTRACT

Healthy habits increase the consumption of fruits and vegetables, also increasing the quantity of produced by-products such as peels, bagasses, seeds, and cores. The residues can be used as by-products in the industry or as source of nutrients, once they present fibers, proteins, vitamins, minerals, carbohydrates, and bioactive compounds in their composition, favoring the well-being and health. An example of such nutrients is the ascorbic acid, an antioxidant compound, very instable and susceptible to oxidation. The application of the microencapsulation technology aims at preserving the characteristics of the compounds, increasing their stability, easing the management, and protecting them against humidity and heat. The spray drying and double emulsion followed by the complex coacervation are used for microencapsulating hydrophilic compounds. Lyophilization, is also a drying technique, but it does not use heat and preserves the sensorial qualities of the food. Therefore, the objective of the

present study was to promote the extraction of the ascorbic acid from agro-industrial residues of fruits and apply the microencapsulation and lyophilization technologies to the obtained extract. First, lyophilized flours made with peels of papaya and pineapple were obtained for further analyses. The papaya hydrophilic extract (extracted with oxalic acid 0.5%) was selected for the microencapsulation and lyophilization stages due to its higher concentration of ascorbic acid, determined by the analysis by high performance liquid chromatography (HPLC). The treatments obtained were: spray dried microparticles in the ratio 1:1 (T1), spray dried microparticles in the ratio 1:2 (T2), spray-dried microparticles in the ratio 1:3 (T3), microparticles obtained by double emulsion followed by complex coacervation with 50% emulsion liquid extract + corn oil in relation to the polymer (T4), microparticles obtained by double emulsion followed by complex coacervation with 75% emulsion liquid extract + corn oil in relation to the polymer (T5) and lyophilized extract of papaya by-products flour (T6). Characterization analyses of the treatments were performed: humidity, water activity, solubility, hygroscopicity, morphological analyses, ascorbic acid content and particle size. The results for humidity (less than 13%) and water activity (less than 0.3) showed microbiological security for all treatments. The treatments obtained by spray drying was more soluble when compared to the other treatments (T4, T5 and T6) ($p < 0.05$). The papaya lyophilized extract present higher concentration of ascorbic acid ($p < 0.05$), and higher hygroscopicity ($p < 0.05$) when compared to the other treatments. Regarding the morphology, the treatments presented differences mainly due to the technique applied, the used materials and the particle size. In conclusion, it was possible to extract ascorbic acid from fruit by-products and apply the microencapsulation and lyophilization to this extract, keeping the ascorbic acid levels for some treatments.

Keywords: Vitamin C; Bioactive compounds; Spray drying; Complex coacervation; Freeze drying

4.1. Introdução

A produção e o consumo de frutas in natura têm apresentado crescimento, assim como o seu mercado de produtos processados como sucos, polpas, conservas e frutas minimamente processadas, que oferecem ao consumidor, além de uma dieta balanceada, praticidade. Juntamente com estes novos hábitos e o crescimento deste mercado, a quantidade de subprodutos produzidos pelas agroindústrias tem aumentado.

A ingestão de frutas e vegetais tem sido tema das pesquisas científicas nos últimos anos por estarem associados a saúde e possuírem em sua composição minerais, vitaminas, fibras e os chamados fitoquímicos, compostos relacionados ao bem estar e à saúde (PALAFOX-CARLOS, AYALA-ZAVALA, GONZÁLEZ-AGUILAR, 2011). As cascas e sementes são resíduos gerados em grandes quantidades, que podem ser utilizados como subprodutos, na forma de aditivos alimentares ou como suplementos de elevado valor nutricional. Além disso, sua recuperação pode ser economicamente interessante (DOS SANTOS et al., 2014).

As cascas de frutos como manga, mamão, abacaxi, por exemplo, são ricas em compostos bioativos que apresentam, entre outras propriedades, atividade antioxidante, vitaminas e minerais, podem ser empregadas na composição de biscoitos, macarrão e barras de cereais (SABINO et al., 2015). Um destes compostos bioativos citados é a vitamina C, que mesmo sendo muito instável, tem sido utilizado como ingrediente ativo em alguns alimentos por possuir propriedades antioxidantes (COMUNIAN et al., 2013).

Quando compostos de interesse são instáveis e frágeis, como as vitaminas, técnicas como a microencapsulação podem ser utilizadas, com o objetivo de preservar as características dos materiais, aumentar sua estabilidade, facilitar o manuseio e proteger os compostos contra umidade e calor (SHAHIDI e HAN, 1993; BRAZEL, 1999; GIBBS et al., 1999), fatores que favorecem a degradação.

Muitas técnicas de microencapsulação podem ser empregadas, tudo depende do composto que deseja isolar. A secagem por atomização ou spray drying é uma das técnicas vastamente empregada na produção de café instantâneo,

chás e leite em pó, na qual o líquido a ser seco é bombeado e atomizado através de um bico, gerando pequenas gotículas que são secas rapidamente com ar quente, minimizando os danos causados pelo calor (COHEN e YANG, 1995). Além da secagem por spray drying, substâncias hidrofílicas como a vitamina C vem sendo microencapsuladas por emulsão dupla seguida da coacervação complexa, técnica a qual é considerada o método original de encapsulamento de compostos e ocorre de maneira simples, envolvendo um ou mais tipos de polímeros e o material de interesse (RISCH, 1995; MADENE et al., 2006; COMUNIAN et al., 2013).

Além da microencapsulação, podem-se utilizar métodos que removam a parte líquida de um material para aumentar a estabilidade preservando suas características, como na liofilização ou freeze drying. Este processo consiste na secagem de um material sem utilizar calor apenas o alto vácuo, no qual a água que encontra-se congelada é removida do alimento sem passar pelo estado líquido (sublimação), preservando as qualidades sensoriais dos alimentos (MUJUMDAR, 1987; COHEN e YANG, 1995).

Diante deste contexto, o presente estudo teve como objetivo realizar a extração do ácido ascórbico a partir de subprodutos agroindustriais de frutas (abacaxi e mamão), aplicar a tecnologia de liofilização e microencapsulação por dois métodos diferentes (spray drying e emulsão dupla seguida da coacervação complexa) e caracterizar as partículas obtidas quanto a morfologia, umidade, atividade de água, solubilidade, higroscopicidade e teor do ácido ascórbico. O estudo contribuirá para agregar valor aos subprodutos agroindustriais e seu processamento, bem como a obtenção de compostos bioativos.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Material

Para desenvolvimento do presente estudo, os materiais para a extração do ácido ascórbico foram as cascas de abacaxi e mamão, cedidos pela indústria de alimentos de minimamente processados “*Della Natural*” localizada no distrito de Engenheiro Coelho-SP (-22.4882, -47.2158). Na indústria, as frutas passaram por um processo prévio de sanitização com aplicação de dióxido de cloro (1 mL.L⁻¹). O material congelado foi transportado em caixas térmicas com gelo para manter a temperatura adequada até o Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição – LAN/ESALQ/USP.

No caso da microencapsulação por spray drying, utilizou-se a goma arábica (Nexira, São Paulo, Brasil) como material de parede e o extrato hidrofílico (com 2% de sólidos) obtido da farinha de subprodutos de mamão com ácido ascórbico na concentração de 3,02 mg.g de extrato líquido⁻¹.

Para o processo de microencapsulação por coacervação complexa, utilizou-se o mesmo extrato hidrofílico obtido da farinha de subprodutos de mamão com ácido ascórbico como núcleo. O óleo de milho comercial (Salada, Brasil) foi empregado na produção da emulsão simples (A/O). A gelatina alimentícia de origem suína (Gelita do Brasil, Mococa, Brasil) e goma arábica (Nexira, São Paulo, Brasil) foram aplicadas como agentes encapsulantes e como emulsificante utilizou-se o PGPR 90 (Danisco, Dinamarca).

4.2.2. Métodos

4.2.2.1. Liofilização e moagem das cascas

Foi realizada a secagem por sublimação em liofilizador K 108 (Liotop, São Carlos, Brasil) das cascas, processo realizado em bateladas utilizando 2 kg de casca de fruta por vez, com duração de aproximadamente 76 h, temperaturas variando de -89 a -101 °C e pressão entre 29-39 µHg. Após esta etapa, foram realizadas a moagem das cascas secas em processador e posteriormente em moinho analítico A11 Basic Mill (Ika, Campinas, Brasil) para a obtenção de uma farinha fina e homogênea.

Para o armazenamento, a farinha de cascas de abacaxi e farinha de cascas de mamão foram pesadas separadamente e acondicionadas em sacos metalizados *zip lock* (23 cm x 15,5 cm) compostos por poliéster que barra a passagem de oxigênio e umidade na camada externa e polietileno na camada interna, responsável pela estrutura e resistência das embalagens (TRADBOR, 2018), além de evitar a passagem da luz durante o congelamento (-18 °C). A farinha de subprodutos foi utilizada para a extração do ácido ascórbico.

4.2.2.1.1. Umidade das farinhas de subprodutos de frutas

A umidade das farinhas foi avaliada pelo analisador por infravermelho de umidade modelo MB 35 (Ohanus, Ohio, EUA). Cerca de 0,5 g de amostra foram pesadas em recipientes de alumínio, em triplicata, submetidas a temperatura de 105°C e pesadas posteriormente.

4.2.2.2. Obtenção do extrato das farinhas de subprodutos de frutas

Foram pesadas 2 g de farinha de abacaxi e mamão separadamente, adicionadas de 40 mL de ácido oxálico (Synth, São Paulo, Brasil) 0,5% (m/v) protegidas com papel alumínio para evitar a oxidação e degradação pela luz e encaminhadas para a homogeneização em mixer 400 watt (Philips Walita). Em seguida, a solução foi mantida em agitação por 60 min para maior extração do ácido ascórbico. A filtração foi feita vácuo com cadinhos de placa porosa e o filtrado foi centrifugado por 10 minutos a 5000 rpm a 10 °C de acordo com Campos et al. (2009) e Briones-Labarca et al. (2013) com modificações. O volume do sobrenadante foi completado para 50 mL em balão e acondicionado em recipiente âmbar fechado, mantido sob congelamento a (-80 °C) até a quantificação do ácido ascórbico.

4.2.2.3. Quantificação de ácido ascórbico por CLAE

Para a avaliação do ácido ascórbico (AA) presente nos extratos líquidos, de abacaxi e mamão, foi realizada a quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de acordo com a metodologia utilizada por Bresolin e Hubinger (2014), com modificações na preparação das amostras descritas a seguir.

Foram pesadas 1,5 g das amostras dos extratos de mamão e abacaxi liofilizados, em seguida, solubilizadas em 10 mL de ácido metafosfórico (Dinâmica, São Paulo, Brasil) 3% (m/v). Posteriormente, foram mantidas em banho ultrassom por 10 min e centrifugadas por 5 min a 5000 rpm a 10 °C. As amostras foram filtradas em filtros de seringa

de politetrafluoroetileno (PTFE) 0,22 μm diretamente nos vials. Foram injetados 20 μL de amostra no sistema cromatográfico. A leitura foi realizada no comprimento de 245 nm.

O cromatógrafo utilizado foi o modelo Shimadzu 20AD, equipado com sistema de bombeamento modelo LC-6AD, injetor automático de amostras modelo SIL-10AF, forno de coluna modelo CTO-10ASVP, comunicador modelo SCL-10AVP e detector UV modelo SPD-20AV. A coluna Waters Spherisorb ODS2 (C18) 59 (4,6 x 250 mm, 5 μm) foi utilizada para a separação dos compostos mantida a temperatura de 25 °C pelo forno da coluna. A fase móvel utilizada foi tampão fosfato de potássio monobásico anidro pH 2,5 em temperatura ambiente ajustada com ácido ortofosfórico, no fluxo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Para a identificação e quantificação do pico referente ao ácido ascórbico das amostras foi utilizada a solução estoque (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) do padrão de ácido L-ascórbico 99% (Sigma-Aldrich, Cotia, Brasil). Foram preparadas então as soluções nas seguintes concentrações: 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 e 64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácido ascórbico. As soluções diluídas foram injetadas separadamente e em triplicata nas condições acima descritas. Utilizou-se as áreas dos picos e os tempos de retenção dos padrões para a comparação e quantificação do ácido ascórbico das amostras que foram injetadas posteriormente.

A quantificação de AA também foi realizada para os tratamentos T1, T2, T3, T6, seguindo o mesmo procedimento, foram pesadas 1,5 g das amostras secas, em seguida, solubilizadas em 10 mL de ácido metafosfórico (3% m/v). Posteriormente, foram mantidas em banho ultrassom por 10 min e centrifugadas por 5 min a 5000 rpm a 10 °C. As amostras foram filtradas em filtros de seringa de politetrafluoroetileno (PTFE) 0,22 μm diretamente nos vials. Foram injetados 20 μL de amostra no sistema cromatográfico. A leitura foi realizada no comprimento de 245 nm.

Para os tratamentos T4 e T5, utilizou-se o material digerido seco (tópico 4.2.2.3.1) para a quantificação, que seguiu as mesmas etapas citadas acima. Em todos os tratamentos a quantificação do AA foi total.

4.2.2.3.1. Quebra das micropartículas coacervadas

A metodologia de quebra das micropartículas coacervadas foi a simulação da digestão in vitro do material, já que estas precisam ser desestabilizadas para que possam romper e liberar o composto ativo, o que pode ser causado por uma ruptura física, aquecimento, mudanças no pH ou reações químicas (SHAY, 1994; BARBOSA-CANÓVAS et al., 2005).

Foram pesados cerca de 1,5 g de amostra (T4 e T5) em tubos de 50 mL e 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⁻¹ (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^{-1} , 6 mmol.L de CaCl_2^{-1} e 5 mmol.L KCl^{-1} 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, temperatura 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 1N e adicionou-se 2 mL de solução de pepsina (Sigma® P7000) na concentração de 10000 unidades.mL⁻¹ 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 1 h. Em seguida, a reação

gástrica foi cessada pelo ajuste do pH para 6,0 com NaHCO_3 1M. Adicionou-se 3 mL de solução de extrato de bile (Sigma® B8631) na concentração 40 mg.mL^{-1} em 100 mM NaHCO_3 e 2 mL de solução de pancreatina (Sigma® P1750) e lipase (Sigma® L3126) nas concentrações de $\sim 4000 \text{ unidades.mL}^{-1}$ em 100 mM NaHCO_3 e $\sim 1000 \text{ unidades.mL}^{-1}$ em 100 mM NaHCO_3 , respectivamente, o pH foi ajustado para 6,5 e o volume ajustado para 50 mL. Incubou-se os tubos à 37°C por 2 h com agitação (120 rpm) para simulação da etapa intestinal (duodenal). O material digerido foi submetido a liofilização para obtenção do material seco.

4.2.2.3.2. Rendimento das micropartículas secas por atomização

O rendimento médio por tratamento (RMT) do processo de microencapsulação por spray drying (T1, T2 e T3) foi calculado. Utilizou-se a equação (Figura 6):

$$\text{RMT (\%)} = \left\{ \frac{\text{peso das micropartículas obtidas após secagem (g)}}{(\text{teor de sólidos da goma arábica (g)} + \text{teor de sólidos do extrato líquido (g)})} \right\} \times 100$$

Figura 6. Equação referente ao cálculo do rendimento médio por tratamento.

4.2.2.4. Microencapsulação do extrato líquido da farinha de subprodutos de mamão

A microencapsulação do extrato hidrofílico contendo ácido ascórbico obtido a partir da farinha de subprodutos de mamão (selecionado como o melhor pela CLAE) foi realizada por dois métodos diferentes, sendo estes a emulsão dupla seguida da coacervação complexa e spray drying. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Produtos Funcionais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA/USP.

4.2.2.4.1. Secagem por atomização ou spray drying

A metodologia foi realizada de acordo com Alvim et al. (2016) com modificações. As micropartículas contendo ácido ascórbico foram produzidas no equipamento spray dryer MSD 1.0 (Labmaq, Ribeirão Preto, Brasil), preparadas através da mistura de solução de goma arábica a 30% (material de parede) e o extrato líquido da farinha de subprodutos de mamão que apresenta ácido ascórbico ($3,02 \text{ mg.g}$ de extrato líquido $^{-1}$) em sua composição como núcleo, através de agitador mecânico (Fisatom, São Paulo, Brasil), obtendo-se teor de sólidos total de 30 g.100 g^{-1} . Os tratamentos aplicados estão descritos na Tabela 1. Depois de agitar o extrato com o material de parede, as misturas foram secas em duplicata de acordo os parâmetros apresentados na Tabela 2. Após o processo, as amostras foram coletadas e armazenadas sob refrigeração até sua caracterização.

Tabela 1. Tratamentos aplicados na secagem por atomização

Tratamentos	Proporção (v/v) (ativo/parede)	Teor de sólidos da solução de goma arábica (%) (base úmida)
T1	1:1	30
T2	1:2	30
T3	1:3	30

Tabela 2. Condições de processo para obtenção das micropartículas secas por atomização

Parâmetros de secagem	
Temperatura da amostra (°C)	7 ± 2
Temperatura de Entrada (°C)	150 ± 2
Temperatura de Saída (°C)	80 ± 3
Vazão (L.h ⁻¹)*	1
Diâmetro do bico de atomização (mm)	2
Fluxo de gás de atomização (L.min ⁻¹)**	2,5

*Através de uma bomba peristáltica

**Ar comprimido

4.2.2.4.2. Microencapsulação por emulsão dupla seguida da coacervação complexa

A produção de micropartículas por coacervação complexa foi realizada de acordo com Medanha et al. (2009) e modificações de Comunian et al. (2013) como apresentado no fluxograma (Figura 7). A escolha das concentrações foi baseada no trabalho desenvolvido previamente por Comunian et al. (2013), o qual definiu as melhores proporções para a estabilidade das emulsões à partir de análises.

Figura 7. Fluxograma de produção das micropartículas coacervadas.

*Fluxograma elaborado com base na descrição das etapas citadas por Medanha et al. (2009) com modificações de Comunian et al. (2013).

A emulsão simples (A/O) foi preparada na proporção de 1:2 (m/v) (extrato:óleo de milho) com o emprego do agente emulsificante PGPR 90 (0,5% (m/v)) em ultra-turrax (Ika, Alemanha) a 12000 rpm por 4 minutos. A emulsão simples foi emulsionada com solução de gelatina (2,5% (m/v)) para a obtenção da emulsão dupla (A/O/A) em ultra-turrax a 10000 rpm por 3 minutos. A solução de goma arábica (2,5% (m/v)) foi adicionada às emulsões por agitação magnética. Para a coacervação complexa, o pH foi ajustado para 4,0 com o ácido clorídrico 1N a 40 °C sob agitação magnética e em seguida, adicionou-se 400 mL de água deionizada. Posteriormente, a temperatura do sistema foi diminuída até 10 °C com banho de gelo em constante agitação magnética.

O material coacervado foi armazenado e transportado refrigerado até o Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição – LAN/ESALQ/USP (Piracicaba, Brasil) e mantido sob refrigeração (7 °C) por 24 horas para a decantação das partículas. Após este período, foram congelados em freezer (-18 °C) até a desidratação por sublimação, realizada em liofilizador K 108 (Liotop, São Carlos, Brasil). O processo de liofilização das bateladas apresentou duração de 96 horas, com temperatura variando entre -90 e -101 °C e pressão entre 29-40 µHg. A produção das micropartículas por coacervação foi realizada por diferentes tratamentos, de acordo com a porcentagem de núcleo (Tabela 3).

Tabela 3. Tratamentos referentes a produção das micropartículas por coacervação complexa

Tratamentos	Concentração do polímero (%)	Concentração do ativo (%) em relação ao polímero
	gelatina + goma arábica em relação ao núcleo	
T4	5	50
T5	5	75

4.2.2.5. Desidratação do extrato através da liofilização

O extrato hidrofílico contendo o ácido ascórbico obtido na extração foi submetido ao processo de liofilização para a concentração dos compostos e eliminação da água presente. O extrato líquido de mamão foi imediatamente congelado (-80 °C) e após 7 dias foi liofilizado em liofilizador K 108 (Liotop, São Carlos, Brasil), em bateladas com duração de 96 horas, temperatura variando entre -90 e -101 °C e pressão entre 29-40 µHg. O extrato liofilizado também foi incluído como tratamento, já que a liofilização pode ser considerada um método para concentrar extratos o qual remove a água presente nos cristais de gelo (GUTCHO, 1977).

4.2.2.6. Caracterização dos tratamentos

A caracterização quanto a umidade, atividade de água, solubilidade, higroscopicidade, análises morfológicas e quantificação do ácido ascórbico foi realizada para todos os tratamentos (T1, T2, T3, T4, T5 e T6), de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4. Descrição dos tratamentos para caracterização

Tratamentos	Descrição
T1*	Micropartículas secas por atomização na proporção de 1:1 (v/v)
T2*	Micropartículas secas por atomização na proporção de 1:2 (v/v)
T3*	Micropartículas secas por atomização na proporção de 1:3 (v/v)
T4	Micropartículas obtidas por emulsão dupla seguida da coacervação complexa com 50% de emulsão extrato líquido + óleo de milho em relação ao polímero
T5	Micropartículas obtidas por emulsão dupla seguida da coacervação complexa com 75% de emulsão extrato líquido + óleo de milho em relação ao polímero
T6	Extrato da farinha de subprodutos de mamão liofilizado

*Proporção referente ao material ativo: material de parede

4.2.2.6.1. Umidade

A análise de umidade foi realizada no analisador de umidade modelo MB 35 da marca Ohaus (Ohio, EUA). Cerca de 0,5 g de amostra foram pesadas em recipientes de alumínio, em triplicata, submetidas à temperatura de 105 °C. Analisou-se também a umidade para a goma arábica, gelatina e extrato com ácido ascórbico antes dos processos de microencapsulação.

4.2.2.6.2. Atividade de água (Aw)

A atividade de água das micropartículas foi determinada utilizando o equipamento Aqualab (Decagon Devices, Pullman, EUA), a 25 °C após estabilização das amostras nesta temperatura por aproximadamente 1 h. As leituras foram realizadas em triplicata, como realizado por Favaro-Trindade et al. (2010).

4.2.2.6.3. Solubilidade

A análise de solubilidade foi realizada pelo método gravimétrico publicado por Eastman e Moore (1984) e descrito por Cano-Chauca et al. (2005), no qual foram adicionados 0,5 g de amostra em Erlenmeyer e em seguida adicionou-se 50 mL de água destilada. O material foi homogeneizado em mesa agitadora (Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 100 rpm por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada a 3500 rpm por 5 min a 15 °C. Foi retirada a alíquota de 25 mL para uma placa de Petri com massa conhecida e mantida na estufa a 105 °C até a evaporação total da água. A solubilidade foi calculada de acordo com a equação (Figura 8):

$$\text{Solubilidade (\%)} = \left(\frac{(\text{peso da placa pós estufa (g)} - \text{peso da placa seca (g)}) \times 2}{\text{peso da amostra (g)}} \right) \times 100$$

Figura 8. Equação do cálculo de solubilidade.

4.2.2.6.4. Higroscopicidade

A análise de higroscopicidade foi realizada de acordo com o descrito por Cai e Corke (2000) com algumas modificações. Foram pesadas em placas de Petri cerca de 0,2 g de amostra, colocadas em um dessecador previamente condicionado com solução saturada (UR de 75,3%) de cloreto de sódio (Synth, São Paulo, Brasil). As amostras permaneceram por sete dias no dessecador e a higroscopicidade foi determinada pela medição a massa de água absorvida por 100 g de amostra após o armazenamento.

4.2.2.6.5. Análises morfológicas

As amostras dos tratamentos foram observadas através da microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura.

4.2.2.6.5.1. Microscopia óptica

A microscopia óptica foi usada para detectar a formação de emulsão simples e micropartículas coacervadas pelo processo de coacervação complexa. As amostras (T4 e T5) foram levemente dispersas, em lâminas de vidro, visualizadas em uma magnitude de 100 vezes em microscópio ótico BIO3 Bel Photonics (Bel Engineering, Monza, Itália) acoplado a câmara vídeo digital USB 1.3 MP (Digilab, Piracicaba, Brasil).

4.2.2.6.5.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi empregada para estudar as propriedades estruturais do extrato liofilizado, das micropartículas coacervadas e obtidas por spray drying. As amostras foram colocadas em *stubs* de 12 cm de diâmetro usando uma fita metálica dupla face de carbono e recobertas com ouro sob alto vácuo (Baltec SCD 050). Posteriormente, as amostras foram examinadas em diferentes magnitudes em um microscópio eletrônico de varredura (LEO 435 VP, Inglaterra), utilizando uma aceleração potencial de 20 kV durante as micrografias (ROSENBERG e YOUNG, 1993).

4.2.2.6.6. Tamanho das micropartículas

As partículas obtidas por emulsão dupla seguida da coacervação complexa, antes do processo de liofilização, utilizou-se microscopia óptica (100 vezes) e o programa ImageJ para realizar as medições dos diâmetros, a partir das fotos capturadas com o microscópio BIO3 Bel Photonics (Bel Engineering, Monza, Itália). Para obter o diâmetro médio e distribuição de tamanho das partículas produzidas por secagem por atomização utilizou-se o analisador de partículas por difração a laser SALDI-201V (Shimadzu, Kyoto, Japão), como sugerido por Comunian e Favaro-Trindade (2016).

4.2.2.7. Análises estatísticas

Na análise de quantificação de ácido ascórbico, foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado com número igual de repetições para os 6 tratamentos analisados ($n=3$). Os resultados foram expressos em termos de média e desvio-padrão. Para a avaliação dos dados realizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida da comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, utilizando o software Assistat 7.7. Os valores de $p<0,05$ foram considerados significativos.

Para os resultados da caracterização das amostras de micropartículas e do extrato liofilizado, foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado com número diferente de repetições para os 6 tratamentos aplicados, sendo T1, T2 e T3 com 2 repetições de processo e 3 replicatas das análises e o T4, T5 e T6 com 4 repetições de processo e 3 replicatas das análises. Os resultados foram expressos em termos de média e desvio-padrão. Para a avaliação dos dados realizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida da comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, utilizando o software Assistat 7.7. Os valores de $p<0,05$ foram considerados significativos. As imagens foram editadas pelo programa Fotojet (online) e os gráficos e tabelas foram construídos em Excel (Microsoft).

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Processamento das cascas, liofilização e obtenção das farinhas

Após a coleta do material na indústria, as cascas foram picadas manualmente, pesadas, ensacadas, etiquetadas, lacradas e congeladas (-18 °C). Foram obtidos 13,35 kg de cascas de abacaxi in natura e 13,04 kg de cascas de mamão in natura, divididas em sacos plásticos transparentes de polietileno, separadamente, com aproximadamente 0,5 kg cada (Figura 6). Posteriormente, as cascas foram secas, moídas e ensacadas (0,12 kg por saco), congeladas (-26 °C) até a obtenção do extrato.

As cascas de frutas, por conterem alta umidade estão propensas ao ataque de microrganismos, devido a isso, devem passar por processamento para maior tempo de conservação (MORAIS et al., 2017). A liofilização foi a técnica selecionada para a secagem das cascas, compreende a secagem do material por sublimação da água das amostras congeladas a temperaturas baixas e vácuo e vem sendo aplicada para evitar as perdas dos compostos que conferem aromas nos alimentos e compostos termolábeis como a vitamina C, pois são sensíveis aos processamentos que empregam temperaturas elevadas (IBARZ e BARBOSA-CANOVAS, 1999). A técnica apresenta alto custo, mas por outro lado, alimentos liofilizados apresentam alto valor agregado já que retém grande parte dos nutrientes das amostras (VIEIRA, NICOLETI e TELIS, 2012).

Figura 9. Material utilizado para a extração de ácido ascórbico.

*Legenda: (A) Cascas frescas de mamão, (B) Cascas de mamão embaladas para o congelamento, (C) Cascas de mamão após a liofilização, (D) Cascas frescas de abacaxi, (E) Cascas de abacaxi embaladas para o congelamento, (F) Cascas de abacaxi após a liofilização, (G) Farinha de subprodutos de mamão, (H) Farinha de subprodutos de abacaxi e (I) Embalagem e identificação das farinhas.

As cascas de frutas, por conterem alta umidade estão propensas ao ataque de microrganismos, devido a isso, devem passar por processamento para maior tempo de conservação (MORAIS et al., 2017). A liofilização foi a

técnica selecionada para a secagem das cascas, compreende a secagem do material por sublimação da água das amostras congeladas a temperaturas baixas e vácuo e vem sendo aplicada para evitar as perdas dos compostos que conferem aromas nos alimentos e compostos termolábeis como a vitamina C, pois são sensíveis aos processamentos que empregam temperaturas elevadas (IBARZ e BARBOSA-CANOVAS, 1999). A técnica apresenta alto custo, mas por outro lado, alimentos liofilizados apresentam alto valor agregado já que retém grande parte dos nutrientes das amostras (VIEIRA, NICOLETTI e TELIS, 2012).

No presente trabalho o rendimento obtido de material seco foi de 16% para cascas de abacaxi liofilizadas e 12% para cascas de mamão liofilizadas, justificados pela eliminação da água, principal componente das frutas, diminuindo assim o risco de degradação por microrganismos e mudanças químicas destes materiais (CELESTINO, 2010). Com isso, foram obtidos 2,15 kg de farinha de subprodutos de abacaxi e 1,58 kg de farinha de subprodutos de mamão. Quanto a umidade das farinhas de subprodutos, a de abacaxi apresentou umidade média de $19,63 \pm 0,12\%$ e para a de mamão a umidade foi de $10,59 \pm 0,19\%$, resultados semelhantes aos encontrados por Moraes et al. (2017) na caracterização de subprodutos de frutas submetidos a liofilização, afirmando os dados desta pesquisa.

4.3.2. Quantificação de ácido ascórbico por CLAE

Primeiramente, foi realizada a quantificação do ácido ascórbico dos extratos da farinha de subprodutos de mamão e abacaxi. A média dos resultados são reportados na Tabela 5 e os cromatogramas são apresentados nas Figuras 10 e 11. O pico referente ao ácido L-ascórbico apresentou tempo de retenção de 4,6 minutos aproximadamente, além disso, mostraram-se simétricos em relação a linha de base, boa resolução e curto tempo de retenção, assim como o observado por Bresolin e Hubinger (2014). Por apresentar maior teor de ácido ascórbico, o extrato da farinha de subprodutos de mamão foi selecionado para as outras etapas do estudo.

Tabela 5. Quantificação de ácido ascórbico inicial (base seca).

Tratamentos	Concentração de ácido ascórbico (mg AA/g amostra)
Extrato da farinha de subprodutos de mamão	$133,51 \pm 7,39^a$
Extrato da farinha de subprodutos de abacaxi	$80,96 \pm 1,65^b$

*Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de 5% de significância.

Figura 10. Perfil cromatográfico do extrato liofilizado da farinha de subprodutos de mamão.

Figura 11. Perfil cromatográfico do extrato liofilizado da farinha de subprodutos de abacaxi.

Marielli de Souza et al. (2008) realizaram a quantificação do ácido L-ascórbico de frutos de mamão da variedade “Formosa” brasileira pelo método oficial que utiliza a titulação com o reagente 2,6-dicloroindofenol, obtendo entre 75,9 – 83,2 mg de AA.100 g⁻¹ em base úmida, para a polpa do mamão. No trabalho realizado por Calvache et al. (2016) com cascas de mamão liofilizadas, o teor de ácido ascórbico encontrado foi de 32,3 mg.100g⁻¹ determinado por um método espectrofotométrico, teor inferior aos dados obtidos neste estudo.

Gayosso-García Sancho, Yahia e González-Aguilar (2011) realizaram a quantificação de vitamina C total da polpa e cascas dos frutos de mamão provenientes do México, secas por liofilização e mantidas congeladas até o momento da análise. Com resultados, os autores observaram maior concentração de vitamina C na polpa dos frutos, variando entre 25,1 - 58,6 mg.100 g⁻¹ de amostra (base seca), já para as cascas do fruto a concentração foi menor mas houve presença da vitamina C, variando entre 7,4 – 23,4 mg.100 g⁻¹ de amostra (base seca). O teor de vitamina C foi obtido pela soma do ácido L-ascórbico e Isoascórbico e pelos resultados apresentados, o ácido isoascórbico representa pequena parcela na composição da vitamina C, isto é, os valores para o ácido L-áscorbico e vitamina C são praticamente os mesmos, sendo assim, neste estudo adotou-se a quantificação somente do ácido L-ascórbico.

Como explicação para a diferença nas concentrações obtidas (referentes ao extrato de mamão) no estudo (Tabela 6) e os dados da literatura podem ser citadas a cultivar do mamão, condições fisiológicas do fruto, grau de

maturação, as condições de solo de cultivo, condições climáticas e geográficas (IKRAM et al., 2015). Além disso, as condições de obtenção do extrato, os reagentes que foram utilizados na extração, o equipamento utilizado na análise o que inclui a coluna, temperatura, fase móvel, comprimento de onda de detecção, o detector e outros fatores que podem interferir nos resultados. Ainda, o ácido ascórbico é extremamente instável, sendo mais um fator que pode alterar os dados de sua quantificação.

Após a aplicação da microencapsulação, realizou-se a quantificação do teor de ácido ascórbico das micropartículas. A Tabela 6 apresenta as médias dos teores de ácido ascórbico em mg.g amostra⁻¹. Além disso, os cromatogramas são apresentados nas Figuras 12, 13, 14, 15 e 16.

Tabela 6. Quantificação de ácido ascórbico dos tratamentos aplicados.

Tratamentos	Concentração de ácido ascórbico (mg AA.g amostra ⁻¹)
T1	13,17±0,74 ^b
T2	17,73±1,46 ^b
T3	2,33±0,04 ^c
T4	ND
T5	ND
T6	133,51±7,39 ^a

*Resultados expressos como média ± desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de 5% de significância. ND=não detectado.

Figura 12. Perfil cromatográfico das micropartículas produzidas por spray drying (T1).

Figura 13. Perfil cromatográfico das micropartículas produzidas por spray drying (T2).

Figura 14. Perfil cromatográfico das micropartículas produzidas por spray drying (T3).

Figura 15. Perfil cromatográfico das micropartículas obtidas por coacervação complexa coacervadas (T4).

Figura 16. Perfil cromatográfico das micropartículas obtidas por coacervação complexa coacervadas (T5).

De acordo com os dados obtidos (Tabela 6), o teor de ácido ascórbico das amostras variou entre 2,33 a 133,51 mg.g de amostra⁻¹. Como era esperado, o extrato da farinha de subprodutos de mamão liofilizado (T6) apresentou concentração significativamente maior ($p < 0,05$) do composto, seguido pelo T1 e T2. A menor concentração do composto foi encontrada no T3. Já, para os tratamentos T4 e T5, não foram detectados os picos referentes ao composto devido possivelmente à sua baixa concentração nas micropartículas, abaixo dos níveis de detecção do equipamento, o qual foi calculado e corresponde a 7,26462 mg.

A maior concentração do ácido ascórbico no extrato liofilizado pode ser explicada pelo método de secagem aplicado, o qual eliminou a parte aquosa sem utilizar o calor, concentrando os compostos e mantendo as características do material (IBARZ e BARBOSA-CANOVAS, 1999). Com relação às micropartículas obtidas por secagem por atomização, o T1 e T2 apresentaram os maiores rendimentos de processo, de 63,01 e 61,81%, respectivamente. Já o T3, além de apresentar o menor teor de ácido ascórbico apresentou o menor rendimento médio (61,60%). No estudo realizado por Alvim et al. (2016), foram produzidas micropartículas com ácido ascórbico por spray drying, com mais de 90% de eficiência no processo de microencapsulação, afirmando a técnica para a preservação do composto termolábil.

Comunian et al. (2013) utilizaram a metodologia oficial através do método titulométrico para quantificar o composto presente em micropartículas coacervadas com ácido ascórbico como material ativo, observando que para todos os tratamentos, os quais foram aplicados a coacervação complexa, houve maior proteção ao ativo quando comparados com sua forma livre. Neste estudo, a quantificação foi realizada para as micropartículas coacervadas após a aplicação da técnica de quebra, a qual possibilitou a ruptura das micropartículas devido a variação no pH sofridas no processo. Porém, como pode ser observado nas Figuras 15 e 16, os picos referentes ao ácido ascórbico, no tempo de retenção de 4,6 minutos não foram observados, mostrando a ineficácia da técnica de quebra ou do método de quantificação do AA do material, ou ainda como citado, a baixa concentração do composto nas micropartículas durante o processo de encapsulação.

4.3.3. Caracterização das micropartículas e extrato desidratado

A caracterização quanto a umidade, atividade de água, solubilidade e higroscopicidade foi realizada para todos os tratamentos (T1, T2, T3, T4, T5 e T6) e os resultados foram expressos na Tabela 7. Estas análises são muito importantes para estes materiais já que suas aplicações futuras dependem basicamente destes parâmetros (COMUNIAN e FAVARO-TRINDADE, 2016).

Tabela 7. Resultados obtidos na caracterização dos tratamentos

Tratamentos	Umidade (%)	Atividade de água (Aw)	Solubilidade (%)	Higroscopicidade (g.100 g ⁻¹)
T1	5,4417±1,592 ^b	0,2214±0,016 ^a	94,3334±0,991 ^a	18,5936±0,731 ^b
T2	5,4217±0,537 ^b	0,2298±0,009 ^a	93,3694±1,017 ^a	18,2808±0,934 ^b
T3	4,6983±0,630 ^b	0,1285±0,018 ^b	91,5175±1,252 ^a	18,2488±0,410 ^b
T4	3,0675±0,779 ^c	0,0726±0,036 ^c	21,8271±2,029 ^c	13,1846±2,179 ^c
T5	3,0592±0,528 ^c	0,0850±0,043 ^b	20,1980±2,473 ^c	11,5303±0,957 ^d
T6	12,8542±1,481 ^a	0,2027±0,020 ^a	68,4931±2,522 ^b	30,8374±0,916 ^a

*Resultados expressos como média ± desvio padrão, n=2 para T1, T2 e T3 e n=4 para T4, T5, T6. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de 5% de significância.

**Legenda: T1 = micropartículas secas por atomização na proporção de 1:1 (v/v); T2 = micropartículas secas por atomização na proporção de 1:2 (v/v); T3 = micropartículas secas por atomização na proporção de 1:3 (v/v); T4 = micropartículas obtidas por emulsão dupla seguida da coacervação complexa com 50% de emulsão extrato líquido + óleo de milho em relação ao polímero; T5 = micropartículas obtidas por emulsão dupla seguida da coacervação complexa com 75% de emulsão extrato líquido + óleo de milho em relação ao polímero; T6 = extrato liofilizado da farinha de subprodutos de mamão.

Os valores de umidade para os tratamentos encontram-se entre 3,06 e 12,85%, de acordo com dados da Tabela 8. Rocha-Selmi et al. (2013) obtiveram valores entre 3,99 e 7,42% de umidade para micropartículas de aspartame obtidas por coacervação complexa secas posteriormente o processo de formação das partículas e de Souza et al. (2015) observaram valores de umidade para micropartículas de subprodutos de vinificação obtidas por spray drying variando entre 2,96 e 4,54%, resultados semelhantes ao deste estudo.

Para a atividade de água as médias obtidas variaram entre 0,07 a 0,23 (Tabela 7). Daza et al. (2016) observaram atividade de água inferior que 0,3 para extrato de cagaita seco por atomização, assim como os dados obtidos neste estudo. Os valores para atividade de água (Tabela 8) encontram-se dentro do esperado e recomendado, garantindo assim, a estabilidade microbiológica dos produtos, pois, Aw abaixo de 0,6 inibe o crescimento microbiológico (FENNEMA, DAMODARAM e PARKIN 2010; DA SILVA et al., 2013).

O extrato de mamão liofilizado apresentou teor significativamente maior de umidade e atividade de água quando comparado aos outros tratamentos, dados condizentes com o estudo de Daza et al. (2016), o qual observaram que o extrato liofilizado de cagaita também apresentou maiores teores de umidade e atividade de água que os outros tratamentos aplicados.

Valores baixos de umidade para micropartículas secas por atomização são necessários para garantir a estabilidade e impedir a formação de aglomerados de partículas úmidas pois a retenção do material de interesse é prejudicada (DA SILVA et al., 2013). Por serem partículas obtidas por técnicas totalmente diferentes, as características como atividade de água e umidade foram significativamente maiores para os tratamentos obtidos por spray drying

quando comparados aos tratamentos obtidos por coacervação complexa secos posteriormente por liofilização. Uma possível justificativa é o fato da goma arábica apresentar estrutura química com elevado número de ramificações com grupos hidrofílicos, aumentando sua capacidade de ligação com água mantendo maior quantidade de água no processo de atomização, como descrito por Da Silva et al. (2013) no trabalho com própolis seco por spray drying. Ainda, as micropartículas coacervadas foram submetidas ao processo de liofilização, o que pode explicar a baixa umidade apresentada pelos tratamentos T4 e T5.

As propriedades de higroscopicidade e solubilidade dos materiais auxiliam no planejamento das condições de armazenamento destes produtos, bem como na aplicação das micropartículas uma vez que a solubilidade é dada como a capacidade de dissolução de um material em um meio específico e a higroscopicidade refere-se a quantidade de água que um alimento pode absorver durante o armazenamento, por exemplo (COMUNIAN e FAVARO-TRINDADE, 2016).

Com relação a solubilidade dos tratamentos, as micropartículas obtidas por spray drying apresentaram maior solubilidade ($p < 0,05$) quando comparados aos outros tratamentos. Isto se deve, potencialmente, a alta solubilidade (93,19%) do material de parede utilizado que foi a goma arábica, favorecendo a dispersão das micropartículas no meio hidrofílico. Os resultados são semelhantes aos encontrados na literatura, média de 95,57% para extratos obtidos a partir de subprodutos de vinificação da uva Bordo utilizando a maltodextrina como agente carregador (DE SOUZA et al., 2015), entre 94,4 - 97,8% para extratos de cagaita submetidos a secagem por atomização utilizando goma arábica como material de parede (DAZA et al., 2016) e solubilidade superior a 90% para micropartículas de clorofila obtidas por atomização utilizando goma arábica, maltodextrina e proteína de soja como materiais de parede (COMUNIAN et al., 2011).

O oposto foi observado para as micropartículas obtidas por emulsão dupla seguida da coacervação complexa, que apresentaram significativa redução na solubilidade quando comparados aos demais tratamentos, característica já esperada devido ao tipo de ligação entre os polímeros que é formada, como a interação dos polímeros de cargas opostas, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio que contribuem para a formação do complexo, conferindo a liberação controlada de substâncias no meio e alterando as forças iônicas (COMUNIAN et al., 2013; AUGUSTIN e HEMAR, 2009). Os valores obtidos neste estudo foram semelhantes aos obtidos por Rocha-Selmi et al (2013) que variaram entre 9,46% a 21,37% na microencapsulação de aspartame pelo mesmo método, utilizando gelatina e goma arábica e superiores aos encontrados por Santos et al. (2015), que variaram de 5,31 a 13,90% na microencapsulação de xilitol com gelatina e goma arábica. O extrato de mamão liofilizado apresentou solubilidade intermediária, de 68,49%, semelhante a outros estudos da literatura (DAZA et al., 2016 e DE SOUZA et al., 2015), diferindo estatisticamente dos outros tratamentos empregados.

A higroscopicidade pode ser definida como a capacidade de um material em absorver a umidade do ambiente circundante, característica importante a qual influencia na estabilidade de um alimento (DAZA et al., 2016). O teor médio de higroscopicidade para os tratamentos variou de 11, 53 a 30,84 g de água.100 g de amostra seca⁻¹. O extrato de mamão liofilizado apresentou média de 30,84 g para higroscopicidade, significativamente superior quando comparado aos outros tratamentos aplicados, podendo ser justificado pela falta de material de proteção o que aumentou a superfície de contato com o ambiente facilitando a absorção da umidade tornando este material, possivelmente, mais instável que os outros tratamentos ou até mesmo pela composição do extrato. Valor semelhante (34,4 g) foi citado por Souza et al. (2015) para o extrato liofilizado de subprodutos de uva Bordo.

Valores baixos de higroscopicidade simplificam o armazenamento, embalagem, manuseio e aplicação dos produtos. Neste estudo, quando comparados os tratamentos 1, 2 e 3 obtidos por spray drying, com os tratamentos 4

e 5 obtidos por coacervação complexa, pode-se afirmar aumento significativo na higroscopicidade das amostras obtidas por spray drying devido, provavelmente, a exposição dos grupos polares da goma arábica, no caso das matrizes produzidas em spray drying capazes de formar pontes de hidrogênio com a água e possuir estrutura altamente ramificada como citado por Comunian et al. (2013) e Da Silva et al. (2013).

Comunian et al. (2011) obtiveram micropartículas de clorofila secas por atomização cerca de seis vezes mais higroscópicas que as micropartículas obtidas pelo mesmo método deste trabalho (Tabela 7). Da Silva et al. (2013) realizaram a microencapsulação do extrato de própolis com goma arábica por spray drying e obtiveram resultados superiores (entre 27,4 e 29,3 g de água.100 g de amostra⁻¹) ao obtido neste estudo (Tabela 7). Assim, as micropartículas obtidas por spray drying neste estudo são mais estáveis no armazenamento e mais fáceis de manipular por apresentarem capacidade higroscópica reduzida.

Rocha-Selmi et al. (2013) obtiveram valores baixos de higroscopicidade entre 10,73 e 13,43 g de água.100 g de amostra seca⁻¹ para micropartículas coacervadas de aspartame, valores que afirmam os resultados desta pesquisa (Tabela 7). Nori et al. (2011) observaram valores cerca de três vezes maiores para higroscopicidade de micropartículas própolis obtidas por coacervação complexa utilizando pectina e proteína isolada de soja como materiais de parede, fato que pode ser justificado pelas diferentes ligações entre os polímeros.

4.3.4. Análises morfológicas

As partículas obtidas por spray drying foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 17). De forma geral, todos os tratamentos (T1, T2 e T3) apresentaram as mesmas características morfológicas independente da proporção do material carregador, como formatos esféricos com concavidades na superfície, típicas de materiais como a goma arábica submetida a secagem por atomização.

Nas superfícies externas não foram observadas rachaduras ou interrupções, mas, paredes contínuas, sem fissuras, garantindo proteção do material ativo, assim como as observações descritas por Saleh et al. (2016) e Alvim et al. (2016), na microencapsulação de ácido ascórbico por spray drying com goma arábica como material de parede.

Fatores como temperatura de entrada e saída do processo, taxa do fluxo do gás de secagem e outras propriedades influenciam a morfologia de materiais submetidos a secagem por atomização. Ainda, o processo de evaporação da água rapidamente do material favorece a formação das “crostas”, dando aparência de uma concha fina (ANANDHARAMAKRISHNAN e ISHWARYA 2015).

Figura 17. Micropartículas obtidas por spray drying observadas por microscopia eletrônica de varredura.

*Legenda: (A) Micropartículas pulverizadas do T1 (797x), (B) Micropartículas pulverizadas do T2 (863x), (C) Micropartículas pulverizadas do T3 (1930x).

Através da microscopia óptica, foi observada a formação da emulsão simples (Figura 18), utilizada no processo de coacervação, composta pelo extrato que continha ácido ascórbico disperso em óleo de milho (A/O) através do agente emulsificante e da emulsão dupla com adição da gelatina. As micropartículas coacervadas (T4 e T5) apresentaram estrutura multinucleada, com paredes bem definidas e predominantemente esféricas ao final do processo (Figuras 19A e 20A). Na comparação entre os tratamentos foram observadas semelhanças morfológicas, salvo algumas exceções do T5 onde partículas adquiriram a forma alongada devido, provavelmente, ao aumento da proporção do material ativo.

Figura 18. Emulsão simples A/O.

*Legenda: (A) Emulsão simples do T4 utilizada para a coacervação complexa visualizada por microscopia óptica (100x), (B) Emulsão simples do T5 utilizada para a coacervação complexa visualizada por microscopia óptica (100x).

Figura 19. Micropartículas obtidas por coacervação complexa.

*Legenda: (A) Micropartículas coacervadas do T4 antes da liofilização observadas por microscopia óptica (100x), (B) Micropartículas coacervadas do T4 após a liofilização observadas por microscopia eletrônica de varredura (82x).

Figura 20. Micropartículas obtidas por coacervação complexa.

*Legenda: (A) Micropartículas coacervadas do T5 antes da liofilização observadas por microscopia óptica (100x), (B) Micropartículas coacervadas do T5 após a liofilização observadas por microscopia eletrônica de varredura (107x).

Alguns trabalhos foram desenvolvidos sobre microencapsulação de substâncias hidrofílicas por coacervação complexa através da técnica de emulsão dupla. Rocha-Selmi et al. (2013) avaliaram a microencapsulação por coacervação complexa do aspartame utilizando goma arábica e gelatina como matérias de parede, obtendo micropartículas multinucleadas, membranas contínuas sem a presença de poros e à medida que o material do núcleo aumentou de proporção, as micropartículas tornaram-se menos esféricas, assim como observado no presente trabalho.

Comunian et al. (2013) obtiveram características semelhantes no estudo com ácido ascórbico microencapsulado por emulsão dupla seguida da coacervação complexa que utilizou goma arábica e gelatina como materiais de parede, obtendo micropartículas multinucleadas com o interior bem protegido pela parede formada. Santos et al. (2015) produziram micropartículas de xilitol por emulsão dupla seguida da coacervação complexa utilizando como materiais de parede a gelatina e goma arábica, no qual houve a formação das micropartículas, apresentando-se multinucleadas, com formato esférico e material de núcleo completamente protegido pelo material de cobertura assim como apresentado neste estudo.

Para facilitar a aplicação e aumentar a estabilidade, as micropartículas coacervadas foram liofilizadas, como realizado por Comunian et al. (2013). As micropartículas coacervadas formaram estruturas aglomeradas e algumas conexões através de pontes sólidas entre si, após os processos de congelamento e liofilização (Figuras 19B e 20B), o

que já era esperado. O mesmo foi observado por Comunian et al. (2013), Santos et al. (2015) e Rocha-Selmi et al. (2013). A formação destas pontes pode estar relacionada ao congelamento, liofilização e aos materiais de parede utilizados, gelatina e goma arábica. Não foram observadas diferenças morfológicas entre o T4 e T5 após a liofilização.

As características morfológicas são diferentes quando comparados os tratamentos coacervados com os secos por atomização, sendo que as micropartículas obtidas por emulsão dupla e coacervação complexa seguidas da liofilização apresentaram-se sem formato definido e as micropartículas secas por atomização apresentaram formato esférico e semi-esférico bem definidos e variação no tamanho das partículas, assim como o descrito por Calderón-Oliver et al. (2017) ao apresentar a morfologia de micropartículas de extrato de abacate, secos por liofilização e por atomização. Comparando as figuras dos tratamentos, o material de interesse encontra-se disperso na superfície e no interior das partículas secas por atomização e para as coacervadas, o núcleo é envolto pelo material de parede e bem protegido no interior das micropartículas, assim como descrito por Barrow, Nolan e Jin (2007).

Quanto a morfologia do extrato da farinha de subprodutos de mamão liofilizado (Figura 21), foi possível observar a formação de redes interligando o material, apresentando-se sem formato definido. Isso se deve, potencialmente ao processo de congelamento e liofilização, no qual a água presente é eliminada por sublimação, deixando uma estrutura porosa semelhante a “favos de mel”, o que auxilia na capacidade do produto se reidratar rapidamente conservando suas características iniciais (COHEN e YANG, 1995).

Figura 21. Estrutura do extrato da farinha de subprodutos de mamão liofilizado na magnitude de 42x.

4.3.5. Tamanho das partículas

A variação no tamanho das partículas foi comprovada na análise de tamanho de partículas no qual nota-se que para as partículas secas por atomização, o T1 apresentou partículas pequenas concentradas na faixa 0,52 e 1,07 μm , o T2 apresentou partículas distribuídas entre 0,52 a 19,30 μm . Para T3, as partículas observadas foram bem maiores quando comparadas aos dois tratamentos anteriores, na faixa de 3,92 a 53,22 μm (Figuras 22, 23 e 24).

O tamanho das partículas pode estar diretamente relacionado a proporção de material de parede utilizado no processo realizado por spray drying, isto é, quanto maior a concentração do material encapsulante, que neste caso foi a goma arábica, maior é o diâmetro da partícula seca. Trindade e Grosso (2000) estudaram a estabilidade do ácido ascórbico microencapsulado com goma arábica e grânulos de amido de arroz, observando que o ácido ascórbico microencapsulado com goma arábica apresentou tamanhos entre 0,3 a 90 μm , dados que confirmam os resultados desta pesquisa.

Figura 22. Distribuição dos diâmetros das partículas secas por atomização do T1.

Figura 23. Distribuição dos diâmetros das partículas secas por atomização do T2.

Figura 24. Distribuição dos diâmetros das partículas secas por atomização do T3.

O tamanho das partículas é um fator muito importante na aplicação de micropartículas coacervadas nos produtos alimentares já que o tamanho pode interferir na textura e no sabor dos alimentos (COMUNIAN e FAVARO-TRINDADE, 2016). A média no tamanho das partículas pode variar em função de diversos fatores, sendo estes: diferenças no material de parede utilizado, nas concentrações dos polímeros e matérias de parede, na temperatura e na velocidade que o processo é realizado (COMUNIAN et al., 2017).

O tamanho das partículas coacervadas pode variar entre 0,1 e 500 μm , de acordo com Comunian e Favaro-Trindade (2016) e podem ser aplicadas nos alimentos quando apresentam tamanhos inferiores a 100 μm (COMUNIAN et al., 2017). No caso das micropartículas obtidas por emulsão dupla seguida da coacervação complexa deste estudo, o tamanho médio das partículas foi de $31,33 \pm 6,74 \mu\text{m}$ para o T4 e $31,57 \pm 8,64 \mu\text{m}$ para o T5 antes do processo de liofilização. As médias do diâmetro foram inferiores quando comparadas as obtidas por Comunian et al. (2013) no trabalho com ácido ascórbico, mas semelhantes as médias obtidas por Comunian et al. (2017) na microencapsulação de ácido sinápico com gelatina e goma arábica como materiais de parede, afirmando os dados deste estudo e podendo ser aplicadas nos alimentos.

4.4. Conclusão

Frente aos objetivos propostos e os resultados obtidos, este estudo mostrou que foi possível realizar a extração do ácido ascórbico dos subprodutos agroindustriais estudados, mantendo os níveis do composto após a aplicação da liofilização e microencapsulação por spray drying.

Os resultados da caracterização dos tratamentos, como baixa umidade e baixa atividade de água afirmam a seguridade microbiológica na aplicação em alimentos. A solubilidade das micropartículas produzidas por spray drying foi significativamente superior à dos outros tratamentos (T4, T5 e T6) aplicados ($p < 0,05$). O extrato liofilizado apresentou maior teor de ácido ascórbico e higroscopicidade em relação aos resultados obtidos pelos outros tratamentos ($p < 0,05$).

As análises morfológicas mostraram que há diferenças na formação das micropartículas por conta da técnica de microencapsulação aplicada, isto é, cada processo refletiu suas características nos tratamentos. Com relação ao tamanho das partículas, as obtidas por spray drying apresentaram tamanhos inferiores em relação as micropartículas obtidas por emulsão dupla seguidas da coacervação complexa. Quanto ao extrato, mostrou características pertinentes aos produtos liofilizados passíveis de rápida reidratação.

Referências

- ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation: Influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 1069–1076, 2010.
- ALVIM, I. D.; STEIN, M. A.; KOURY, I. P.; DANTAS, F. B. H.; CRUZ, C. L. de C. V. Comparison between the spray drying and spray chilling microparticles contain ascorbic acid in a baked product application. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 689–694, 2016.
- ANANDHARAMAKRISHNAN, S.; ISHWARYA, P. **Spray Drying Techniques for food Ingredient Encapsulation**, Ed. John Wiley & Sons, 2015.
- AUGUSTIN, M.A.; HEMAR, Y. Nano- and microstructured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 902–912, 2009.
- BARROW, C. J.; NOLAN, C.; JIN, Y. Stabilization of highly unsaturated fatty acids and delivery into foods. **Lipid Technology**, n. 5, v. 19, 2007.
- BRAZEL, C.S. Microencapsulation: offering solutions for the food industry. **Cereal Foods World**, v. 44, n. 6, p. 388–393, 1999.
- BRESOLIN, J. D.; HUBINGER, S. Z. Metodologia para determinação de ácido ascórbico em sucos de citrus utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. In: **Simpósio Nacional de instrumentação Agropecuária**, São Carlos, 2014.
- BRIONES-LABARCA, V.; GIOVAGNOLI-VICUÑA, C.; FIGUEROA-ALVAREZ, P.; QUISPE-FUENTES, I.; PÉREZ-WON, M. Extraction of carotene, vitamin C and antioxidant compounds from *Physalis peruviana* (Cape Gooseberry) assisted by high hydrostatic pressure. **Food and Nutrition Sciences**, v.4, p.109-118, 2013.
- CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried amaranthus betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 1248–1252, 2000.

- CALDERÓN-OLIVER, M.; PEDROZA-ISLAS, R.; ESCALONA-BUENDÍA, H. B.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; PONCE-ALQUICIRA, E. Comparative study of the microencapsulation by complex coacervation of nisin in combination with an avocado antioxidante extract. **Food Hydrocolloids**, v. 62 p. 49-57, 2017.
- CAMPOS, F.M.; RIBEIRO, S.R.M.; LUCIA, C.M.D.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M.; STRINGHETA, P.C. Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables, **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 87- 91, 2009.
- CANO-CHAUCA, M; STRINGUETA, P.C.; RAMOS, A.M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carries on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v.6, n.4, p. 420-428, 2005.
- CELESTINO, S. M. C.; **Princípios de Secagem de Alimentos**; Embrapa: Planaltina, Brasil, 2010.
- COHEN, J. S.; YANG, T. C. S. Progress in food dehydration - Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, 1995.
- COMUNIAN, T. A.; CHAVES, I. E.; THOMAZINI, M.; MORAES, I. C. F.; FERRO-FURTADO, R.; CASTRO, I. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Development of functional yogurt containing free and encapsulated echium oil, phytosterol and sinapic acid. **Food Chemistry**, v. 237, p. 948-956, 2017.
- COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and ômega-3 fatty acids: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 442-457, 2016.
- COMUNIAN, T. A.; MONTERREY-QUINTERO, E.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; PICCONE, P.; PITTIA, P.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried chlorophyllide, a natural food colourant, using gum arabic, maltodextrin and soy protein isolate-based carrier systems. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 1259-1265, 2011.
- COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; ALVES, A. J. G.; MATOS JUNIOR, F. E.; BALIEIRO, J. C. de C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v. 52, n.1, p. 373-379. 2013.
- DA SILVA, F. C.; DA FONSECA, C. R.; ALENCAR, S. M. DE.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. de C.; PITTIA, P.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum arabic and OSA starch-based carrier systems. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 28-36, 2013.
- DAZA, L. D.; RODRIGUES-RACT, J. N.; GRANATO, D.; GENOVESE, M. I. Effect of spray drying conditions on the physical properties of cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extracts. **Food and Bioproducts Processing**, v. 97, p. 20-29, 2016.
- DE SOUZA, V. B.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. de C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 39-50, 2015.
- DOS SANTOS, C. M.; de ABREU, C. M. P.; FREIRE, J. M.; QUEIROZ, E. de R.; MENDONÇA, M. M. Chemical characterization of the flour of peel and seed from two papaya cultivars. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 34, n. 2, p. 353-357, 2014.
- EASTMAN, J. E.; MOORE, C. O. **Cold water soluble granular starch for gelled food composition**. U.S. Patent 4465702, 1984.

- FENNEMA, O. R.; DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 4, p. 366-374, 2010.
- GAYOSSO-GARCÍA SANCHO, L. E.; YAHIA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. **Food Research International**, v. 44, p. 1284-1291, 2011.
- GIBBS, B.F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.50, p.213-224, 1999.
- IBARZ, A.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. **Deshidratación y Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos**, Lancaster, Basel, 1999.
- IKRAM, E. H. K.; STANLEY, R.; NETZEL, M.; FANNING, K. Phytochemicals of papaya and its traditional health and culinary uses – a review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 201-211, 2015.
- MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1-21, 2006.
- MARIELLI DE SOUZA, L.; FERREIRA, K. S. ; CHAVES, J. B. P.; TEIXEIRA, S. L. Ascorbic acid, b-carotene and lycopene content in papaya fruits (*Carica papaya*) with or without physiological skin freckles. **Scientia Agricola (Piracicaba, Brazil)**, v. 65, n. 3, 2008.
- MEDANHA, D. V.; MOLINA ORTIZ, S. E.; FAVARO-TRINDADE, C. S., MAURI, A.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; THOMAZINI, M. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. **Food Research International**, v. 42, p. 1099–1104, 2009.
- MORAIS, D. R.; ROTTA, E. M.; SARGI, S.C.; BONAFE, E. G.; SUZUKI, R. M.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V. Proximate composition, mineral contents and fatty acid composition of the different parts and dried peels of tropical fruits cultivated in Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 28, No. 2, 308-318, 2017.
- MUJUMDAR, A. S. **Handbook of industrial drying**, ed. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 948 p. 1987.
- NORI, M. P.; FAVARO-TRINDADE, C.S.; de ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. de C.; CASTILHO, C. J. C. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation, **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 429-435, 2011.
- PALAFOX-CARLOS, H.; AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, 2011.
- RISCH, S. J. **Encapsulation: Overview of Uses and Techniques**. Cap. 1, 1995.
- ROCHA-SELMÍ, G. A.; BOZZA, F. T.; THOMAZINI, M.; BOLINI, H. M. A.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness. **Food Chemistry**, v. 139, p. 72-78, 2013.
- ROSENBERG, M.; YOUNG, S.L. Whey proteins as microencapsulation agents. Microencapsulation of anhydrous milk fat-structure evaluation. **Food Structure**, Chicago, v.12, n.1, p.31-41, 1993.
- SABINO, L.B.S.; GONZAGA, M.L.C.; SOARES, D.J.; LIMA, A.C.S.; LIMA, J.S.S.; ALMEIDA, M.M.B.; SOUSA, P.H.M.; FIGUEIREDO, R.W. Bioactive compounds, antioxidant activity and minerals in flours prepared with tropical fruit peels. **Acta Alimentaria**, v. 44, n. 4, p. 520–526. 2015.
- SALEH, M.; AL-ISMAIL, K.; EL-DIJANI, L.; AL-KHATIB, H. Effect of microencapsulation of vitamin C with gum arabic, whey protein, isolate and some blends on its stability. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 75, p. 176-180, 2016.

- SANTOS, M. G.; BOZZA, F.T.; THOMAZINI, M.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. **Food Chemistry**, v. 171, p. 32–39, 2015.
- SARTORI, T., CONSOLI, L., HUBINGER, M. D., MENEGALLI, F. C. Ascorbic acid microencapsulation by spray chilling: production and characterization. **LWT e Food Science and Technology**, v. 63, p.353-360. 2015.
- SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.
- TRADBOR. TradPouch – A solução de pequenas tiragens da Tradbor. **Do que é feito o tradpouch?**. Disponível em: < http://www.tradbtor.com.br/tudo_sobre_tradpouch1.html > Acesso em 05 de março de 2018.
- VIEIRA, A. P.; NICOLETI, J. F.; TELIS, V. R. N. Liofilização de fatias de abacaxi: avaliação da cinética de secagem e da qualidade do produto. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 50-58, 2012.

5. BIOACESSIBILIDADE DO FERRO NA FARINHA DE TRIGO COM ADIÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

RESUMO

Estudos para avaliar a bioacessibilidade de nutrientes tem sido realizados para verificar o quanto de nutrientes é liberado da matriz alimentar no processo digestivo e está disponível para ser absorvido pelo intestino. Estudos in vitro utilizando a simulação do processo de digestão gástrica e intestinal aliados às culturas de células Caco-2 para estudar a bioacessibilidade do ferro são bem aceitos, pois podem prever possíveis resultados de estudos in vivo que são mais custosos e demorados. A deficiência de ferro no organismo humano atinge grande parte da população mundial, sendo necessário aumentar o aporte do micronutriente bioacessível na dieta para melhorar a saúde e bem-estar, assim pode prevenir doenças como a anemia. A maior parte do ferro da dieta encontra-se na forma de ferro não-heme, sendo sua absorção dependente de outros componentes da dieta e das reservas de ferro dos indivíduos. Compostos chamados de potencializadores da absorção do ferro tem sido empregados, como a vitamina C, que atua como redutor para a forma ferrosa no lúmen intestinal aumentando a absorção do mineral. Uma das fontes de vitamina C além das frutas são os subprodutos do processamento como cascas, sementes e bagaço podem ser citados como fonte de ácido ascórbico. Como a farinha de trigo é um alimento muito consumido e presente em muitas formulações de alimentos, adotou-se a fortificação com o ferro visando aumentar o aporte deste mineral na dieta contra a anemia. Diante do exposto, o objetivo do estudo foi enriquecer a farinha de trigo comercial com micropartículas obtidas do extrato da farinha de subprodutos de mamão com ácido ascórbico em sua composição e o extrato de subprodutos de mamão liofilizado e observar a bioacessibilidade do ferro. Foram aplicados três tratamentos: micropartículas obtidas por spray drying do T2 (1:2) com farinha de trigo, micropartículas obtidas por coacervação complexa com 50% de núcleo (T4) com farinha de trigo e o extrato da farinha de subprodutos de mamão liofilizado (T6) com farinha de trigo e os controles: positivo com sulfato ferroso e ácido ascórbico (1:1) e o controle negativo que refere-se apenas as células Caco-2, sem adição de amostras. Realizou-se o cultivo de células Caco-2 e no 14º dia procedeu-se o processo de digestão (oral, gástrica e intestinal) dos tratamentos com a farinha de trigo. A bioacessibilidade do ferro foi mensurada pela ferritina. O teor médio de ferritina variou entre 0,02 e 1,19 ng/mg de proteína. Não houve diferenças significativas positivas dos tratamentos realizados em relação a farinha de trigo comercial ($p < 0,05$). Diante dos objetivos propostos e dos resultados obtidos, pode-se concluir que enriquecer a farinha de trigo com ácido ascórbico nas condições e proporções utilizadas não foi suficiente para aumentar a bioacessibilidade do ferro presente na farinha de trigo comercial.

Palavras-chave: Anemia; Fortificação; Biodisponibilidade; Antinutrientes; Digestão in vitro; Células Caco-2

ABSTRACT

Studies to evaluate the bioaccessibility of nutrients have been conducted in order to find out how much is emitted from the food matrix in the digestive process and how much is available to be absorbed by the intestine. In vitro studies using the simulation of the gastric and intestinal digestion process allied to cultures of Caco-2 cells in order to observe the bioaccessibility of the iron are well-accepted because they can foresee possible results of the in vivo studies, which are more expensive and more time-consuming. The iron deficiency in the human organism reaches a big part of the world's population, turning necessary the increase of input of the bioaccessible micronutrient in the diet in order to improve health and well-being, avoiding diseases like anemia. The biggest part of iron in the diet is found in the form of non-heme iron, with its absorption being dependent of other components of the diet and of the individual's iron reserves. Compounds known as potentiators of iron absorption are being applied, such as vitamin C, which act as a reducer of lumen, increasing the absorption of the mineral. Besides fruits, the wastes of the processing such as peels, seeds and bagasse can be cited as sources of ascorbic acid. Since the wheat flour is a very consumed food being present in many food

formulations, it was selected to be fortified with iron aiming at increasing the input of this mineral in the diet against anemia. The objective of the study was to enhance the commercial wheat flour (already fortified with iron) with microcapsules obtained from the extract of papaya by-products flour with ascorbic acid and lyophilized extract of papaya by-products flour and observe the bioaccessibility of the iron in the end of the process. Three treatments were applied: spray dried microparticles in the ratio 1:2 with wheat flour (T2), microparticles obtained by double emulsion followed by complex coacervation with 50% emulsion liquid extract + corn oil in relation to the polymer with wheat flour (T4), and lyophilized extract of papaya by-products flour with wheat flour (T6) and controls: positive with ferrous sulfate and ascorbic acid (1:1) and negative control (only Caco-2 cells, without addition of samples). There was conducted the cultivation of the cultures of Caco-2 cellular tissues and on the 14^o day was conducted a digestion process (oral, gastric and intestinal) of the treatments together with the wheat flour. The bioaccessibility of the iron was measured by the ferritin. The mean content of ferritin formed varied between 0.02 and 1.19 ng/mg of protein. There were no positively significant differences of the treatments conducted in relation to the commercial wheat flour ($p < 0.05$). Facing the proposed objectives and the obtained results, it can be concluded that enhancing the wheat flour with ascorbic acid in the conditions and proportions used is not enough to increase the bioaccessibility of the iron present in the commercial wheat flour.

Keywords: Anemia; Fortification; Bioavailability; Antinutrients; In vitro digestion; Caco-2 cells

5.1. Introdução

Existem diferenças entre os conceitos de bioaccessibilidade e biodisponibilidade de nutrientes. Bioaccessibilidade é definida como a quantidade de um determinado nutriente liberado de sua matriz alimentar durante o processo digestivo que está disponível para a absorção intestinal (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012), sendo possível determiná-la por métodos in vitro. Biodisponibilidade é definida como a proporção dos nutrientes nos alimentos que é absorvida e utilizada efetivamente, englobando liberação da matriz, assimilação, absorção pelas células do intestino, transporte e conversão do nutriente para sua forma ativa biologicamente no corpo (COZZOLINO e PEDROSA, 1995; ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012). Desta forma, a biodisponibilidade não pode ser medida diretamente com os métodos de ensaios in vitro, já que dependerá também dos fatores apresentados por cada indivíduo como estado nutricional, idade, fisiologia, apresentação de doenças infecciosas, crônicas, agudas e outras variáveis (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012).

Estudos in vitro estão sendo realizados para diagnosticar a bioaccessibilidade de alguns micronutrientes, dentre eles, o ferro. Para mensurar a bioaccessibilidade de um composto in vitro, existem alguns métodos que podem ser utilizados, dentre eles, modelos que utilizam a simulação do processo de digestão gástrica e intestinal aliados às culturas de células Caco-2, que são células pertencentes a uma linhagem celular desenvolvida a partir de um adenocarcinoma humano. A linhagem celular Caco-2 apresenta a capacidade espontânea de diferenciação celular durante o cultivo quando submetidas às condições de cultivo adequadas, apresentando características biológicas e morfológicas das células epiteliais do intestino delgado, os chamados enterócitos. Se diferenciam em monocamadas polarizadas indicadas pela formação das “cúpulas” ou domos, após a confluência, devido à presença de fluxos de íons e água e desenvolvem microvilosidades responsáveis pela absorção dos nutrientes (PINTO et al., 1983; GLAHN, 1998; VAN CAMPEN; GLAHN, 1999; SAMBUY et al., 2005; ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012;).

Os estudos de bioaccessibilidade e biodisponibilidade de micronutrientes são importantes pois muitas doenças são causadas pela falta de consumo ou deficiência na absorção destes. As deficiências de vitamina A, ferro, zinco e iodo são consideradas problemas globais já que atingem pelo menos 30% da população mundial, causando deficiência de vitamina A, anemia e bócio que poderia ser sanados através do aporte dos micronutrientes, contribuindo

assim, para melhorar a saúde e bem-estar dos seres humanos (AKHTAR, ANJUM e ANJUM, 2011). O ferro, por sua vez, é um elemento essencial para a nutrição animal e humana uma vez que participa das estruturas dos citocromos e enzimas, além de ser um componente heme das hemoglobinas e mioglobinas responsáveis pelo transporte, armazenamento e utilização do oxigênio dentro do organismo (GAUHERON, 2000).

Nos alimentos, o ferro está presente na forma de ferro ferroso ou ferro-heme (Fe^{2+}) encontrado em alimentos de origem animal, como carnes, aves e peixes, sob a forma de hemoglobina e mioglobina, representando cerca de 40% do ferro do tecido animal, a qual é uma forma bem absorvida e pouco influenciada pelas reservas de ferro dos indivíduos ou outros constituintes da dieta (CARPENTER e MAHONEY, 1992; CARDOSO, 2006). Pode ser encontrado na forma de ferro férrico ou ferro não-heme (Fe^{3+}), em alimentos de origem vegetal ou animal, no leite e derivados, ovos e em 60% do teor de ferro das carnes em geral, estando na forma de sais de ferro ou ligados a proteínas, dos quais aproximadamente 10% é aproveitado, dependendo fortemente de outros componentes da dieta e das reservas de ferro dos indivíduos (ACCIOLY; LACERDA; ENGSTROM, 2009; HADLER, JULIANO e SIGULEM, 2002; CARDOSO, 2006).

Com relação ao ferro não-heme, encontrado nos alimentos biofortificados, a bioacessibilidade é um conceito importante e para aumentar este aporte de ferro, emprega-se algumas técnicas como aumento do ferro total nas partes comestíveis das plantas, diminuição dos antinutrientes ou aumento dos fatores que auxiliam na absorção do ferro (COCKELL, 2007), os chamados promotores de absorção como a vitamina C. Estes compostos atuam como composto redutor do lúmen no momento da absorção transformando o Fe^{3+} em Fe^{2+} mais solúvel no meio alcalino do intestino delgado, potencializando a absorção do mineral pela formação de um quelato solúvel (CARDOSO, 2006; ANTUNES e SGARBIERI, 1980; HENRIQUES e COZZOLINO, 2009). Além dos alimentos facilitadores do processo de absorção do ferro não heme, como as frutas cítricas, existem alimentos inibidores da absorção, como por exemplo o café, chá, leite, cereais, bebidas carbonatadas contendo fosfatos, que são ricos em compostos como polifenóis, fitatos, fosfatos, oxalatos, taninos, Ca, P, Mg que acabam interferindo na digestibilidade de proteínas, absorção de nutrientes e minerais (SANTOS, 2006; SGARBIERI, 1987; FIALHO, 2009; CARDOSO, 2006).

Possíveis fontes de vitamina C são os subprodutos do processamento de frutos, como a casca, caroço, sementes e bagaço, compostos também por outras vitaminas, minerais, fibras e alguns compostos antioxidantes necessários para funções fisiológicas, que na maioria dos casos são desperdiçados (MATIAS et al., 2005). Dentre estes subprodutos, encontram-se os subprodutos do mamão. Dos Santos et al. (2014) estudaram a composição de farinhas de subprodutos de mamão de duas cultivares, obtendo farinhas ricas em fibras insolúveis, potássio, cobre e detectaram a presença de vitamina C e compostos fenólicos.

Alguns potencializadores da absorção de micronutrientes como o Fe, tem sido adicionados aos alimentos visando aumentar a bioacessibilidade deste componente. A adição de ácido ascórbico na produção de pães foi capaz de aumentar a bioacessibilidade do ferro em ensaios utilizando digestão *in vitro* acoplada as células Caco-2 (YEUNG et al., 2005). O teor total de vitamina C esteve diretamente correlacionado à formação de ferritina, que age como um marcador da absorção do ferro, nas batatas estudadas pelo modelo de digestão e células Caco-2 *in vitro*. Já compostos fenólicos como alguns flavonóides e ácidos fenólicos estão inversamente correlacionados na formação de ferritina, agindo como inibidores (ANDRE et al., 2015).

A falta de ferro no organismo devido ao baixo consumo dietético ou baixa absorção pode causar complicações na saúde, como a anemia, resultado de um longo tempo de balanço negativo entre a quantidade de ferro existente para manter o bom funcionamento dos tecidos e a necessidade do organismo (WHO, 2008). Para evitar a anemia causada pela deficiência de ferro é necessário que a ingestão dietética seja capaz de suprir 1-2 mg de ferro por

dia, já que em média, o organismo elimina esta quantidade através da urina, suor, fezes e por sangramento, como no caso das mulheres que são consideradas grupo de risco pois apresentam perdas devido a menstruação, gestações e lactação (ALLEYNE, HORNE e MILLER, 2008). Sendo assim, para crianças, homens adultos e mulheres após 50 anos sugere-se 7-11 mg de ferro por dia, para mulheres jovens não-grávidas 15-18 mg de ferro por dia e para mulheres grávidas 27 mg de ferro por dia (THE INSTITUTE OF MEDICINE, 2001).

Devido à importância do ferro na alimentação, foi adotada a fortificação das farinhas de trigo e milho no Brasil (de 4 a 9 mg.100g⁻¹ de farinha), visando o aumento da ingestão do mineral pela população prevenindo assim a anemia ferropriva, de acordo com a RDC nº 150 de abril de 2017 (BRASIL, 2017). A fortificação dos alimentos é uma prática aceita e empregada pelos processadores de alimentos desde a metade do século XX considerada uma solução econômica a longo prazo (REILLY, 1996; ABBASI e AZARI, 2011).

Diante do exposto, o presente estudo contempla a bioacessibilidade de Fe em farinha de trigo comercial através da adição de micropartículas que apresentam em sua composição o ácido ascórbico e o extrato da farinha de subprodutos de mamão liofilizado, observando assim, a bioacessibilidade do ferro após este processo.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Material

Os subprodutos de mamão para a obtenção do ácido ascórbico e posterior microencapsulação e liofilização foram obtidos como descrito no item 4.2.1 do capítulo I.

Tendo em vista a importância da farinha de trigo na alimentação da população brasileira, este produto foi escolhido para adicionar o ácido ascórbico. A farinha de trigo fortificada com ferro e ácido fólico como exigido pela RDC nº 150 de 2017 (BRASIL, 2017) foi obtida no mercado da cidade de Piracicaba (-22.725, -47.6476).

Os tratamentos aplicados foram: (T2) micropartículas obtidas por spray drying na proporção de 1:2 (v/v), (T4) micropartículas obtidas por emulsão dupla seguida da coacervação complexa com 50% de emulsão extrato líquido + óleo de milho em relação ao polímero, (T6) extrato da farinha de subprodutos de mamão liofilizado nesta etapa experimental. As micropartículas foram obtidas como citado no item 4.2.2.4 do capítulo I.

Os tratamentos (T2 e T6) foram selecionados por apresentar maior concentração de ácido ascórbico em relação aos outros tratamentos na quantificação do ácido ascórbico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o T4 foi selecionado para comprovar a baixa concentração do composto, isto é, para afirmar a abertura das micropartículas na quantificação por CLAE.

Além dos tratamentos, foi preparado o controle positivo com sulfato ferroso e ácido ascórbico (1:1) e o controle negativo que refere-se apenas as células Caco-2, sem adição de amostras.

5.2.2. Métodos

Para a avaliação da bioacessibilidade do ferro presente na farinha adicionada das micropartículas com ácido ascórbico e o extrato liofilizado, realizou-se a simulação *in vitro* da digestão oral, gástrica e intestinal e as culturas celulares do epitélio intestinal humano Caco-2 (Caucasian colon adenocarcinoma cell). A absorção de Fe por células Caco-2 foi medida pela formação de ferritina.

5.2.2.1. Digestão in vitro

A simulação in vitro da digestão incluindo a fase oral, gástrica e intestinal seguiu os procedimentos descritos por Garrett, Failla e Sarama (1999) e Glahn et al. (2002) com adaptações. Os tratamentos aplicados e as proporções definidas são apresentados na Tabela 8.

Em tubos de 50 mL após a pesagem de 2 g das amostras, 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⁻¹ (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⁻¹, 6 mmol.L de CaCl₂⁻¹ e 5 mmol.L KCl⁻¹ 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, temperatura 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 1N e adicionou-se 2 mL de solução de pepsina (Sigma® P7000) na concentração de 10000 unidades.mL⁻¹ 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 1 h. Em seguida, a reação gástrica foi cessada pelo ajuste do pH para 6,0 com NaHCO₃ 1M. Adicionou-se 3 mL de solução de extrato de bile (Sigma® B8631) na concentração 40 mg.mL⁻¹ em 100 mM NaHCO₃ e 2 mL de solução de pancreatina (Sigma® P1750) e lipase (Sigma® L3126) nas concentrações de ~4000 unidades.mL⁻¹ em 100 mM NaHCO₃ e ~1000 unidades.mL⁻¹ em 100 mM NaHCO₃, respectivamente, o pH foi ajustado para 6,5 e o volume ajustado para 50 mL. Incubou-se os tubos à 37 °C por 2 h com agitação (120 rpm) para simulação da etapa intestinal (duodenal). Esse material foi adicionado as células para a medida da bioacessibilidade do Fe.

Tabela 8. Tratamentos aplicados na digestão

Tratamentos	Proporção	
	C ₆ H ₈ O ₆ :FeSO ₄	Amostra : Farinha de trigo comercial (0,042 mg de ferro.g ⁻¹)
Controle negativo	-	-
Controle positivo	1:1	-
Farinha de trigo comercial	-	-
T2	-	1:1
T4	-	1:1
T6	-	1:1

*Legenda: Controle negativo=sem amostras; Controle positivo=ácido ascórbico + sulfato ferroso; T2= micropartículas obtidas por spray drying na proporção de 1:2 (v/v); T4= micropartículas obtidas por emulsão dupla seguida da coacervação complexa com 50% de emulsão extrato líquido + óleo de milho em relação ao polímero; T6= extrato da farinha de subprodutos de mamão liofilizado.

5.2.2.2. Cultivo das células intestinais humanas Caco-2

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 Garrett, Failla e Sarama (1999). As células utilizadas nos experimentos foram da passagem 28 – 31.

Primeiramente, foram cultivadas em frascos de cultura T75 para replicagem 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 frasco enquanto que nos frascos T25 foram semeadas na concentração $2,4 \times 10^5$. O meio utilizado para cultura foi o DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (D7777; Sigma®) e tamponado com 15 mmol/L de tampão HEPES composto por NaCl 0,15M e EDTA 20mM em pH 8,0. O pH do meio foi ajustado para 7,0 e esterilizado através da filtração asséptica realizada em cabine de segurança biológica (CSB nível 2), assim como todos os outros procedimentos relacionados ao cultivo celular. 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 (SFB). Ao alcançar o período de pós-confluência, o DMEM suplementado teve a proporção de SFB reduzida para 8-7,5%. Os frascos foram mantidos em incubadora com atmosfera úmida, ar/CO₂ (95:5 v/v) a 37 °C durante todo cultivo. Realizou-se a troca do DMEM suplementado por um recém preparado a cada dois dias.

Utilizou-se o microscópio invertido INV3 Bel Photonics no aumento de 100x (Bel Engineering, Monza, Itália) para acompanhar o crescimento, confluência e pós-confluência das células (Figura 25). 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 foram utilizadas para a fase experimental entre o 14º e 15º dia pós-confluência, nos quais já apresentavam domas devido à diferenciação em enterócitos, período ideal para a absorção dos nutrientes (GARRETT; FAILLA; SARAMA, 1999). Nesta fase foi adicionado o digerido como descrito na fase experimental.

Figura 25. Crescimento do tecido celular Caco-2.

*Legenda: (A) Dois dias após semeadura, (B) Seis dias após semeadura, (C) Primeiro dia de confluência 90%, (D) Diferenciação celular – Enterócitos, (E) Cobertura do tecido celular antes do início do experimento no 15º dia pós-confluência, (F) Tecido celular após 2h de incubação e absorção da amostra.

5.2.2.3. Fase experimental

No final do processo de digestão *in vitro*, retirou-se a alíquota de 12 mL dos materiais digeridos que foram centrifugados a 3300 rpm por 45 min a 4°C. O sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e filtrado por membranas de celulose (Milipore® 0,22µm de poro) e foi adicionada a cultura de células.

A fração solúvel foi diluída na proporção 1:4 em meio de cultura basal DMEM (pH 6,5). As culturas celulares foram lavadas com meio basal DMEM e foram adicionados, em seguida, 5 mL da fração solúvel na proporção 1:4. Foram utilizados quatro frascos T25 para cada tratamento. Os frascos (T25) foram incubados por 2 h, e durante este período a integridade do tecido celular foi verificada em microscópio. Após o período de incubação, um novo meio basal DMEM foi adicionado e os frascos permaneceram incubados por mais 22 h.

Para a coleta das células, lavou-se o tecido com tampão fosfato (PBS gelado, pH 7,0) por três vezes, em cada frasco foram adicionados 3 mL de PBS a cada lavagem e com ajuda de um raspador de borracha as células foram coletadas e transferidas para tubos de centrifuga (15 mL). Os tubos foram centrifugados por 10 min 1400 rpm a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi coberto com gás N₂ e os tubos selados com *parafilm*® e imediatamente congelados à -80 °C até a análise de ferritina e proteína.

5.2.2.4. Análise de ferritina

Para a análise de ferritina, os tubos com os *pellets* de células foram descongelados à temperatura ambiente, adicionados de 100 µL de PBS, agitados em vortex por 1 minuto, deixados em banho de ultrassom por 15 minutos e novamente agitados por 1 minuto. A análise de ferritina foi realizada com os reagentes do Kit ELISA EK-310-25 (Phoenix Pharmaceuticals, Califórnia, Estados Unidos). Adicionou-se 20 µL do padrão, do controle e da amostra nos poços da microplaca, em seguida colocou-se 100 µL do reagente conjugate enzyme e agitou-se levemente por 30 segundos. A microplaca foi incubada a temperatura ambiente por 45 minutos, em seguida foram lavadas com água deionizada (5 vezes) e adicionado 100 µL do reagente TMB (One-Step), foram então incubadas em temperatura ambiente e local escuro por 20 minutos. Para cessar a reação adicionou-se 100 µL da solução STOP e agitou-se por 30 segundos, em seguida foi realizada a leitura da reação antígeno anticorpo por UV em leitor de microplaca.

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 µg.mL⁻¹. A absorbância dos padrões e das amostras foi determinada através de leitor de microplaca a 450 nm. As concentrações de ferritina nas amostras foram calculadas através da equação da reta e os resultados foram expressos em ng de ferritina.mL⁻¹.

5.2.2.5. Análise de proteína

Para a análise de proteínas, utilizou-se a mesma solução preparada para a análise de ferritina, isto é, os tubos com os pellets de células foram descongelados à temperatura ambiente, adicionados de 100 µL de PBS, agitados em vortex por 1 minuto, deixados em banho de ultrassom por 15 minutos e novamente agitados por 1 minuto. Para a determinação da concentração de proteína das amostras, utilizou-se o Kit Bio-Rad Protein Assay Reagent (BRADFORD, 1976).

Adicionou-se 20 µL da amostra diluída (30x) e do branco (apenas água destilada) nos poços da microplaca, em seguida adicionou-se 300 µL do reagente de Bradford, em local escuro. Em seguida, aguardou-se 5 minutos e a leitura foi realizada por UV em leitor de placa. Foi construída a curva padrão de absorbância por regressão linear das leituras de absorbância para concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BSA) de 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mg de proteína.mL⁻¹. A absorbância tanto para a curva como amostras foi determinada através de leitor de placa a 595 nm. As concentrações de proteína nas amostras foram calculadas utilizando equação da reta e os resultados finais foram expressos em ng de ferritina.µg de proteína⁻¹.

5.2.2.6. Análises estatísticas

Na análise dos resultados para ferritina e proteína, foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado com 3 repetições, sendo os resultados expressos em termos de média e desvio-padrão. Para a avaliação dos dados realizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida da comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, utilizando o software Assistat 7.7. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. A construção dos gráficos e tabelas foi realizada através do programa Excel (Microsoft) e para a edição das fotos foi utilizado o programa Fotojet (online).

5.3. Resultados e discussão

Os resultados referentes à absorção celular do ferro da farinha de trigo com a aplicação dos tratamentos encontram-se na Tabela 9. O tratamento chamado “controle positivo” foi utilizado para confirmar a absorção celular e apresentou teor médio de 126,15 ng de ferritina.mg de proteína⁻¹.

Tabela 9. Teores de ferritina formada pelas culturas celulares Caco-2 após 2h horas de incubação com meio de cultura contendo 25% da amostra e 22h de incubação com meio basal DMEM. Valores expressos em ng de ferritina por mg de proteína celular.

Tratamentos	Média do teor de ferritina (ng de ferritina.mg de proteína ⁻¹)
Controle negativo	1,19±0,376 ^a
Farinha de trigo comercial	0,62±0,246 ^{ab}
T2	0,37±0,415 ^{ab}
T4	0,02±0,001 ^b
T6	0,95±0,386 ^a

*Resultados expressos como média ± desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de 5% de significância.

**Legenda: Controle negativo=sem amostras; T2= micropartículas obtidas por spray drying na proporção de 1:2 (v/v); T4= micropartículas obtidas por emulsão dupla seguida da coacervação complexa com 50% de emulsão extrato líquido + óleo de milho em relação ao polímero; T6=extrato da farinha de subprodutos de mamão liofilizado.

O teor médio de ferritina formado variou entre 0,02 e 1,19 ng.mg⁻¹ de proteína (Tabela 9). Não houve diferenças significativas positivas dos tratamentos realizados em relação a farinha de trigo comercial ($p < 0,05$), o que pode ser justificado pela ação de inibidores de absorção do ferro de origem vegetal como o ácido fítico e seus sais na absorção de ferro não-heme (BRUNE et al., 1992). Porém, quando observado apenas as médias referentes a ferritina, o T6 apresentou média semelhante ao controle negativo e superiores à farinha de trigo comercial. Por se tratar de um método de análise relativamente complexo, no qual muitos fatores podem influenciar os resultados, os desvios obtidos foram altos justificando a falta de diferenças significativas dos dados.

Uma possível explicação para o que ocorreu neste estudo é que no processo de digestão o ferro é liberado dos complexos por conta do pH ácido e também pelo processo da digestão em si, e ao entrar no intestino com pH 7 ou 8 na forma não heme favorece a formação de novos complexos com fitatos, taninos, ascorbato, oxalatos, existindo uma competição entre eles dependendo da solubilidade e grau de afinidade dos ligantes, reforçando o impacto destes inibidores (FORTH e RUMMEL, 1973; AKHTAR, ANJUM e ANJUM, 2011).

A farinha de trigo apresenta o ácido fítico em sua composição (FRONTELA, ROS e MARTINÉZ, 2011), que se apresenta na forma de sais, conhecido como fitato na forma IP5, IP4 e IP3 de acordo com a quantidade de fósforos na estrutura, sendo a principal forma de armazenamento de fósforo nos tecidos vegetais, como cereais e legumes (KUMAR et al., 2010). Sua estrutura apresenta capacidade de quelar fortemente cátions, como cálcio, magnésio, zinco, cobre, ferro e potássio, formando sais insolúveis, capazes de prejudicar a absorção e de digestão desses minerais por animais (ERDMAN, 1981; RABOY, 2001), o que pode ter ocorrido neste estudo pela baixa absorção de Fe pelas células Caco-2.

O teor de fitato em farinhas de trigo e em farinhas de trigo integrais é extremamente superior quando comparados aos teores deste inibidor em produtos de padaria que levam a farinha de trigo em sua composição, como muffins e pães, os quais passam pelo processo de fermentação e cozimento, os quais são capazes de reduzir em 90% o teor de fitato nestes produtos finais (FRONTELA, ROS e MARTINÉZ, 2011). Como neste estudo foi utilizada somente a matéria prima farinha de trigo para os experimentos sem passar pela fermentação ou cozimento, o fitato pode ter agido como inibidor da absorção do ferro e mesmo com a adição do ácido ascórbico nas concentrações aplicadas, não foi possível reverter a ação dos compostos inibidores de absorção.

Estudos recentes também investigaram o efeito de alimentos com compostos facilitadores da absorção de ferro e sua ação na dieta humana, observando que mesmo com a presença dos promotores, pode não haver absorção do ferro não-heme pela ação de compostos como o ácido fítico e polifenóis. Eagling et al. (2014) estudaram a biodisponibilidade de ferro em pães ázimos feitos de grãos integrais e farinhas brancas de duas cultivares de trigo comerciais a *Rialto*, trigo duro com alta concentração de ferro usado para pães e a *Riband*, trigo mole utilizado na produção de biscoitos e bolos com menor teor de ferro, obtendo como resultado maior teor de ferritina detectada para pães produzidos com *Riband*, apesar do menor teor de ferro. Os autores obtiveram resposta inversamente proporcional da ferritina celular às concentrações de fitato e ferro nos pães testados, isto é, quanto maior a quantidade de fitato menor a quantidade de ferritina detectada, comprovando a inibição deste composto na absorção do ferro, resultado o qual deve ser levado em consideração na biofortificação como estratégia para reduzir a anemia ferropriva. Além disso, no caso de produtos integrais existe a presença de fosfatos de inositol que se ligam com o ferro com muita força, reduzindo ainda mais a biodisponibilidade do material.

Outros inibidores de absorção de ferro têm sido estudados, como os polifenóis presentes em batatas como relatado por Miranda, Deuber e Evers (2013), que teve a formação de ferritina diminuída possivelmente pela presença destes compostos. Nemirovsky et al. (2014), que estudaram o efeito da adição do suco de camu-camu rico em vitamina C em refeições típicas do Peru como mingau de farinha de trigo e arroz com lentilha, obtendo como resultado final uma relação inversa, isto é, apesar da elevadíssima oferta de vitamina C que poderia agir como promotora da absorção do ferro não-heme presente nas amostras, os tratamentos que apresentaram a maior quantidade de suco na sua composição também apresentaram a menor biodisponibilidade de ferro por células Caco-2. Como explicação para tal, os autores sugerem que além do alto teor de vitamina C, os frutos também apresentam teores extremamente elevados de polifenóis, considerados potentes antinutrientes, diminuindo a biodisponibilidade do ferro de uma maneira que a vitamina C não consegue reverter, tornando o fruto inapropriado para estimular a absorção do ferro não-heme. Além disso, o ácido fítico presente na lentilha também é considerado um forte inibidor da absorção do ferro.

Em suma, seriam necessários estudos com humanos para comprovar a efetividade dos tratamentos aplicados no estudo, já que existem outros fatores que podem auxiliar na absorção do mineral em situações reais. Estudos realizados com humanos comprovaram que o consumo de 25 mg de ácido ascórbico juntamente com as refeições é capaz de aumentar a eficiência na absorção do mineral, mesmo em dietas que apresente compostos inibidores de absorção, como um método prático de aumentar o teor de ferro no organismo humano (DIAZ et al., 2003).

5.4. Conclusão

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que enriquecer a farinha de trigo com ácido ascórbico nas condições e proporções utilizadas não foi suficiente para aumentar significativamente a bioacessibilidade do ferro presente na farinha de trigo comercial.

Referências

- ABBASI, S.; AZARI, S. Efficiency of novel iron microencapsulation techniques: Fortification of milk, **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 1927–1933, 2011.
- 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. Cap. 2.2, p. 33-43, 2009.
- AKHTAR, S.; ANJUM, F. M.; ANJUM, M. A. Micronutrient fortification of wheat flour: Recent development and strategies. **Food Research International**, v. 44, p. 652-659, 2011.
- ALLEYNE, M.; HORNE, M. K.; MILLER, J. Individualized treatment for iron-deficiency anemia in adults. **The American Journal of Medicine**, v. 121, n. 11, 2008.
- ANDRE, C.M.; EVERS, D.; ZIEBEL, J.; GUIGNARD, C.; HAUSMAN, J.F.; BONIERBALE, M.; FELDE, T.Z.; BURGOS, G. In vitro bioaccessibility and bioavailability of iron from potatoes with varying vitamin C, carotenoid, and phenolic concentrations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n.41, p. 9012-9021, 2015.
- ANTUNES, P. L.; SGARBIERI, V. C. Effect of heat treatment on the toxicity and nutritive value of dry bean (*Phaseolus vulgaris* var. Rosinha G2) proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 5, p. 935-938, 1980.
- BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRASIL. Resolução nº 150, de 13 de abril de 2017. Regulamento Técnico para o enriquecimento das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico. **Diário oficial da união**, Brasília, 13 de abril de 2017. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=37&data=17/04/2017>> Acesso em: 10 de maio de 2018.
- BRUNE, M.; ROSSANDER-HULTHÉN, L.; HALLBERG, L.; GLEERUP, A.; SANDBERG, A. S. Iron absorption from bread in humans: Inhibiting effects of cereal fibre, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 442–449, 1992.
- CARDOSO, M. A. Ferro. In: CARDOSO, M. A. Nutrição e metabolismo: **Nutrição humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2. ed., cap. 16, p. 258-275. 2006.
- CARPENTER, C.E.; MAHONEY, A.W. Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v.31, n.4, p. 333-367, 1992.
- COCKELL, K. A. An overview of methods for assessment of iron bioavailability from foods nutritionally enhanced through biotechnology. **Journal of AOAC International**, v. 90, n. 5, p. 1480-1491, 2007.
- COZZOLINO, S.M.F.; PEDROSA, L.F.C. Grupo de trabalho: Biodisponibilidade de nutrientes. **Boletim SBCTA**, v.29, n.1, p.53-56, 1995.

- 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 isotopes¹⁻³. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, p. 436-440, 2003.
- DOS SANTOS, C. M.; de ABREU, C. M. P.; FREIRE, J. M.; QUEIROZ, E. de R.; MENDONÇA, M. M. Chemical characterization of the flour of peel and seed from two papaya cultivars. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 34, n. 2, p. 353-357, 2014.
- EALING, T.; WAWER, A. A.; SHEWRY, P. R.; ZHAO, F. J.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Iron bioavailability in two commercial cultivars of wheat: Comparison between wholegrain and white flour and the effects of nicotianamine and 2'-deoxymugineic acid on iron uptake into Caco-2 cells. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 62, p. 10320-10325, 2014.
- ERDMAN, J. Bioavailability of trace minerals from cereals and legumes. **Cereal Chemistry**, v. 58, p. 21-26, 1981.
- 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, p.1-22, 2012.
- FIALHO, E. Fontes alimentares, biodisponibilidade de alimentos e fome oculta. In: RAMALHO, A. **Fome Oculta: diagnóstico, tratamento e prevenção**. Editora Atheneu, 2009. Cap. 3, p. 99-120, 2009.
- FORTH, W.; RUMMEL, W. Iron absorption. **Physiological Reviews**, v. 53, p. 724-993, 1973.
- FRONTELA, C.; ROS, G.; MARTÍNEZ, C. Phytic acid content and in vitro iron, calcium and zinc bioavailability in bakery products: The effect of processing. **Journal of Cereal Science**, v. 54, p. 173-179, 2011.
- GARRETT, D. A., FAILLA, M. L., SARAMA, R. J. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 47, 4301-4309, 1999.
- GAUCHERON, F. Iron fortification in dairy industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 403-409, 2000.
- GLAHN, R. P.; CHENG, Z.; WELCH, R. M.; GREGORIO, G. B. Comparison of iron bioavailability from 15 rice genotypes: studies using in vitro digestion/caco-2 cell culture model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3586-3591, 2002.
- 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**, Philadelphia, v. 128, n.9, p. 1555-1561, 1998.
- 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**, Philadelphia, v. 128, n.9, p. 1555-1561, 1998.
- HADLER, M.C.C.M.; JULIANO, Y.; SIGULEM, D. M. Anemia do lactente: etiologia e prevalência. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 4, p. 321-326, 2002.
- HENRIQUES, G.; COZZOLINO, S. M. F. Ferro. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**, Barueri: Manoele, 3. ed, cap. 26, p. 569-596, 2009.
- KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKAR, H. P. S.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: a review. **Food Chemistry**, v. 120, p. 945-959, 2010.
- MATIAS, M.F.O.; OLIVEIRA, E.L.; GERTRUDES, E.; MAGALHÃES, M.A. Use of fibers obtained from the cashew (*Anacardium occidentale*, L) and guava (*Psidium guajava*) fruits for enrichment of food products. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.48, p.143-150, 2005.

- MIRANDA, L.; DEUBER, H.; EVERS, D. The impact of in vitro digestion on bioaccessibility of polyphenols from potatoes and sweet potatoes and their influence on iron absorption by human intestinal cells. **Food & Function**, v. 11, 2013.
- NEMIROVSKY, Y.; ZAVALITA, N.; VILLANUERVA, M. E.; ARMAH, S. M.; IMAN, S. A.; REDDY, M. B. Negative Effect of Camu-Camu (*Myrciaria dubia*) Despite high vitamin C content on iron bioavailability, using a Caco-2 cell model. **Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences**, v. 64, n. 1, p. 45-48, 2014.
- OOMEN, A. G.; ROMPELBERG, C. J. M.; VAN DE KAMP, E.; PEREBOOM, D. P. K. H.; DE ZWART, L. L.; SIPS, A. J. A. M. Effect of bile type on the bioaccessibility of soil contaminants in an in vitro digestion model. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 183-188, 2004.
- PINTO, M.; ROBINELÉON, S.; APPAY, M.D.; KEDINGER, M.; TRIADOU, N.; DUSSAULX, E.; LACROIX, B.; ZWEIBAUM, A. 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.
- RABOY, V. Seeds for a better future: 'low phytate' grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. **Trends in plant Science**, v. 6, n 10, p. 458-462, 2001.
- REILLY, C. Too much of a good thing? The problem of trace element fortification of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p. 139-142, 1996.
- SAMBUY, Y.; de ANGELIS, I.; RANALDI, G.; SCARINO, M. L.; STAMMATI, A.; ZUCCO, F. The Caco-2 cell lines as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. **Cell Biology and Toxicology**, v. 21, p. 1-26, 2005.
- SANTOS, M.A.T. Efeito do cozimento sobre alguns fatores antinutricionais em folhas de brócoli, couve-flor e couve. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n. 2, p. 294-301, 2006.
- SGARBIERI, V.C. **Alimentação e Nutrição**. São Paulo: Almed; 1987.
- THE INSTITUTE OF MEDICINE. **Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc**. Washington, DC: National Academy, 2001.
- VAN CAMPEN, D.R.; GLAHN, R.P. Micronutrient bioavailability techniques: accuracy, problems and limitations. **Field Crops Research**. V.60, p.93-113, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Worldwide prevalence of anemia 1993-2005**. Geneva, World Health Organization, 2008.
- YEUNG C. K., MILLER, D. D.; CHENG, Z.; GLAHN, R. P. Bioavailability of elemental iron powders in bread assessed with an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 3, 2005.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo colaborou para a valorização dos subprodutos agroindustriais, os quais mostraram-se fontes de ácido ascórbico e potenciais fontes de outros nutrientes e antinutrientes. Para o extrato da farinha de subprodutos mamão, a concentração de ácido ascórbico foi superior quando comparado à do abacaxi. A técnica de microencapsulação por spray drying mostrou-se efetiva na preservação do ácido ascórbico assim como o processo de liofilização.

A concentração do extrato aquoso seria válida neste estudo para aumentar os níveis de ácido ascórbico presente nas micropartículas coacervadas e também das secas por atomização, aumentando assim a eficiência do processo. Além disso, o estudo da bioacessibilidade do ferro revelou que mesmo na presença de compostos facilitadores da absorção de minerais, como o ácido ascórbico, a bioacessibilidade não é garantida, isto é, no estudo não houve diferenças significativas quando comparados aos tratamentos controle. Além disso, os desvios foram altos, enfatizando a complexidade do método de análise.

Sendo assim, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, fica evidente a necessidade de estudos aprofundados sobre a bioacessibilidade e biodisponibilidade de micronutrientes como o ferro e, ainda, focados na investigação de potenciais inibidores de absorção. Além disso, a questão de bioacessibilidade está diretamente relacionada aos efeitos na saúde dos consumidores e aos riscos de desenvolvimento de doenças como a anemia, no caso do ferro. Estudo *in vivo* também são necessários para correlacionar os resultados obtidos na pesquisa, uma vez que existem outras variáveis não adotadas nos estudos *in vitro*.