



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos

ANA PAULA REBELLATO

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES COMPOSTOS DE FERRO EM FARINHA DE TRIGO REFINADA E INTEGRAL NOS PARÂMETROS REOLÓGICOS, TECNOLÓGICOS, ESTABILIDADE E BIOACESSIBILIDADE DE MINERAIS EM PÃES TIPO FRANCÊS.

INFLUENCE OF THE ADDITION OF DIFFERENT IRON COMPOUNDS IN REFINED AND WHOLE-WHEAT FLOURS ON RHEOLOGICAL, TECHNOLOGICAL, STABILITY PARAMETERS AND BIOACCESSIBILITY OF MINERALS OF FRENCH BREAD.

CAMPINAS

2016

ANA PAULA REBELLATO

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES COMPOSTOS DE FERRO EM FARINHA DE TRIGO REFINADA E INTEGRAL NOS PARÂMETROS REOLÓGICOS, TECNOLÓGICOS, ESTABILIDADE E BIOACESSIBILIDADE DE MINERAIS EM PÃES TIPO FRANCÊS.

INFLUENCE OF THE ADDITION OF DIFFERENT IRON COMPOUNDS IN REFINED AND WHOLE-WHEAT FLOURS ON RHEOLOGICAL, TECHNOLOGICAL, STABILITY PARAMETERS AND BIOACCESSIBILITY OF MINERALS OF FRENCH BREAD.

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos.

Thesis presented to the Faculty of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor, in Food Science.

Supervisor/Orientador: JULIANA AZEVEDO LIMA PALLONE

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ANA PAULA REBELLATO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. JULIANA AZEVEDO LIMA PALLONE

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 140288/2013-9

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

R241i Rebellato, Ana Paula, 1977-
Influência da adição de diferentes compostos de ferro em farinha de trigo refinada e integral nos parâmetros reológicos, tecnológicos, estabilidade e bioacessibilidade de minerais em pães tipo francês / Ana Paula Rebellato. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Juliana Azevedo Lima Pallone.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Bioacessibilidade. 2. Ferro. I. Pallone, Juliana Azevedo Lima. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Influence of the addition of different iron compounds in refined and whole-wheat flours on rheological, technological, stability parameters and bioaccessibility of minerals of french bread

Palavras-chave em inglês:

Bioaccessibility

Iron

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Juliana Azevedo Lima Pallone [Orientador]

Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Roger Wagner

Solange Guidolin Canniatti Brazaca

Fabíola Manhas Verbi Pereira

Data de defesa: 14-10-2016

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone
FEA/UNICAMP - (Presidente)

Dra. Fabíola Manhas Verbi Pereira
UNESP/Araraquara (Titular)

Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco
Instituto de Tecnologia de Alimentos/ITAL - (Titular)

Dr. Roger Wagner
UFSM - (Titular)

Dra. Solange Guidolin Canniatti Brazaca
USP/ESALQ - (Titular)

Dra. Caroline Joy Steel
FEA/UNICAMP - (Suplente)

Dr. Marcelo Antonio Morgano
ITAL/CCQA - (Suplente)

Dra. Maria Teresa Pedrosa Silva Clerici
DTA/FEA - (Suplente)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

Dedico esta conquista à minha família:

Rudimar e Luisa.

E aos meus pais Neide e Rafael.

Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo Rudimar, pelo companheirismo, carinho, compreensão e paciência; agradeço todos os dias.

À minha filha Luisa, amor da minha vida, aprendizado constante.

Aos meus pais, Rafael e Neide, por sempre apoiarem minhas decisões. À minha irmã e sobrinha, Fabiana e Julya, companheiras de todas as horas, por me aguentarem nos dias mais difíceis.

Aos meus amigos. Obrigada pelo apoio, compreensão e momentos de diversão.

À Profa. Juliana, pela orientação, apoio e amizade. Obrigada pela oportunidade e confiança.

Aos membros da banca, pelas valiosas correções e sugestões. Muito obrigada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida.

Ao pessoal do Laboratório de Análise de Alimentos da FEA/UNICAMP. Obrigada por todos os ensinamentos, auxílio, companhia, almoços, cafés, choros e risadas! Em especial a Joyce, Eduardo e Kleidson.

Agradecimento especial para Jéssica Castro e Jéssica Bussi, pela amizade, dedicação e carinho, a ajuda de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho. Agradeço também a aluna Bruna da UFSM.

Ao Moinho Guaçu Mirim e aos fornecedores de insumos, as doações foram fundamentais para a realização do trabalho.

Agradeço a Profa Caroline e ao Prof. Roger pela colaboração.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Cereais, agradeço de coração o apoio e a ajuda, em especial a Amanda, Geórgia, Lara, Fernanda e Márcio.

Aos funcionários da Padaria da FEA, por me ajudarem a produzir os pães.

Aos funcionários e colaboradores da creche da UNICAMP, por ajudarem a cuidar da Luisa.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, especialmente ao Departamento de Ciência de Alimentos e aos colaboradores e funcionários da Unicamp que me ajudaram nas etapas deste trabalho.

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

Muito obrigada!

RESUMO

Farinhas são fortificadas com diferentes compostos de ferro desde 2002. Nesse trabalho, objetivou-se verificar a influência de sulfato ferroso (SF), fumarato ferroso (FF), ferro reduzido (FeR), sódio ferro etilenodiaminotetracético (NaFeEDTA), sulfato ferroso microencapsulado (SFmicro) e fumarato ferroso microencapsulado (FFmicro) utilizados na fortificação de farinha de trigo refinada e integral, nas características reológicas da massa, na qualidade tecnológica dos pães, estimar a bioacessibilidade dos compostos de ferro adicionados, e de zinco e cálcio naturalmente presentes em pães tipo francês pelos métodos *in vitro* de solubilidade e diálise. Além disso, estudou-se o efeito da fortificação das farinhas de trigo refinada e integral com os diferentes compostos de ferro, em relação aos parâmetros de qualidade e/ou estabilidade como acidez titulável, cor, índice de peróxido (IP) e hexanal durante o período de estocagem de 120 dias. Foram empregadas amostras controle (sem fortificação) para as análises em farinhas e pães produzidos. Os diferentes compostos de ferro alteraram as propriedades reológicas da massa e a qualidade tecnológica dos pães, porém foi possível a elaboração dos pães tipo francês fortificado com estes compostos. O composto NaFeEDTA demonstrou ser a forma mais eficaz de ferro para a fortificação tanto da farinha de trigo refinada quanto da integral devido ao seus maiores teores de Fe dialisado em pães (52,43% e 46,14%, respectivamente). Verificou-se que o NaFeEDTA utilizado na fortificação da farinha refinada contribuiu positivamente para a absorção do zinco, e os compostos NaFeEDTA, SFmicro e FFmicro contribuíram positivamente na biodisponibilidade do zinco, quando utilizados na fortificação de farinha integral. A bioacessibilidade do cálcio não foi influenciada pelos compostos de ferro utilizados na fortificação das farinhas refinadas empregadas na produção de pão francês. Por outro lado, quando o estudo foi realizado com pães integrais, verificou-se que os compostos SF, FF e SFmicro influenciaram positivamente a bioacessibilidade deste mineral. Não foram detectadas as frações de *mi*oinositol fosfato (fitatos) nos pães integrais controle e nos fortificados. No estudo da estabilidade da farinha refinada foram verificados teores de ferro de 1,0 mg/100g no controle e de 4,41 a 5,84 mg/100 g nas amostras fortificadas. O SF demonstrou ser o composto que mais modificou os parâmetros de qualidade da farinha refinada. Os compostos SFmicro e FFmicro apresentaram efeito negativo na qualidade da farinha refinada levando-se em consideração o parâmetro hexanal. Nas farinhas integrais, foram quantificados teores de ferro de

1,38 mg/100 g no controle e teores de 4,80 a 6,29 mg/100 g nas farinhas fortificadas. O SF e FFmicro apresentaram os maiores valores de IP em 30 dias de estocagem, quando comparado ao controle, já as farinhas fortificadas com SF (30 dias) e SFmicro (90 dias) foram as que apresentaram os maiores valores de hexanal. O FeR e NaFeEDTA foram os que menos alteraram os parâmetros de qualidade das farinhas refinadas e integrais avaliadas. Portanto, os diferentes compostos de ferro quando empregados na fortificação de farinha de trigo, refinada e integral, podem influenciar de maneira diferenciada na estabilidade do produto durante a estocagem. Concluiu-se que, dependendo do composto de ferro empregado na fortificação de farinhas refinadas e integrais, a bioacessibilidade do mineral será diferente e isso indica que os impactos da obrigatoriedade da fortificação de farinhas tem relação direta com a forma de ferro empregada. Além disso, a absorção de zinco naturalmente presente nos pães também tem relação com o tipo de ferro utilizado. Durante a estocagem das farinhas fortificadas e controle observou-se o efeito pró-oxidante do ferro na estabilidade do produto.

ABSTRACT

Flours are fortified with different compounds of iron since 2002. This work aimed to verify the influence of ferrous sulfate (FS), ferrous fumarate (FF), reduced iron (RI), sodium iron ethylenediaminetetraacetic acid (NaFeEDTA), microencapsulated ferrous sulfate (FSmicro) and microencapsulated ferrous fumarate (FFmicro) used in the fortification of refined and whole-wheat flours on the rheological characteristics of the mass, on the technological quality of bread, and to estimate the bioaccessibility of added iron compounds, and zinc and calcium that were naturally present in French bread by the *in vitro* methods of solubility and dialysis. In addition, we studied the effect of fortification of refined and whole-wheat flour with different iron compounds related to the quality and / or stability parameters as titratable acidity, color, peroxide value (PV) and hexanal during the storage period of 120 days. Sample controls (non-fortified flours) were used for analyzes in flours and produced French breads. The different iron compounds changed the rheological properties of the mass and the technological quality of bread, but it was possible to elaborate fortified French bread with these compounds. The NaFeEDTA proved to be the most effective iron form for iron fortification of both refined and whole-wheat flours because of its highest dialyzed iron content in bread (52.43% and 46.14%, respectively). It was verified that the NaFeEDTA used in the fortification of refined flour positively contributed to the absorption of zinc, and NaFeEDTA, microencapsulated ferrous sulfate and microencapsulated ferrous fumarate compounds positively contributed to the bioavailability of zinc, when they were used in whole-wheat flour fortification. The calcium bioaccessibility was not influenced by the iron compounds used in the fortification of refined flours applied in the production of French bread. On the other hand, when the study was done on whole-wheat bread, it was found that the FS, FF and microencapsulated ferrous sulfate positively contributed to the bioaccessibility of this mineral. It was not detected any myo-inositol phosphate fraction (phytates) in the whole-wheat bread control nor in the bread fortified. In the study of the stability of refined flour it was verified the iron content of 1.0 mg/100g in the sample controls and 4.41 to 5.84 mg/100 g in the fortified samples. The FS was the compound that most changed the quality parameters of refined flour. The FSmicro and FFmicro had negative effect on the quality of refined flour taking in account the hexanal parameter. In the whole-wheat flours, the iron content was 1.38 mg/100 g in the sample controls and from 4.80 to 6.29 mg/100 g in the fortified flours. The FS and FFmicro had the

highest PV values in 30 days of storage when compared to the sample controls, however, the flour fortified with FS (30 days) and FSmicro (90 days) were the ones that showed the highest hexanal values. The RI and NaFeEDTA were the ones that less changed the quality parameters of the refined and whole-wheat flours that were evaluated. Therefore, the different iron compounds, when used in fortification of refined and whole-wheat flours, can influence differently in the stability of the product during storage. It was concluded that, depending on the iron compound used in the fortification of refined and whole-wheat flour, the bioaccessibility of the mineral will be different, which indicates that the impacts of the mandatory flour fortification is directly related to the iron compounds used. Moreover, the absorption of the zinc that is naturally present in bread also relates to the type of iron used. During the storage of fortified flour and the sample control, it was observed the pro-oxidant effect of the iron on the product stability.

SUMÁRIO	
RESUMO.....	8
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL	15
CAPÍTULO 1	18
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1. Bioacessibilidade de ferro em alimentos e efeitos na absorção de outros minerais.....	19
2. Farinha de trigo refinada e integral e produção de pão tipo francês.....	26
3. Ferro e efeitos na qualidade e/ou estabilidade de alimentos.....	28
CAPÍTULO 2:	31
MINERAL BIOACCESSIBILITY IN FRENCH BREADS FORTIFIED WITH DIFFERENT IRON COMPOUNDS AND ITS EFFECTS ON RHEOLOGICAL AND TECHNOLOGICAL PARAMETERS.....	31
ABSTRACT	33
1. INTRODUCTION	34
2. MATERIAL AND METHODS	35
2.1 Material	35
2.2 Methods	36
2.3 Characterization of the wheat flour	36
2.4 Technological quality of breads.....	36
2.5 Bioaccessibility and minerals contents in breads	37
2.6 Statistical Analysis	38
3. RESULTS AND DISCUSSION	38
3.1 Characterization of wheat flour	38
3.2 Technological quality of breads.....	41
3.3 Bioaccessibility of Fe, Ca, and Zn in breads	42
3.4 Contribution of minerals (Fe, Zn, and Ca) in the Recommended Daily Intake (RDI) for breads.....	48
4. CONCLUSIONS	49
CAPÍTULO 3:	50

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES COMPOSTOS DE FERRO NOS PARÂMETROS REOLÓGICOS, TECNOLÓGICOS E BIOACESSIBILIDADE DE MINERIAIS EM PÃES INTEGRAIS.....	50
RESUMO.....	52
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 Farinha de trigo integral	55
2.2 Caracterização da farinha de trigo	56
2.3 Caracterização da qualidade dos pães integrais	57
2.4 Determinação das frações de <i>mi</i> oinositol fosfato.....	57
2.5 Bioacessibilidade de minerais em pão integral tipo francês.....	57
2.6 Análise dos dados.....	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1 Caracterização da farinha de trigo integral	58
3.2 Caracterização reológica	60
3.3 Caracterização da qualidade tecnológica dos pães integrais tipo francês	64
3.4 Determinação das frações de <i>mi</i> oinositol fosfato.....	65
3.5 Bioacessibilidade de minerais em pão tipo francês	66
4. CONCLUSÃO	73
CAPÍTULO 4:	74
EFEITOS DA FORTIFICAÇÃO COM DIFERENTES COMPOSTOS DE FERRO NA ESTABILIDADE DA FARINHA DE TRIGO REFINADA.....	74
RESUMO.....	76
1. INTRODUÇÃO.....	77
2. MATERIAIS E MÉTODOS	79
2.1 Farinha de trigo refinada.....	79
2.2 Métodos	80
2.3 Extração dos compostos voláteis da farinha.....	80
2.4 Análise cromatográfica.....	81
2.5 Análise dos dados.....	82

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4. CONCLUSÃO	94
CAPÍTULO 5	95
FORTIFICAÇÃO DE FARINHA DE TRIGO INTEGRAL COM DIFERENTES COMPOSTOS DE FERRO: EFEITOS NA ESTABILIDADE DURANTE A ESTOCAGEM.	95
RESUMO.....	97
1. INTRODUÇÃO.....	98
2. MATERIAIS E MÉTODOS	100
2.1 Preparo das amostras e delineamento experimental	100
2.2 Análises físico-químicas.....	101
2.3 Análises dos dados.....	103
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
4. CONCLUSÃO	113
DISCUSSÃO GERAL	114
CONCLUSÃO GERAL	125
REFERÊNCIAS.....	127
APÊNDICES.....	139
APÊNDICE A.....	140
APÊNDICE B.....	141
APÊNDICE C.	142
APÊNDICE D	143
APÊNDICE E.....	144
APÊNDICE F.....	145
APÊNDICE G	146
APÊNDICE H	147

INTRODUÇÃO GERAL

Os cereais fazem parte da alimentação humana desde a antiguidade e, dentre eles, o trigo principalmente na forma de farinha, é amplamente utilizado para a produção de uma variedade de produtos como pães, bolos, biscoitos e etc. Além das farinhas de trigo refinadas, as integrais (com adição de farelo de trigo e de grão inteiro) também têm sido empregadas para a elaboração do mesmo fim (Brasil, 2005b). O principal apelo para o uso dessas farinhas é a presença de compostos funcionais que proporcionam maior teor de fibras, antioxidantes, vitaminas, minerais e estão diretamente relacionados a diversos benefícios à saúde humana (Fonseca Filho et al., 2009; Schmiele et al., 2012).

Atualmente toda farinha de trigo comercializada no Brasil, assim como em outros países, deve ser fortificada com ferro com o intuito de reduzir a prevalência de anemia ferropriva, causada pela baixa ingestão de ferro biodisponível proveniente da dieta alimentar (Brasil, 2002; WHO, 2006). A deficiência deste mineral é considerada um problema de saúde pública e aproximadamente 25% da população apresenta carência deste mineral (WHO, 2006). Além disso, a ingestão de minerais essenciais como, zinco e cálcio, também são considerados importantes, pois estão relacionados ao funcionamento do organismo e apresentam funções vitais (Cozzolino, 2012).

O sucesso dos programas de fortificação requer o conhecimento dos compostos utilizados e sua bioacessibilidade/biodisponibilidade para os seres humanos (Akhtar et al., 2011). Estudos mais detalhados sobre a bioacessibilidade dos compostos permitidos devem ser realizados, pois, a eficiência do processo de fortificação continua sendo um grande desafio. Problemas decorrentes a esta prática que incluem a baixa biodisponibilidade do composto empregado; competição do ferro com outros minerais; estabilidade do micronutriente; alterações reológicas, sensoriais e organolépticas no produto final, além do efeito do ferro sobre a oxidação lipídica (Akhtar et al., 2011).

Segundo a Legislação Brasileira, a adição de ferro em alimentos, inclusive farinha de trigo, pode ser realizada com sulfato ferroso, fumarato ferroso, ferro reduzido, ferro eletrolítico, sódio ferro etilenodiaminotetracético (NaFeEDTA), ferro bisglicina quelato e outros compostos de biodisponibilidade não inferior à dos permitidos (Brasil, 2002). Outros compostos de ferro, como o pirofosfato férrico e

sulfato ferroso microencapsulado, estão sendo utilizados como fonte de fortificação (Kiskini et al., 2010; Nabeshima et al., 2005).

Embora a fortificação de alimentos com ferro esteja sendo realizada no Brasil e em diversos outros países, nem sempre se verifica correlação positiva com a diminuição da anemia ferropriva na população (Assunção et al., 2007; Vellozo & Fisberg, 2010). Estas observações podem estar relacionadas à bioacessibilidade do mineral utilizado, interações com outros componentes do próprio alimento e de outros alimentos ingeridos ao mesmo tempo. Todos esses parâmetros estão diretamente relacionados à bioacessibilidade dos minerais. Além disso, estudos sobre a absorção de minerais já realizados mostram que um elemento pode interferir na absorção do outro, já que competem pelo mesmo sítio ativo, como ferro e zinco. Existem evidências que apontam a ocorrência de interação nos sítios de absorção ou pós-absorção, ocasionada pela competição dos mecanismos semelhantes de transporte, devido à similaridade química entre os compostos inorgânicos (Solomons, 1986; Antunes, 2010).

Assim como a farinha de trigo refinada, as integrais, também são fortificadas com ferro, e à reincorporação de farelo de trigo na sua composição pode alterar os teores de nutrientes, como, minerais, fibras e fitato. O ácido fítico ou mioinositol-hexafosfato (IP6) é a principal fonte de armazenamento de fósforo nas plantas e fosfato inositol em sementes. O fitato tem uma forte capacidade de formar complexos com íons metálicos polivalentes, especialmente o ferro, cálcio e zinco. Esta ligação pode resultar em sais insolúveis com fraca biodisponibilidade destes minerais (Sanz-Penella, 2012). Estudos realizados demonstram que, dos ésteres presentes nos alimentos, somente o mioinositol-pentafosfato (IP5) e o IP6 apresentam efeito negativo na absorção dos minerais, e os demais possuem baixa capacidade de complexar-se, formando complexos mais solúveis (Silva e Silva, 1999; Valdés, 2010).

Dados sobre os efeitos da fortificação de farinhas refinadas e integrais com diferentes compostos de ferro e sua influência na qualidade e/ou estabilidade durante 120 dias de estocagem são reduzidos. A farinha de trigo apresenta em sua composição carboidratos, água, proteínas, lipídios, cinzas, além de vitaminas e minerais. A fração lipídica (1 a 2%) apresenta cerca de 51% de lipídeos não polares ou neutros e 49% de lipídios polares e a sua estabilidade pode ser afetada pela composição de ácidos graxos (palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1c),

linoléico (C18:2), linolênico (C18:3) e eicosenoico (C20:1) (Cramer et al., 2005; Morita et al., 2002; Pomeranz, 1988). Variações na quantidade e composição dos constituintes, tanto da farinha de trigo refinada como da integral podem ocorrer em função da genética das cultivares, além das diferentes quantidades de farelo e/ou gérmen que podem ser reincorporados a farinha de trigo refinada (Gutkoski et al., 2008; Morita et al., 2002; Rutz, 2012). Além disso, as farinhas integrais por apresentar maior teor de lipídios em sua composição, podem ser mais susceptíveis à oxidação.

Portanto, com o intuito de avaliar a qualidade de farinhas e pães produzidos com diferentes compostos de ferro, faz-se necessário realizar o estudo da estabilidade durante a estocagem e características reológicas das farinhas; avaliar a qualidade tecnológica de pães produzidos com farinhas refinadas e integrais, adicionados de diferentes compostos de ferro e a bioacessibilidade de minerais em pães. Ademais, para a avaliação do alcance do objetivo do programa de fortificação de farinhas sobre a anemia ferropriva faz-se necessário estimar a bioacessibilidade dos compostos permitidos ou possíveis de serem utilizados em produtos como pão tipo francês. Neste contexto, verificar os efeitos da adição de ferro sob a possibilidade de absorção de outros minerais com elevada importância nutricional, como cálcio e zinco, também se faz necessário. Os dados proporcionarão uma estimativa da absorção dos diferentes compostos de ferro, de zinco e de cálcio no organismo humano, contribuindo assim para a obtenção de dados que possibilitem uma visão geral sob os efeitos da campanha de fortificação de farinha de trigo no Brasil, além de se obter dados em relação à qualidade e ou estabilidade destas farinhas.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Bioacessibilidade de ferro em alimentos e efeitos na absorção de outros minerais.

O ferro é essencial para a maioria dos organismos vivos, participa de uma grande variedade de processos metabólicos, que incluem o transporte de oxigênio, a síntese de DNA, e o transporte de elétrons (Lieu et al., 2001). Além disso, atua como cofator enzimático que atuam no funcionamento do sistema imunológico, como a ribonucleotídeo redutase, envolvida na síntese de DNA, mieloperoxidase que atua na eliminação de bactérias por neutrófilos, entre outras (Oppenheimer, 2001; Wintergerst et al., 2007). Portanto, o ferro é um micronutriente essencial para o organismo humano e deve estar presente entre 35 e 45 mg/kg de peso corporal para mulheres e homens, respectivamente (Lieu et al., 2001). Desse valor, aproximadamente 50% estão presentes na hemoglobina, 25% armazenado no fígado e o restante está na forma de mioglobina e outras proteínas (Nadadur et al., 2008).

Os efeitos adversos resultantes da carência de ferro se devem à sua função no transporte de oxigênio e como consequência, a síntese de proteínas, funções de receptores e outros processos metabólicos aeróbicos são prejudicados (Beard, 2001). A deficiência deste mineral é definida segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006) como o estado no qual o indivíduo apresenta níveis de hemoglobina no sangue abaixo do normal, impossibilitando a manutenção das funções fisiológicas dos tecidos, como sangue, cérebro e músculos, e este quadro é conhecido como anemia. As anemias podem ser causadas por deficiência de vários nutrientes como ferro, zinco, vitamina B₁₂ e ácido fólico. A anemia causada por deficiência de ferro é denominada de anemia ferropriva e estima-se que 90% das anemias sejam causadas pela deficiência deste mineral (WHO, 2006).

A carência de ferro no organismo gera consequências graves para a saúde humana e desenvolvimento infantil. Estudos relataram que gestantes anêmicas apresentam alto risco de morte durante o período pré-natal, ocorrência de parto prematuro e a criança pode apresentar baixo peso ao nascer; na infância, a criança pode apresentar dificuldade no desenvolvimento psicomotor e cognitivo, diminuição na capacidade de aprendizagem e baixa imunidade; em adultos, a anemia pode estar envolvida com a redução da capacidade de trabalho, além de sintomas como sonolência, fraqueza e tontura (Cozzolino, 2012; Queiroz & Torres, 2000).

O ferro está presente em vários alimentos, tanto de origem animal (carnes, leite e ovos) como de origem vegetal (verduras escuras, feijão, soja, entre outros). Entretanto, não está esclarecida a capacidade do organismo em aproveitar o mineral proveniente da dieta para exercer suas diversas funções, ou seja, é importante avaliar sua biodisponibilidade. Estima-se que, em média, de 1 a 7% do ferro ingerido na dieta brasileira esteja biodisponível (Queiroz & Torres, 2000). Apesar da presença de elevadas concentrações em diversos alimentos, ocorre a deficiência do ferro e acredita-se que 25% da população mundial apresenta quadro de anemia ferropriva. Segundo a WHO, em 2007 foram contabilizados 2 bilhões de anêmicos no mundo, sendo a maioria por deficiência de ferro. Portanto, a fortificação de alimentos com ferro tem sido a estratégia escolhida para melhorar o estado nutricional da população (WHO, 2006) e adotada em muitos países para alcançar as metas de controle para este nutriente.

A eficiência dos programas de fortificação é dependente do veículo empregado, pois este deve abranger a maior parte da população possível. No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Resolução da RDC 344, de 13 de dezembro de 2002 (Brasil, 2002), determinou que a partir de junho de 2004 se tornasse obrigatório o enriquecimento de farinhas de trigo e milho com ácido fólico (150 µg/100g) e ferro (4,2 mg/100g). A finalidade era de reduzir o risco de malformações congênitas e anemia, respectivamente, já que essas farinhas são largamente consumidas pela população brasileira (Brasil, 2002).

Os cereais fazem parte da alimentação humana desde a antiguidade e, dentre eles, o trigo principalmente na forma de farinha, é amplamente utilizado para a produção de uma variedade de produtos como pães, bolos, biscoitos etc. Além de farinhas de trigo refinadas, farinhas integrais (com farelo de trigo e farinha de grão inteiro) também têm sido empregadas para a elaboração de pães. O principal apelo para o uso dessas farinhas é a presença de compostos funcionais que proporcionam maior teor de fibras, antioxidantes, vitaminas, minerais e estão diretamente relacionados a diversos benefícios à saúde humana (Fonseca Filho et al., 2009; Schmiele et al., 2012).

Minerais, como zinco e cálcio, também são considerados importantes para o funcionamento adequado do organismo humano, pois se relacionam a funções vitais, como: enzimática, estrutural e reguladora, e ainda, o cálcio está envolvido na formação e manutenção do esqueleto e dentes (Cozzolino, 2012).

Estudos sobre a absorção de minerais já realizados mostram que um elemento pode interferir na absorção do outro, já que competem pelo mesmo sítio ativo (Antunes, 2010).

Segundo a Legislação Brasileira, a adição de ferro a alimentos, inclusive em farinhas de trigo e milho, pode ser realizada com a utilização de sulfato ferroso desidratado (seco), fumarato ferroso, ferro reduzido, ferro eletrolítico, sódio ferro etilenodiaminotetracético (NaFeEDTA), ferro bisglicina quelato e outros compostos de biodisponibilidade não inferior à dos compostos permitidos (Brasil, 2002). Outros compostos de ferro, como o pirofosfato férrico e sulfato ferroso microencapsulado, estão sendo utilizados como fonte de fortificação em outros países (Kiskini et al., 2010; Nabeshima et al., 2005).

No Brasil, a Embrapa publicou em 2001 um manual para a fortificação de farinhas de trigo com ferro com base nas características dos compostos de ferro disponíveis para a fortificação. Foram recomendados os compostos de ferro como: sulfato ferroso, fumarato ferroso, ferro elementar e NaFeEDTA. Para farinha destinada à panificação recomenda-se o sulfato ferroso, já para farinha doméstica, massa fresca e bolos, o ferro eletrolítico é o mais recomendado, devido ao tempo de armazenamento. O sulfato ferroso não é recomendado para o uso em farinhas domésticas, misturas prontas e farinha integral. Porém, informações oficiais sobre quais compostos de ferro utilizados para fortificação não estão disponíveis e não há conhecimento sobre o cumprimento ou não das recomendações desse manual, uma vez que a legislação RDC 344 permite o uso de diferentes compostos de ferro sem especificar a finalidade de uso em farinha.

Trabalhos científicos têm sugerido várias compostos de ferro disponíveis para a fortificação de alimentos, porém, estudos ainda precisam ser realizados a fim de esclarecer a biodisponibilidade deste mineral quando empregado como fonte de fortificação. Dependendo da forma em que é utilizado, bem como da presença ou ausência de promotores de absorção, este nutriente pode comprometer a qualidade dos alimentos, além de ter diferente potencial para absorção no organismo humano.

O sucesso dos programas de fortificação requer conhecimento dos compostos utilizados e a acessibilidade/biodisponibilidade para os seres humanos (Akhtar et al., 2011). Estudos mais aprofundados sobre a bioacessibilidade dos compostos permitidos precisam ser realizados, para esclarecimento sobre a biodisponibilidade dos compostos empregados; competição do ferro com outros

minerais; estabilidade do micronutriente; alterações sensoriais e organolépticas no produto final, além do efeito do ferro sobre a oxidação lipídica (Akhtar et al., 2011).

O termo biodisponibilidade refere-se à fração de um composto ou nutriente bioativo presente em um determinado alimento que se encontra disponível para ser usado em funções fisiológicas ou ser armazenado no organismo (Benito & Miller, 1998; Fernandez-Garcia et al., 2009). Já a bioacessibilidade tem sido definida como a fração de um composto que é liberado do alimento no trato gastrointestinal e, assim, torna-se disponível para a absorção intestinal. A bioacessibilidade inclui toda a sequência de eventos que ocorre durante a transformação digestiva dos alimentos e indica a fração do nutriente disponível que poderá ser assimilada pelo organismo (Benito & Miller, 1998; Fernandez-Garcia et al., 2009). O estabelecimento da bioacessibilidade de um nutriente pode ser considerada uma estimativa de sua biodisponibilidade.

Métodos *in vitro* vêm sendo estudados e propostos. O método de diálise *in vitro* é baseado na simulação da digestão gastrointestinal do alimento, seguida da determinação da quantidade do elemento de interesse que atravessa uma membrana semipermeável simulando a parede intestinal (Benito & Miller, 1998; Cámara et al., 2005a; Kiskini et al., 2007; Miller et al., 1981). Vários trabalhos publicados utilizaram como base de partida a metodologia de Miller et al. (1981). Neste estudo, os autores estimaram a biodisponibilidade de ferro em diversos tipos de refeições empregando o modelo de digestão *in vitro*. O método consistiu da utilização de uma alíquota de refeição (pH 2,0), acrescido de solução de pepsina, seguido da incubação a 37 °C/2h. Após este período, uma alíquota do digerido foi titulada a fim de conhecer o volume de NaHCO₃ que preenche a membrana de diálise. Nas outras duas alíquotas foram adicionadas as membranas de diálise e incubadas a 37 °C/30min (pH 5,0) e então foram adicionadas de 5 mL de solução de pancreatina e extrato de bile. Os extratos foram incubados por mais 2h a 37 °C. Após este período, as membranas foram lavadas com água e o conteúdo dialisado foi pesado e analisado. Modificações da metodologia foram feitas por Kapsokefalou & Miller (1991) que propuseram a utilização de menor quantidade de amostra, menor quantidade de pepsina, diferente proporção de pancreatina e extrato de bile, além do uso de tampão PIPES dentro da membrana de diálise em substituição à solução de NaHCO₃. Kiskini et al. (2007) avaliaram as características sensoriais e a dialisabilidade de ferro em pães sem glúten fortificados com diferentes compostos de

ferro. O modelo de digestão empregado foi o proposto por Kapsokefalou & Miller (1991). Os autores verificaram que os pães sem glúten fortificados com pirofosfato férrico com emulsificantes, NaFeEDTA, bis-glicinato ferroso, gluconato ferroso e sulfato ferroso foram os que apresentaram maiores teores de ferro dialisável, enquanto que os fortificados com ferro eletrolítico, lactato ferroso e pirofosfato férrico apresentaram os menores valores.

A bioacessibilidade *in vitro*, como estimativa da fração mineral liberada, também pode ser estimada com o emprego de ensaio de solubilidade. Nesta técnica, também ocorre simulação gastrointestinal, porém, somente a fração solúvel do mineral presente no alimento é avaliada (Cámara et al., 2005a; Sahuquillo et al., 2003). Sahuquillo et al. (2003) estimaram a bioacessibilidade de Ca, Fe e Zn em três tipos de legumes e também a influência do tamanho da partícula da amostra, empregando o modelo de digestão *in vitro* pelo método de solubilidade. As metodologias incluíram diferentes massas de amostras e utilizou-se água para a solubilização dos alimentos. Em seguida, adicionou-se pepsina, e posteriormente, adicionou-se a mistura de extrato de bile e pancreatina. A temperatura e o tempo da digestão gástrica e intestinal foram de 37 °C/2h para cada fase, o pH inicial foi ajustado para 2,0; após a digestão gástrica, o pH foi corrigido para 5,0 com NaHCO₃ 1M e, após o término da digestão intestinal, o pH 7,2 foi ajustado com NaOH. Em 2005, Cámara et al., fizeram avaliação da bioacessibilidade de minerais utilizando o método de solubilidade proposto por Sahuquillo et al. (2003), onde pequenas modificações foram realizadas em relação a massa de amostra e volume das soluções de enzimas.

Cámara et al. (2005a) avaliaram a bioacessibilidade de minerais (Ca, Fe, Zn e Cu) em refeições escolares e compararam os métodos *in vitro* de diálise e solubilidade. Os autores verificaram que não houve uma correlação significativa entre os métodos, ou seja, o mineral com maior valor para o ensaio de solubilidade não foi o que apresentou a maior porcentagem de diálise. Argyri et al. (2009) realizaram um estudo para estimar concentrações de ferro biodisponível em alimentos empregando a digestão *in vitro*. O processo de diálise foi realizado empregando uma placa com seis poços, com um “insert” onde foi inserido um anel para prender a membrana de diálise. Este estudo teve como objetivo, melhorar a eficiência do método e avaliar o emprego de volumes menores, tanto de amostras, como de reagentes. Vários volumes de solução, alimentos líquidos e sólidos foram

testados. Ao final, os resultados foram comparados com a metodologia tradicional de Miller et al. (1981) e os autores verificaram que a porcentagem de ferro dialisado em ambas as técnicas apresentaram resultados semelhantes.

Além disso, para a estimativa da biodisponibilidade ensaios *in vitro* estão sendo realizados com o emprego de células Caco-2. As células Caco-2 são linhagens de células do carcinoma de cólon humano que sofre diferenciação espontânea e formam uma monocamada de células epiteliais polarizadas com características do enterócito humano. O emprego das células Caco-2 tem se mostrado aplicável há alguns anos em estudos de absorção e transporte intestinal de ferro (Glahn et al., 1996). Nesta técnica, os alimentos são submetidos à simulação da digestão péptica seguida da digestão intestinal, na presença das células Caco-2. Além de estimar a solubilidade e absorção, este modelo também fornece uma estimativa do transporte do composto de interesse (Perales et al., 2006). O emprego das células Caco-2 associada ao processo de digestão apresenta um grande avanço, quando comparado ao uso apenas da digestão *in vitro*, pois permite verificar a absorção do nutriente após a digestão do alimento, em pH semelhantes àsquelas encontradas ao longo da superfície de absorção do trato intestinal. Mahler et al. (2009) compararam a biodisponibilidade do ferro empregando métodos de digestão *in vitro* associados a culturas de células Caco-2 e verificaram boa correlação com valores obtidos em estudo com humanos. Hur et al. (2011) também verificaram que resultados em ensaios *in vivo* (humanos) com *in vitro* (células Caco-2) apresentaram resultados concordantes.

A simulação *in vitro* (solubilidade e/ou diálise) não representa a complexidade do processo digestivo humano, mas estes métodos *in vitro*, com ou sem modificações químicas, têm sido amplamente utilizados com o intuito de fornecer informações preliminares sobre a estimativa da disponibilidade de nutrientes presentes nos alimentos, devido à correlação positiva com modelos *in vivo* (Haro-Vicente et al., 2006; Hur et al., 2011).

Na deficiência de ferro no organismo foi constatado que ocorre aumento da absorção de metais com mesma valência, como cobalto (Co), níquel (Ni), manganês (Mn), zinco (Zn) e cádmio (Cd), significando que o ferro e tais metais podem compartilhar o mesmo sistema de absorção. Porém, com exceção do Zn, há pouca evidência de que tal competição seja importante nutricionalmente em relação aos micronutrientes no ser humano (Cozzolino, 2012). O mecanismo de interação

que pode ocorrer na absorção de ferro e zinco não está totalmente esclarecido. No entanto, existem evidências que apontam a ocorrência de interação nos sítios de absorção ou pós-absorção, por causa da competição pelos mecanismos semelhantes de transporte, devido à similaridade química entre eles (Antunes, 2010). Estudos sobre o efeito dos diferentes compostos de ferro na bioacessibilidade de outros minerais como, Zn e Ca em pães e outros alimentos não foram encontrados na literatura.

Gautam et al. (2011) estudaram a influência da combinação de compostos promotores (“*amchur*”, cenoura e cebola) e inibidores (ácido fítico e tanino exógenos) sobre a biodisponibilidade de ferro e zinco em sorgo e trigo. Verificaram que a bioacessibilidade de ferro e zinco sob o efeito dos promotores nos grãos foi geralmente superior quando comparado com os efeitos causados pela presença de inibidores.

Dentre os compostos considerados inibidores no processo de absorção de ferro e outros minerais, o ácido fítico apresenta destaque. Os grãos integrais contêm quantidades significativas desse composto. O ácido fítico ou mioinositol-hexafosfato (IP6) é a principal fonte de armazenamento de fósforo nas plantas e fosfato inositol em sementes. O fitato tem uma forte capacidade de formar complexos com íons metálicos polivalentes, especialmente o ferro, cálcio e zinco. Esta ligação pode resultar em sais insolúveis com reduzida biodisponibilidade destes minerais (Sanz-Penella et al., 2012). Estudos realizados demonstraram que das frações de mioinositol fosfatos (IP6, IP5, IP4, IP3 e IP2) presentes nos alimentos, somente o IP5 e o IP6 apresentam efeito negativo sobre a absorção dos minerais, as demais frações apresentam baixa capacidade de ligar aos minerais ou os complexos formados são mais solúveis (Silva & Silva, 1999; Valdés et al., 2011)

Brune et al. (1992) elaboraram 5 tipos de pães com diferentes proporções de fibras e empregaram diferentes formas de fermentação. Eles verificaram que o efeito inibitório sobre a absorção de ferro se aplica mais pelo conteúdo de fitato e de fosfato inositol presentes após o processo de fermentação do que pelo conteúdo de fibra alimentar. Sanz-Penella et al. (2012) avaliaram o efeito do fitato em relação à absorção de ferro a partir da elaboração de pão de trigo suplementado com farinha de amaranto, empregando a técnica de digestão *in vitro* associado a culturas de células Caco-2. Os autores verificaram que as formulações com 20% de farinha de

amaranto apresentaram respostas promissoras como estratégia para melhorar o valor nutricional dos pães, devido ao maior teor de ferro biodisponível.

Zhu et al. (2009) compararam a biodisponibilidade de ferro utilizando pirofosfato férrico solúvel com os compostos comuns (FeSO_4 , NaFeEDTA e bisglicinato ferroso), empregando o método de digestão *in vitro* associada à cultura de células Caco-2. Os pesquisadores utilizaram a ferritina como marcador da absorção de ferro e observaram que o pirofosfato férrico solúvel apresentou maior biodisponibilidade quando comparado aos demais compostos de ferro avaliados.

Além da preocupação com a biodisponibilidade/bioacessibilidade dos diferentes compostos de ferro empregados na fortificação de alimentos, a adição desse mineral é um desafio, tanto do ponto de vista nutricional como tecnológico. Os compostos de ferro solúveis em água embora sejam considerados os mais biodisponíveis, podem promover o desenvolvimento indesejável de cor, sabor e aroma, além de contribuir para o desenvolvimento da oxidação de lipídeos nos alimentos. Já os compostos insolúveis são pouco reativos e não acarretam o desenvolvimento de alterações indesejáveis, porém apresentam baixa biodisponibilidade em seres humanos (Hurrell, 2002; Hurrell et al., 2004).

O sulfato ferroso, muito empregado na fortificação de alimentos, incluindo farinhas, pode promover a formação de radicais hidroxilas que são os responsáveis por iniciar o processo de peroxidação de lipídeos em membranas biológicas, inativação de enzimas e danos à estrutura do DNA (Mendes et al., 2008; Schumann et al., 2007), além disso, pode provocar efeitos colaterais no sistema gastrointestinal (Mimura et al., 2008). Alguns pesquisadores sugerem a substituição do sulfato ferroso pelo mesmo composto, porém microencapsulado, pois este apresenta a vantagem de proteger o alimento de alterações organolépticas indesejáveis e prevenir o desenvolvimento de oxidação de lipídeos, além de apresentar biodisponibilidade similar ao composto sem o processo de microencapsulação (Cocato et al., 2007; Gotelli et al., 1996; Lysionek et al., 2002)

2. Farinha de trigo refinada e integral e produção de pão tipo francês.

O trigo é amplamente utilizado após o processo de refino. Durante este processo ocorre a separação da farinha refinada da fração composta por gérmen e farelo, que contém a maior parte dos nutrientes presentes no grão, como: vitaminas, aminoácidos, antioxidantes, minerais (ferro, zinco, cálcio, magnésio, fósforo,

potássio), além de elevado teor de fibras (Buri et al., 2004). Devido à presença destes nutrientes, atualmente é crescente a demanda por produtos integrais pelos benefícios que proporcionam a saúde. No Brasil, o pão tipo francês é o mais consumido entre todos os pães, e a incorporação de farelo com ou sem gérmen neste produto, tem sido realizada com aceitação pela população (Brasil, 2005b).

A World Health Organization (WHO) considera saudável o consumo de 60 kg de pães ao ano. No entanto, dados da Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria (ABIP, 2012) afirmam que o consumo de pães no Brasil é de apenas 34,09 kg ao ano, por pessoa. De acordo com o Instituto Tecnológico da Panificação e Confeitaria, 86% do consumo (30,5 kg) correspondem aos pães artesanais, dos quais 58% (aproximadamente 17,7 kg) são do pão tipo francês, e apenas 14% (aproximadamente 4,6 kg) são de pães industrializados.

A qualidade das farinhas pode ser avaliada por parâmetros farinográficos que verifica o comportamento da massa durante a etapa de mistura e por parâmetros extensográficos que mede o comportamento da massa durante as etapas de descanso e fermentação nos tempos de 45, 90 e 135 min, entre outros, e a qualidade tecnológica dos pães, através da avaliação do volume específico, salto de forno, pestana, formato, etc.

As propriedades reológicas da farinha de trigo podem fornecer informações do comportamento de manipulação da massa durante o processamento. Os resultados podem servir como um indicativo tecnológico de qualidade do produto final e alterações nestes parâmetros não são desejáveis (Sollars & Rubenthaler, 1975). De acordo com Nabeshima et al. (2005) ao avaliarem os parâmetros reológicos de farinha e tecnológicos de pão de forma fortificado com diferentes compostos de ferro (ferro reduzido, pirofosfato de ferro e sulfato ferroso microencapsulado) verificaram que os parâmetros farinográficos e extensográficos foram afetados quando sulfato ferroso microencapsulado foi utilizado como fortificante na farinha de trigo. Akhtar et al. (2009) fortificaram farinha de trigo integral com ferro elementar, NaFeEDTA, sulfato de zinco e óxido de zinco e avaliaram a influência destes compostos na reologia da massa de farinha durante o período de 60 dias de estocagem. Os autores verificaram que ocorreu maior absorção de água nas farinhas fortificadas e o composto NaFeEDTA apresentou menor efeito na reologia da farinha do que o ferro elementar. Gupta et al. (2012) também verificaram alterações reológicas na massa de trigo quando fumarato ferroso foi utilizado como

fortificante. Já Sudha & Leelavathi (2008) não verificaram alterações tanto na reologia quanto na qualidade de panificação da farinha de trigo, mesmo após o armazenamento, quando sulfato ferroso, FeEDTA e fumarato ferroso foram utilizados.

Nabeshima et al. (2005) compararam as características tecnológicas e sensoriais de pães tipo forma, fortificados com 3 diferentes fontes de ferro (ferro reduzido, pirofosfato de ferro e sulfato ferroso microencapsulado) e verificaram que a adição de sulfato ferroso microencapsulado alterou as propriedades farinográficas e extensográficas da farinha de trigo em relação a amostra padrão. Em relação às características sensoriais, verificaram que as amostras de pães contendo compostos de ferro não diferiram da amostra controle.

Em 2010, Kiskini e colaboradores avaliaram as características químicas e sensoriais de pães elaborados com farinha de trigo e farinha sem glúten, fortificados com cinco diferentes compostos de ferro (pirofosfato férrico, pirofosfato férrico com emulsificantes, NaFeEDTA, sulfato ferroso microencapsulado e ferro reduzido) e verificaram que as características de qualidade (volume específico, textura da crosta e miolo) dos pães foram mais dependentes do tipo do que da solubilidade do ferro utilizado. Em relação às características sensoriais, os pães elaborados com trigo fortificado NaFeEDTA apresentaram os atributos avaliados mais afetados quando comparados a amostra controle.

3. Ferro e efeitos na qualidade e/ou estabilidade de alimentos.

A adição de ferro em produtos alimentícios, além de poder alterar as propriedades sensoriais, pode contribuir para a ocorrência de reações indesejáveis. Esse processo pode promover alterações nos alimentos durante o processamento, distribuição e armazenamento, influenciando sua qualidade e vida de prateleira (Hurrell et al., 2004). A qualidade nutricional pode ser diminuída pela perda de vitaminas, ácidos graxos e aminoácidos essenciais, enquanto vários compostos de degradação, associados à oxidação de lipídeos, podem ser capazes de reagir com biomoléculas como proteínas, diminuindo sua absorção (Ferrari, 1998).

O processo de oxidação lipídica é dividido em etapas e a primeira é o período de indução, onde ocorre a formação dos radicais livres sob condições favoráveis como luz, calor e presença de oxigênio; a etapa seguinte é a propagação, onde o índice de peróxido cresce até atingir um máximo, e a velocidade de

decomposição dos peróxidos se iguala à sua velocidade de formação. O final do processo se dá com a terminação, onde a decomposição dos peróxidos ocorre seguida da polimerização das moléculas. Os produtos finais da oxidação lipídica compreendem os derivados da decomposição de hidroperóxidos, como alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos (Araújo, 2004; Fernández et al., 1997; Ferrari, 1998). A oxidação lipídica é considerada um fator limitante na qualidade do alimento, podendo ser acelerada pela presença de metais de transição, como o ferro (Araújo, 2004).

Vários são os métodos empregados para a avaliação da estabilidade oxidativa em alimentos, porém nenhum método indica perfeitamente as modificações químicas e organolépticas produzidas no decurso das reações de oxidação. Cada método fornece informações sobre um estado particular do processo oxidativo, variável em função das condições aplicadas e dos substratos lipídicos empregados (Silva et al., 1999). Determinações realizadas empregando métodos colorimétricos, iodométrico, oxigênio ativo, entre outros são utilizados para análise de produtos primários de oxidação, com o estabelecimento do índice de peróxido (IP), que deve ser determinado no primeiro estado do processo oxidativo (Silva et al., 1999). No processo de decomposição de peróxidos, compostos de natureza diversa são produzidos, como aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, polímeros, hidroxí-ácidos, os quais são considerados compostos secundários e muitos destes compostos de degradação possuem um odor desagradável. Para a quantificação destes compostos métodos colorimétricos podem ser empregados além de métodos cromatográficos.

Su-Chuen et al. (2007) avaliaram a estabilidade à oxidação lipídica em quinoa sob condições de envelhecimento acelerado e os compostos usados como indicadores da oxidação lipídica foram: ácidos graxos livres, dienohidroperóxidos conjugados e hexanal. Eles verificaram que durante os 30 dias estudados os lipídeos presentes na quinoa não apresentaram alterações significativas. Mendes et al. (2008) verificaram que a estabilidade oxidativa de leites em pó fortificados com ferro, expressa pelo índice do ácido tiobarbitúrico (TBA), foi influenciada pela adição do mineral. Os pesquisadores verificaram também que o ferro aminoácido quelato ocasionou menor oxidação de lipídeos, quando comparado ao sulfato ferroso.

Jensen et al. (2011) avaliaram a estabilidade oxidativa de pão de trigo integral durante cinco semanas, embalado em condições de atmosfera modificada,

através da técnica de espectroscopia de ressonância de spin eletrônico, pela detecção de radicais livres e avaliação do valor de peróxido. Os autores verificaram que a oxidação durante a estocagem afetou tanto a casca quanto o miolo dos pães.

No Brasil, a fortificação de farinhas com ferro tem sido realizada desde 2002. Existem vários compostos de ferro permitidos para a adição, cujas características físico-químicas e bioacessibilidade provavelmente são diferentes. Dados sobre os efeitos da fortificação das farinhas com ferro e a oxidação de lipídios não estão disponíveis em publicações científicas. Portanto, com o intuito de avaliar a qualidade de farinhas e pães produzidos com diferentes compostos de ferro, faz-se necessário realizar o estudo da influência dos diferentes compostos de ferro na estabilidade oxidativa e características reológicas das farinhas; na qualidade tecnológica de pães e na bioacessibilidade de minerais em pães. Além disso, com base na importância nutricional das farinhas de trigo integrais, pretende-se produzir pães com farinhas integrais adicionadas de diferentes compostos de ferro e avaliá-los. Estas farinhas possuem maior teor de lipídeos, sendo mais susceptíveis à oxidação, assim como maior teor de fibras, podendo influenciar a bioacessibilidade do ferro. Ademais, os teores totais, solúveis e dialisáveis de zinco e cálcio, naturalmente presente nos pães tipo francês, foram determinados. Os dados obtidos poderão proporcionar uma estimativa da absorção dos diferentes compostos de ferro, zinco e cálcio no organismo humano, contribuindo assim para a obtenção de dados para a campanha de fortificação de farinha de trigo no Brasil, além de se obter dados em relação à qualidade e ou estabilidade destas farinhas.

CAPÍTULO 2:

MINERAL BIOACCESSIBILITY IN FRENCH BREADS FORTIFIED WITH DIFFERENT IRON COMPOUNDS AND ITS EFFECTS ON RHEOLOGICAL AND TECHNOLOGICAL PARAMETERS.

CAPÍTULO 2: MINERAL BIOACCESSIBILITY IN FRENCH BREADS FORTIFIED WITH DIFFERENT IRON COMPOUNDS AND ITS EFFECTS ON RHEOLOGICAL AND TECHNOLOGICAL PARAMETERS.

Ana Paula Rebellato¹, Jéssica de Castro Lima¹, Joyce Grazielle Siqueira Silva¹, Caroline Joy Steel², Juliana Azevedo Lima Pallone¹.

¹Department of Food Science, School of Food Engineering, University of Campinas. Monteiro Lobato Street, 80, Zip Code: 13083-862, Campinas, São Paulo, Brazil.

²Department of Food Technology, Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Zip Code: 13083-862, Campinas, São Paulo, Brazil.

Este artigo foi submetido ao *Journal of Cereal Science* (JCS 16-198).

ABSTRACT

The present study investigated the effect of different forms of Fe used in the fortification of wheat flour on the rheological characteristics of flour and technological quality of French breads and the bioaccessibility of added Fe, Zn and Ca naturally occurring by *in vitro* assay. The results demonstrated that the wheat flour was suitable for use in bakery products; however, the farinograph and extensograph parameters were affected by different forms of Fe, which also changed the technological quality of breads, with no negative impacts on bread making. The NaFeEDTA and microencapsulated ferrous sulfate proved to be the most effective's forms of iron, due to its higher dialyzed Fe content. Zinc bioaccessibility is not high, thus the NaFeEDTA contributed positively for the absorption of this mineral. In contrast, a high bioaccessibility of calcium was observed, which was not affected by the majority forms of iron. Additionally, Fe, Ca and Zn naturally occurring also presented high bioaccessibility. Thus, French bread made with flour fortified with iron can contribute to demand and supply of minerals, and the form of Fe used can affect not only Fe bioaccessibility, but also Zn, leading to changes in the rheological properties of wheat flour and technological quality.

Key words: wheat flour, quality, *in vitro* methods, minerals.

1. INTRODUCTION

In Brazil, as in many other countries, fortification of wheat flour and corn flour with iron has been carried out since 2002, to reduce iron deficiency anemia, considered a public health problem due to consumption of a habitual diet low in bioavailable iron (Brasil, 2002; WHO, 2006). Furthermore, the intake of essential minerals such as zinc and calcium is also important, as these minerals are related to the functioning of the body and the deficiency of these can lead to several physiological-pathological conditions of a serious nature (Akhter et al., 2012). Studies on the absorption of minerals have shown that an element can interfere with the absorption of other, competing for the same active sites (Perales et al., 2006). The addition of iron to foods is authorized by the Brazilian legislation, including wheat flour, and the compounds include dehydrated ferrous sulphate (dried), ferrous fumarate, reduced iron, electrolytic iron, NaFeEDTA, ferrous glycinate chelate, among others (Brasil, 2002). Other forms of iron such as ferric pyrophosphate (Kiskini et al., 2007) and microencapsulated ferrous sulfate (Nabeshima et al., 2005) have also been used as iron source for food fortification in other countries.

Some parameters should be considered in fortification with iron for not compromising the quality of the final product as cost (depending on the technology used), rheological properties, and the absorption in the human body (Akhtar et al., 2011; WHO, 2006). The rheological properties of dough, among other parameters, indicate the quality of flour used for bread making, and changes in these properties should not occur after fortification (Akhtar et al., 2011). However, Nabeshima et al. (2005) studied the technological of pan bread fortified with different forms of iron and found that the farinograph and extensograph parameters were affected by microencapsulated ferrous sulfate used in wheat flour fortification. Akhtar et al. (2009) investigated the effects of whole wheat flour fortification with iron on the rheological properties of dough during 60 days of storage. The authors observed greater water absorption in the fortified flour, and the rheological parameters of flour were less affected by NaFeEDTA when compared to elemental iron.

Although flour fortification with Fe is a common practice in Brazil and other countries, there is no positive correlation with the reduction of anemia in the population (Hurrell et al., 2010). Various authors have studied the bioaccessibility of iron compounds and other minerals, aimed to find more effective compounds in the fortification process. It is noteworthy that some forms of iron such as ferrous sulfate,

iron fumarate, NaFeEDTA, and microencapsulated ferrous sulfate are indicated for fortification of cereals, since they are better absorbed by human body (Akhtar et al., 2011). Some researchers have suggested the replacement of ferrous sulfate for its microencapsulated form, with the advantage of protecting food against undesirable organoleptic changes and lipid oxidation (Cocato et al., 2007). *In vitro* assays have been performed to estimate the bioaccessibility of these compounds (Argyri et al., 2009; Cámara et al., 2005a; Kiskini et al., 2007; Perales et al., 2006) in addition to studies on Caco-2 cells (Perales et al., 2006).

A comprehensive study on the effect of the addition of different forms of iron to wheat flour on the rheological properties of dough and quality parameters of French bread, and the bioaccessibility of iron, zinc, and calcium have not been found in literature. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of different forms of iron on both the rheological properties of fortified flour and technological quality of breads. In addition, the bioaccessibility of different forms of iron used in fortification, zinc and calcium naturally occurring contents in soluble and dialyzed fractions were also investigated.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Material

Refined wheat flour, 100 kg, (Moinho Guaçu Mirim, Mogi Guaçu, Brazil), was fractionated in portions of 10 kg, and fortified with $4.2 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ($\pm 20\%$), according to Normative Resolution 344 (BRASIL, 2002), with different forms of iron, totaling 6 samples and the control (without iron addition). The iron sources were: iron sulfate monohydrate (SF), ferrous fumarate (FF), reduced iron (Fe R), (M Cassab, Brazil); sodium iron ethylenediaminetetraacetic acid (NaFeEDTA - Ferrazone) (Vogler Ingredientes, SP, Brazil); microencapsulated ferrous sulfate (SF micro) and microencapsulated ferrous fumarate (FF micro), (Functional Mikron, Valinhos, Brazil). For the fortification process, the sample was homogenized in V-blender (Tecnal Piracicaba, Brazil) for 30 minutes in portions of 5 kg. The resulting flours were characterized for composition, rheological properties and iron content.

Breads were made by the modified straight dough method. The dry ingredients (100% wheat flour, 1.5% instant dry yeast, 1.8% salt, and 2.5% enhancer) and water were mixed in HAE 10 dough mixer (Hyppolito, Ferraz de

Vasconcelos, Brazil) at slow speed for 4 minutes, and at high speed until development of the gluten network. Dough was divided in portions of 65 ± 1 g, rounded and allowed to rest for 15 min. After this period, the portions were molded in modeling machine HM2 Hp 0.5 (Hyppolito, Vasconcellos Ferraz, Brazil) and fermented in fermentation chamber 20B (Super Freezer, Poços de Caldas, Brazil), for 60-70 min at 27 - 30 °C and relative humidity of 85-90%. A cut was made on the surface of dough to form eyelash, and then the samples were baked in heart oven HF 4B (Haas, Curitiba, Brazil), with ceiling and ballast temperatures of 170 °C and 180 °C, respectively, for 16 ± 3 minutes. After 30 min of cooling, the quality of breads was evaluated. Ten units of each bread was ground, packed, and stored in the freezer (- 20 °C) for analysis.

2.2 Methods

2.3 Characterization of the wheat flour

The proximate composition of the control flour was determined as follows: moisture, protein, lipids and ash were determined according to the AACC (2010) methods 44-15.02, 46-13.01, 30-25.01, and 08-01.01, respectively. Total carbohydrates were calculated by difference. Total dietary fiber was determined by AOAC (2000) method 985.29. Gluten index (GI) and gluten content (wet and dry) were determined in Glutomatic equipment (Perten Instruments, Hagersten, Sweden) by AACC (2010) method 38-12.02. Iron contents were determined as reported by Rebellato et al. (2015). All analyses were performed in triplicate.

The wheat flour fortified with different forms of iron, and the control sample were subjected to farinograph analysis, and water absorption (WA), arrival time (AT), dough development time (DDT), stability (EST) and mixing tolerance index (MTI), according to the AACC (2010) method 54-21.01, using farinograph Brabender (Duisburg, Germany), model 827505. The extensograph properties were evaluated for resistance to extension (R), maximum resistance to extension (R_m), extensibility (E) and a ratio number ($D = R/E$), in the Brabender equipment (Duisburg, Germany), model 860703, according to the AACC (2010) method 54-10.01, in triplicate.

2.4 Technological quality of breads

French bread samples (control and fortified) were evaluated for the following parameters: specific volume (VE), 10-05.01 by the AACC (2010); shape, assessed by width and height measurements of the loaves, according to Bodroza-Solarov et al. (2008); oven spring, according to Shittu et al. (2008); cut opening and cut height, according to Almeida & Chang (2012), in four replicates.

2.5 Bioaccessibility and minerals contents in breads

Amount of Fe, Zn, and Ca were determined in French breads by Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS), according to Rebellato et al. (2015), in triplicate. For Zn and Ca determinations, the method was validated based on the parameters precision, recovery, sensitivity, linearity, limit of detection, and limit of quantification. In the calcium determination an amount of lanthanum oxide sufficient to obtain a final content of 0.5% was added to eliminate phosphate interferences.

Precision was accepted and expressed as average coefficient of variation of $\pm 10\%$. Recovery was performed by adding the analytes (Zn and Ca) to the bread samples (without fortification), at 50 and 100%. Percent recovery close to 100% was considered satisfactory. Sensitivity was expressed by the slope of the linear regression equation. Linearity was assessed by the correlation coefficient of the calibration curve and the residual plot was considered satisfactory for $r \geq 0.995$. The limits of detection and quantification were calculated based on the calibration curve, and expressed as $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ sample.

The control and the sample containing different forms of iron were also subjected to solubility tests according to Cámara et al. (2005a), with modifications as described by Rebellato et al. (2015). The volume of enzyme solution used in the digestive trial was adjusted to 6.0 mL (0.4 g of pancreatin from porcine pancreas P-7545 and 2.5 g of bile from B-8631 bovine and ovine, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA, in 100 mL NaHCO_3 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

The dialysis test was performed according to Perales et al. (2006), with modifications as described by Rebellato et al. (2015). For the digestive trial, 30 mL of PIPES buffer, 0.30 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (piperazine-N, N0-bis [2-ethanesulfonic acid] disodium salt), adjusted to pH 6.3 with concentrated HCl was used in membrane dialysis (dialysis bag: molecular weight cut-off from 12,000 to 16,000 and porosity of 25 Å, Inlab, São Paulo, Brazil) rather than NaHCO_3 solution, as reported by Argyri et al.

(2009). The volume of the enzyme solution (bile and pancreatin solution) was also changed to 6 mL, as described in the solubility test.

Soluble and dialyzed Fe, Ca, and Zn were determined in the fractions by FAAS, as described by Rebellato et al. (2015), in four repetitions.

2.6 Statistical Analysis

The results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ($p < 0.05$) for the comparison of means using the Statistica 7.0 software (StatSoft, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Characterization of wheat flour

The flour can be considered type 1, as established by Normative Instruction 8 of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (BRASIL, 2005b), as it exhibited less than 15% moisture, less than 0.8% ash, and more than 7.5% protein. In relation to gluten, flour of this study is suitable for the manufacture of French bread, with gluten index (GI) greater than 90 (Pizzinatto, 1997), and adequate levels of dry and wet gluten.

The iron content in wheat flour (control) was $1.01 \pm 0.03 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. After fortification of wheat flour with different forms of iron, iron contents ranged from 4.41 ± 0.07 to $5.84 \pm 0.12 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. These values are in accordance with the Normative Resolution 344 (BRASIL, 2002). Frontela et al. (2011) also found iron content of $4.59 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ in fortified commercial flour used for bread making.

The farinograph and extensograph parameters of the control flour and flour fortified with different forms of iron are shown in Tables 1 and 2, respectively.

With respect to the farinograph parameters, higher water absorption (WA) values were observed in wheat flour fortified with ferrous sulfate, ferrous fumarate, and reduced iron when compared to the control sample, indicating that the types of iron influenced this parameter. Regarding the arrival time (AT), no significant differences were observed between the control and the samples fortified with different forms of iron (0.96 min). Nogueira (2015) found AT of 1.47 min in refined wheat flour, while Schmiele et al. (2012) found TC values of 1.5 min.

Table 1. Farinograph parameters of wheat flour fortified with different forms of iron

WF	WA (%)	AT (min)	DDT (min)	EST (min)	MTI (FU)
Control	54.43 ± 0.06 d	0.90 ± 0.09 a	15.22 ± 0.20 c	32.72 ± 1.81 b	23.33 ± 1.53 a
SF	55.23 ± 0.21 a	0.98 ± 0.02 a	15.21 ± 0.19 c	35.64 ± 3.07 a,b	24.00 ± 1.00 a
FF	54.97 ± 0.06 a,b,c	1.00 ± 0.04 a	16.38 ± 0.05 b,c	38.89 ± 0.42 a	21.00 ± 1.00 a
Fe R	55.03 ± 0.15 a,b	0.95 ± 0.04 a	18.24 ± 0.25 a	37.38 ± 0.60 a,b	16.67 ± 1.53 b
NaFeEDTA	54.73 ± 0.25 b,c,d	0.97 ± 0.03 a	16.77 ± 0.53 b	34.62 ± 2.16 a,b	24.00 ± 2.00 a
SF micro	54.53 ± 0.23 c,d	0.99 ± 0.02 a	16.53 ± 1.08 b,c	35.81 ± 3.26 a,b	11.00 ± 1.00 c
FF micro	54.40 ± 0.17 d	0.95 ± 0.04 a	16.65 ± 0.36 b	37.46 ± 0.08 a,b	12.00 ± 1.00 c

Mean ± standard deviation. WF: wheat flour. AA: water absorption; AT: arrival time; DDT: dough development time; EST: stability; MTI: mixing tolerance index; FU: farinographic units. SF: ferrous sulfate; FF: ferrous fumarate; Fe R: reduced iron; NaFeEDTA: sodium iron ethylenediaminetetraacetic acid; SF micro: microencapsulated ferrous sulfate; FF micro: microencapsulated ferrous fumarate. Averages with different letters in the same column indicate significant difference among samples ($p < 0.05$).

Dough development time (DDT) was influenced by the reduced iron, NaFeEDTA, and FF micro. Schmiele et al. (2012) studied wheat flour with 12.5% protein, and found DDT of 10,1 min, while Nogueira (2015) found values of 11.4 min in wheat flour with 15.46% protein. In general, flours with lower protein contents require less time to form the gluten network, since hydration enhances gluten development (Schmiele et al., 2012). Stability (EST) ranged from 32.72 to 38.89 min for the control and flour fortified with ferrous fumarate, respectively. The samples fortified with microencapsulated iron (sulphate and fumarate) showed the lowest values of mixing tolerance index (MTI), with values of 11 and 12 FU, respectively. Nabeshima et al. (2005) found higher IMT (30 FU) in wheat flour fortified with microencapsulated ferrous sulfate monohydrate when compared to the non-fortified flour. According to the authors, the increase in farinograph property can be due to the polysaccharide used in microencapsulation. In general, strong flour used in bread making improves the quality of breads, with WA >58%, DDT 4-8 min, EST 8-15 min, and MTI 15-50 FU (Pizzinatto, 1997).

Regarding the extensograph parameters, significant differences ($p < 0.05$) were observed in resistance to extension of the control sample when compared with the samples fortified with NaFeEDTA and SF micro (45 min). At 90 min, the control sample was significant different from the samples containing SF, FF, NaFeEDTA, and SF micro; at 135 min, a significant difference ($p < 0.05$) was observed only between the control and the sample fortified with FF. For maximum resistance to extension (R_m), the samples fortified with different forms of iron were not significant different ($p > 0.05$) when compared to the control in the periods studied.

Table 2. Extensographic parameters of wheat flour fortified with different forms of iron

Parameter	WF	Time		
		45 min	90 min	135 min
Resistance to extension, R (EU)	Control	572.00 ± 28.2 c	849.00 ± 40.30 d	925.67 ± 44.90 b
	SF	576.33 ± 9.02 c	1004.33 ± 64.42 a,b,c	1024.00 ± 82.29 a,b
	FF	640.67 ± 3.06 a,b,c	1108.67 ± 21.36 a	1189.00 ± 103.16 a
	Fe R	581.00 ± 18.33 b,c	918.00 ± 78.08 c,d	1047.33 ± 40.07 a,b
	NaFeEDTA	677.33 ± 37.23a	1088.33 ± 81.57 a,b	1123.00 ± 72.92 a,b
	SF micro	662.00 ± 56.72 a,b	1002.67 ± 46.26 a,b,c	1107.00 ± 111.75 a,b
	FF micro	562.67 ± 9.71 c	943.67 ± 8.14 b,c,d	1002.67 ± 68.89 a,b
Maximum resistance to extension, Rm (UE)	Control	832.80 ± 40.5 a,b	1111.57 ± 14.70 a,b	1142.53 ± 110.30 a,b
	SF	751.93 ± 21.28 a,b	1116.83 ± 92.91 a,b	1039.83 ± 87.97 b
	FF	837.60 ± 43.77 a,b	1284.77 ± 35.80 a	1321.70 ± 105.85 a
	Fe R	833.77 ± 26.51 a,b	1194.00 ± 44.00 a	1199.37 ± 100.68 a,b
	NaFeEDTA	832.50 ± 30.06 a,b	1141.07 ± 117.70 a,b	1162.17 ± 95.76 a,b
	SF micro	853.23 ± 82.43 a	1151.53 ± 30.65 a,b	1051.20 ± 1.11 b
	FF micro	725.00 ± 6.56 b	1005.47 ± 25.14 b	1029.20 ± 71.43 b
Extensibility, E (mm)	Control	140.47 ± 8.80 a	118.87 ± 3.60 a	111.07 ± 3.50 a
	SF	121.20 ± 3.29 c	99.47 ± 2.57 b,c	79.37 ± 1.76 c
	FF	123.83 ± 2.83 b,c	98.07 ± 3.76 b,c	82.93 ± 4.85 c
	Fe R	135.43 ± 6.17 a,b	107.53 ± 8.74 a,b	99.70 ± 9.40 a,b
	NaFeEDTA	111.80 ± 4.72 c	84.33 ± 3.21 d	79.57 ± 3.55 c
	SF micro	116.50 ± 1.40 c	100.20 ± 3.05 b,c	81.50 ± 3.58 c
	FF micro	119.67 ± 1.15 c	93.57 ± 1.07 c,d	85.77 ± 7.15 b,c
Ratio number, D (EU/mm)	Control	4.09 ± 0.4 d	7.15 ± 0.60 d	8.33 ± 0.30 d
	SF	4.76 ± 0.19 c,d	10.27 ± 0.41 b,c	12.89 ± 0.77 a,b
	FF	5.17 ± 0.10 b,c	11.32 ± 0.56 a,b	13.18 ± 0.53 a,b
	Fe R	4.30 ± 0.28 d	9.07 ± 0.51 c	10.55 ± 0.77 c
	NaFeEDTA	6.06 ± 0.09 a	12.00 ± 1.10 a	14.10 ± 0.46 a
	SF micro	5.67 ± 0.42 a,b	10.02 ± 0.70 b,c	12.70 ± 0.40 a,b
	FF micro	4.70 ± 0.10 c,d	10.09 ± 0.20 b,c	11.74 ± 1.09 b,c

Mean ± standard deviation. R: resistance to extension; Rm: maximum resistance to extension; E: extensibility; D: ratio number (R / E); EU: extensographic units. WF: wheat flour. SF: ferrous sulfate; FF: ferrous fumarate; Fe R: reduced iron; NaFeEDTA: sodium iron ethylenediaminetetraacetic acid; SF micro: microencapsulated ferrous sulfate; FF micro: microencapsulated ferrous fumarate. Averages with different letters in the same column indicate significant difference among samples ($p < 0.05$).

The control sample showed the highest extensibility values (mm) at 45, 90, and 135 min, and did not differ ($p > 0.05$) from the sample fortified with reduced iron. In relation to the proportional number (D) at 45 min, similar results were observed for the control sample ($p < 0.05$) when compared to the samples fortified with reduced iron, SF, and FF micro; at 90 and 135 min, the control sample showed the lowest D values and was significant different from the wheat flours fortified with

all forms of iron. According to Pizzinatto (1997), wheat flour can be classified in relation to extensograph parameters and is considered strong when presenting R, Rm and D values higher than 560 EU, 840 EU, and 3.6 EU/mm, respectively, and E value lower than 155 mm.

3.2 Technological quality of breads

French breads were characterized for specific volume (SV); shape by measuring the width and height of the loaves, oven spring, cut opening and cut height, and the results are shown in Table 3.

Table 3. Quality parameters of the French breads

WF	SV (cm ³ ·g ⁻¹)	Height (cm)	Width (cm)	Shape	Oven spring (cm)	Cut opening (cm)	Cut height (cm)
Control	4.85 ± 0.11 b	5.81 ± 0.19 b	7.25 ± 0.15 b	0.8 ± 0.02 b	1.99 ± 0.15 b,c	1.88 ± 0.06 a,b	0.71 ± 0.02 a
	4.8 ± 0.16 b	5.79 ± 0.15 b	6.67 ± 0.16 b,c	0.87 ± 0.04 a,b	1.70 ± 0.16 c,d	1.45 ± 0.11 c,d	0.3 ± 0.07 b
SF	4.70 ± 0.07 b	6.00 ± 0.19 b	6.56 ± 0.19 c	0.91 ± 0.03 a	2.09 ± 0.08 b,c	2.13 ± 0.22 a	0.65 ± 0.14 a
	5.01 ± 0.10 b	7.50 ± 0.15 a	8.71 ± 0.21 a	0.86 ± 0.01 a,b	3.45 ± 0.16 a	1.65 ± 0.11 b,c	0.68 ± 0.08 a
Fe R	5.67 ± 0.24 a	5.89 ± 0.13 b	7.05 ± 0.42 b,c	0.84 ± 0.06 a,b	1.66 ± 0.11 c,d	1.83 ± 0.17 a,b,c	0.64 ± 0.12 a
	5.04 ± 0.22 b	5.87 ± 0.22 b	6.73 ± 0.15 b,c	0.87 ± 0.03 a,b	1.48 ± 0.16 d	1.84 ± 0.13 a,b	0.63 ± 0.17 a
SF micro	5.93 ± 0.42 a	6.15 ± 0.27 b	6.97 ± 0.51 b,c	0.88 ± 0.04 a	2.20 ± 0.23 b	1.13 ± 0.09 d	0.26 ± 0.05 b
FF micro							

Mean ± standard deviation (n = 4). SV: specific volume; WF: wheat flour. SF: ferrous sulfate; FF: ferrous fumarate; Fe R: reduced iron; NaFeEDTA: sodium iron ethylenediaminetetraacetic acid; SF micro: microencapsulated ferrous sulfate; FF micro: microencapsulated ferrous fumarate. Averages with different letters in the same column indicate significant difference among samples (p<0,05).

Significant differences (p<0.05) were observed for the specific volume (SV) of the control sample (4.85 cm³·g⁻¹) when compared to the samples fortified bread with NaFeEDTA and FF micro, which had higher values of 5.67 and 5.93 (cm³·g⁻¹), respectively. Nabeshima et al. (2005) studied bread samples (without the addition of iron and fortified with three different forms of iron), and found specific volumes ranging from 3.03 to 3.54 cm³·g⁻¹, with no significant difference from the control. Almeida & Chang (2012) also assessed the SV of frozen pre-baked French breads and found values from 4.11 to 2.98 cm³·g⁻¹.

Regarding the bread shape, measured by the height/width ratio, it was found that the bread fortified with reduced iron had the highest height value (7.5 cm) with significant difference from the other breads, with width ranging from 6.56 to 8.71 cm. The control sample differed ($p < 0.05$) only from the samples fortified with FF and reduced iron, with values ranging from 0.8 to 0.91, while breads fortified with FF and FF micro were significantly different from all samples. Nogueira (2015) studied the use of sour dough for sodium reduction in French bread and found values of 0.72 for the control sample (commercial flour). According to Bodroza-Solarov et al. (2008), French bread may have regular shape when the height/width ratio is equal to 0.5; and spherical shape when at ratio > 0.5 , while smaller values indicate a flat shape.

About the parameter oven spring, the control sample exhibited 1.99 cm, and was significantly different ($p < 0.05$) only from breads fortified with SF micro and reduced iron, with values of 1.48 and 3.40 cm, respectively. Nogueira (2015) found a value of 1.43 cm for this parameter, while Almeida & Chang (2012) found values of 1.24 ± 0.24 cm.

With respect to the parameters cut opening and cut height, breads fortified with SF and FF micro had the lowest values, with significant differences ($p < 0.05$) when compared to other breads, including the control, with values of 1.88 cm and 0.71 cm, respectively. According to Almeida & Chang (2012) an ideal cut opening and cut height value for French bread may vary from 2.7 to 3.6 cm and 0.90 to 1.3 cm, respectively, and lower values characterize lack of these parameters

Overall, both the rheological parameters of wheat flour as the quality parameters of bread were changed by different forms of iron when compared to the control sample. However, from a technological point of view, all forms of iron used in the fortification were suitable for the manufacture of French breads. For wheat flour to be considered appropriate for bread making, it should have the ability to produce attractive and cost-competitive breads. In the absence of these characteristics, flour may also be supplemented with additives.

3.3 Bioaccessibility of Fe, Ca, and Zn in breads

For Zn and Ca determinations, the method was validated according to the validation guides, and the parameters linearity, sensitivity, precision, recovery, and limits of detection and quantification were evaluated.

Calibration curves were constructed for obtaining the linear range, and the concentrations ranged from 0.008 to 0.75 mg·L⁻¹ and 0.5 to 5.0 mg·L⁻¹ for Zn and Ca, respectively. The correlation coefficients of the calibration curves were considered adequate ($r > 0.9995$). Residual plots showed a normal distribution around zero. The sensitivity was considered adequate for the determination of both minerals in bread samples. The limits of detection and quantification were 0.005 and 0.02 mg·100 g⁻¹; and 0.4 and 1.5 mg·100 g⁻¹, for Zn and Ca, respectively. The coefficient of variation were 3.26% and 1.10% (<10%) for Zn and Ca, respectively. The intermediate precision was evaluated by analysis of variance (ANOVA), with 95% level of confidence, and the calculated F was lower than tabulated F (4.10) for Zn and Ca in the control sample. The recovery values ranged from 111 to 99.6% and 112 to 114% for Zn and Ca, respectively.

Fe, Zn, and Ca contents and the estimated bioaccessibility (solubility and dialysis) of both the control sample and samples fortified with different forms of iron are shown in Tables 4, 5 and 6, respectively.

The Fe content in the control was 1.54 mg·100 g⁻¹, while the fortified samples showed levels ranging from 4.33 to 5.44 mg·100 g⁻¹. Significant differences ($p < 0.05$) in Fe contents were observed only for the bread fortified with NaFeEDTA and SF micro when compared to the others. This difference may be due to the homogenization of the batch of fortified flour with iron and the portion used for bread making. Similar values were obtained by Nabeshima et al. (2005), who studied pan breads fortified with iron pyrophosphate, reduced iron, and microencapsulated ferrous sulfate, and found Fe contents of 4.37, 4.70, and 5.11 mg·100 g⁻¹, respectively. Yeung et al. (2005) studied the bioavailability (*in vitro* digestion / Caco-2 cells) of control bread (without fortification) and bread containing different forms of iron (reduced, H-reduced CO-reduced carbonyl and electrolytic), and found Fe contents of 0.9 mg·100 g⁻¹ and 5.8 to 6.16 mg·100 g⁻¹, respectively.

The soluble iron in bread (Table 4) varied from 0.77 to 2.58 mg·100 g⁻¹ for the control and bread fortified with FF, respectively. No significant difference ($p > 0.05$) was observed between the control and the sample fortified with SF micro. The breads fortified with FF and NaFeEDTA were not significantly different ($p > 0.05$), and presented the highest concentrations with values of 2.58 and 2.56 mg·100 g⁻¹, respectively.

Table 4. Total, soluble, and dialyzed iron.

Sample	total Fe (mg·100g ⁻¹)	soluble Fe (mg·100g ⁻¹)	Solubility (%)	Dialyzed Fe (mg·100g ⁻¹)	Dialysis (%)
Control	1.54 ± 0.04 d	0.77 ± 0.05 e	49.89	0.51 ± 0.05 d	33.06
SF	4.33 ± 0.01 c	1.63 ± 0.14 c	37.76	1.41 ± 0.04 c	32.55
FF	4.35 ± 0.07 c	2.58 ± 0.05 a	59.24	1.41 ± 0.08 c	32.41
Fe R	4.39 ± 0.06 c	2.05 ± 0.02 b	46.77	1.61 ± 0.08 c	36.67
NaFeEDTA	5.08 ± 0.07 b	2.56 ± 0.03 a	50.38	2.66 ± 0.06 a	52.43
SF micro	5.44 ± 0.14 a	0.91 ± 0.03 e	19.75	2.18 ± 0.14 b	40.11
FF micro	4.46 ± 0.27 c	1.21 ± 0.04 d	30.30	1.61 ± 0.14 c	36.20

Mean ± standard deviation (n = 4). Fe: iron. SF: ferrous sulfate; FF: ferrous fumarate; Fe R: reduced iron; NaFeEDTA: sodium iron ethylenediaminetetraacetic acid; SF micro: microencapsulated ferrous sulfate; FF micro: microencapsulated ferrous fumarate. Averages with different letters in the same column indicate significant difference among samples (p<0,05).

Rebellato et al. (2015) studied iron bioaccessibility in commercial cookie samples, and found total Fe ranging from 2.5 to 8.6 mg·100 g⁻¹, and solubility values from 1.2 to 4.3 mg·100 g⁻¹, which is consistent with data obtained in our study. The results are also in line with Vitali et al. (2011), who found iron content of 2.21 ± 0.11 mg·100 g⁻¹, and soluble iron of 1.11 ± 0.13 mg·100 g⁻¹ in biscuits containing wheat flour (control sample). However, biscuits fortified with different grains (soybeans, amaranth, carob) presented total and soluble iron contents ranging from 2.35 to 3.69 and 0.65 to 1.75 mg·100 g⁻¹, respectively. Shockravi et al. (2012) produced Iranian breads using non fortified wheat flour obtained by different extraction rates, and studied Fe bioaccessibility. The authors found total Fe contents of 3.76 mg·100 g⁻¹ and 1.75 mg·100 g⁻¹, and soluble Fe of 0.54 and 0.45 mg·100 g⁻¹ for Sangak and Barbari type breads, respectively.

Percentage solubility (%) was also calculated, with values ranging from 19.75 to 59.24% for breads with fortified micro SF and FF, respectively. The control showed high soluble iron content, when compared to other forms of iron, evidencing that the form of iron naturally present in wheat flour has good availability to be absorbed by the human body. Frontela et al. (2011) also studied bakery products (commercial flour) through solubility tests and dialysis (%) aimed to evaluate the content of iron and other minerals. The authors found percentage solubility and dialysis of 20.4% and 29.97% in white breads, respectively. In the same period, Khouzam et al. (2011) investigated Fe bioaccessibility in Lebanese products, and found that breads (commercial flour) had iron contents and solubility ranging from 4.1 to 4.7 mg·100 g⁻¹ and 11 to 12%, respectively.

With respect to dialysis, the control sample had 0.51 mg dialyzed iron·100 g⁻¹ of bread, while the other samples showed variations from 1.41 to 2.66 mg·100 g⁻¹. No significant differences were observed among the forms of iron SF, FF, Fe R, and FF micro ($p>0.05$), and NaFeEDTA was the one with the highest dialyzed iron content. Regarding the dialysis percentage, although the control sample was not fortified, it presented dialysis percentage similar to most fortified samples, again indicating that the form of naturally occurring iron in wheat flour presents good availability for absorption, and the form NaFeEDTA had the highest values (52.43%). It is noteworthy that the forms of microencapsulated iron (ferrous sulphate and fumarate) had dialysis percentage of 40.11 and 36.20%, respectively, which may be an important factor in the fortification process, because the microencapsulated compounds exhibit the advantage of not altering the organoleptic characteristics of the food, and have high bioavailability, without affecting the nutritional value of the vehicle used for fortification (Cocato et al., 2007).

Kiskini et al. (2007) studied the iron dialysis (%) of gluten-free breads fortified with different forms of iron (ferric pyrophosphate, ferric pyrophosphate with emulsifiers, NaFeEDTA, electrolytic iron, ferrous gluconate, ferrous lactate, and ferrous sulfate) and found that gluten-free breads fortified with ferric pyrophosphate with emulsifiers, NaFeEDTA, ferrous bisglycinate, ferrous gluconate and ferrous sulfate dialysis had higher levels than the gluten-free breads fortified with electrolytic iron, ferrous lactate and ferric pyrophosphate. Yeung et al. (2005) studied the use of various forms of elemental iron (reduced, H-reduced, CO-reduced carbonyl, and electrolytic iron) in bread samples by trials *in vitro* / Caco-2 cells. The authors found that the bioavailability of these forms of iron were comparable to breads fortified with ferrous sulfate, which is similar to the results of this study. The same authors reported that the form NaFeEDTA is more bioavailable than the elemental forms and ferrous sulphate used in the fortification of cereal flours, results similar than this study using dialysis. According to Hurrell et al. (2010), the main iron fortificants for use in wheat flour are NaFeEDTA, ferrous sulfate and ferrous fumarate, and NaFeEDTA is the best form of iron, once it is less affected by other components present in the food matrix, has lower sensory impacts, and does not promote lipid oxidation in wheat flour during storage.

Based on the results of this study, the compound NaFeEDTA had the highest dialysis percentage, being more bioaccessible for the absorption process in

the human body, the results are according Caco-2 cells study; however, the microencapsulated compounds have also proven to be a good alternative to the fortification process. Rizk & Clydesdale (1985) reported that selecting a suitable choice for iron fortification is a critical point, with the need of pH adjustment and/or use of appropriate agents to ensure iron solubilization and allow bioavailability. Also according to the author, the most reactive sources of iron and with potential bioavailability are converted into insoluble hydroxides when stored at pH of the cereal grains (approximately 6.0), become insoluble when pH is reduced to 2.0.

Zn and Ca contents and bioaccessibility were also evaluated in French breads fortified with different forms of iron, to estimate the absorption of these compounds. The average Zn content of French bread was $0.78 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$, with no significant differences ($p>0.05$) between the control and the other samples. The soluble Zn content and solubility ranged from 0.21 to $0.38 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$, and 27.56 to 49.13%, respectively. The control and the samples fortified with SF, FF, and FF micro showed no significant difference among them ($p>0.05$), while the samples fortified with reduced Fe and NaFeEDTA had the lowest Zn soluble contents, with 0.21 and $0.29 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$, respectively.

With respect to dialysis, the values ranged from 0.08 to $0.25 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ for the dialyzed Zn, corresponding to 10.66 to 32.17% dialysis. The control bread was not significantly different ($p>0.05$) from the samples fortified with reduced Fe and FF micro. The samples fortified with SF and SF micro had the lowest dialyzed Zn contents, while the samples fortified with NaFeEDTA exhibited the highest contents.

Table 5. Total, soluble and dialyzed zinc

Sample	Total Zn ($\text{mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	Soluble Zn ($\text{mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	Solubility (%)	Dialyzed Zn ($\text{mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	Dialysis(%)
Control	0.78 ± 0.02 a.b	0.38 ± 0.01 a	49.13	0.14 ± 0.01 c	17.91
SF	0.76 ± 0.01 b	0.36 ± 0.01 a.b	47.54	0.11 ± 0.01 d	14.12
FF	0.77 ± 0.01 b	0.37 ± 0.01 a.b	48.01	0.17 ± 0.02 b	22.56
Fe R	0.78 ± 0.01 a.b	0.21 ± 0.01 d	27.56	0.16 ± 0.02 b.c	20.27
NaFeEDTA	0.79 ± 0.02 a.b	0.29 ± 0.03 c	37.39	0.25 ± 0.01 a	32.17
SF micro	0.77 ± 0.02 b	0.34 ± 0.02 b	44.71	0.08 ± 0.01 d	10.66
FF micro	0.81 ± 0.02 a	0.35 ± 0.01 a.b	43.03	0.14 ± 0.01 c	17.11

Mean \pm standard deviation (n = 4). Zn: zinc. SF: ferrous sulfate; FF: ferrous fumarate; Fe R: reduced iron; NaFeEDTA: sodium iron ethylenediaminetetraacetic acid; SF micro: microencapsulated ferrous sulfate; FF micro: microencapsulated ferrous fumarate. Averages with different letters in the same column indicate significant difference among samples ($p<0,05$).

Zn contents of the samples of this study were lower than those observed by Khouzam et al. (2011) in studies evaluating the bioaccessibility of different minerals in food, including bread, who found values ranging from 2.4 to 3.4 mg·100 g⁻¹. However, our result is consistent with the Brazilian Food Composition Table (NEPA, 2011), which establishes Zn content of 0.8 mg·100 g⁻¹ in French bread. Regarding the percentage solubility, the values obtained by those authors were 5.9 to 9.5%, while higher values were observed in our study. Frontela et al. (2011) studied the minerals bioaccessibility in bakery products, and found 26.6% solubility, similar to that obtained in our study, and higher dialysis percentage (56.8%) in white bread sample.

These data demonstrate that the bioaccessibility of Zn naturally present in wheat flour can be influenced by different forms of Fe used in the fortification, and the form NaFeEDTA had the highest Zn dialysis percentage. In this context, this compound can be considered an alternative for flour fortification. It is noteworthy that the compound NaFeEDTA used in fortification exhibited both high Zn and Fe dialysis percentages.

Table 6. Total, soluble and dialyzed calcium

Sample	Total Ca (mg·100 g ⁻¹)	Soluble Ca (mg·100 g ⁻¹)	Solubility (%)	Dialyzed Ca (mg·100 g ⁻¹)	Dialysis (%)
Control	13.04 ± 0.70 a.b	9.30 ± 0.81 a	71.25	7.29 ± 0.75 a.b	55.85
SF	11.75 ± 0.25 c.d	8.51 ± 0.58 a.b	72.43	6.29 ± 0.24 a.b	53.48
FF	12.14 ± 0.52 b.c.d	8.49 ± 0.49 a.b	70.15	5.34 ± 0.49 b	44.01
Fe R	12.79 ± 0.40 a.b.c	7.86 ± 0.51 b	61.51	6.05 ± 0.53 a.b	47.24
NaFeEDTA	12.42 ± 0.14 b.c.d	7.75 ± 0.42 b	62.43	6.95 ± 0.22 a.b	55.92
SF micro	11.70 ± 0.57 d	6.02 ± 0.52 c	51.56	6.16 ± 0.43 a.b	52.63
FF micro	13.57 ± 0.46 a	5.85 ± 0.02 c	43.13	8.80 ± 0.26 a	64.85

Mean ± standard deviation (n = 4). Ca: calcium. SF: ferrous sulfate; FF: ferrous fumarate; Fe R: reduced iron; NaFeEDTA: sodium iron ethylenediaminetetraacetic acid; SF micro: microencapsulated ferrous sulfate; FF micro: microencapsulated ferrous fumarate. Averages with different letters in the same column indicate significant difference among samples (p < 0.05).

The Ca content in breads fortified with different forms of iron ranged from 11.70 to 13.57 mg·100 g⁻¹. The control was significantly different from the samples fortified with SF and SF micro, probably due to the homogenization of flour and the portion used in bread making, as mentioned above. Ca contents were lower than that reported by TACO (2006), 16 mg·100 g⁻¹ French bread.

Regarding the soluble Ca, significant differences ($p < 0.05$) were observed for the control when compared with the samples fortified with Fe R, NaFeEDTA, SF micro, and FF micro, with values ranging from 5.85 to 9.30 mg·100 g⁻¹. The control sample showed the highest soluble Ca content, ie, Ca naturally present in the food matrix has high availability to be absorbed by the human body.

Akhter et al. (2012) studied 12 Pakistan wheat varieties, and evaluated the bioaccessibility of essential minerals. For the element Ca, the authors found contents ranging from 25.1 to 53.5 mg·100 g⁻¹ and dialysis percentage from 17 to 19.5%. Ca contents observed in this study were lower than those reported by those authors, although the dialysis percentage was 3 times higher in our study than those found in Pakistan wheat. The dialyzed Ca varied from 5.34 to 8.80 mg·100 g⁻¹, which corresponds to 44.01% and 64.85%, with no significant differences ($p > 0.05$) between the control and the fortified samples. A significant difference was observed only between the sample fortified with ferrous fumarate and microencapsulated FF, which presented the highest dialyzed Ca content. Studies on the use of microencapsulated ferrous fumarate in wheat flour fortification have been not found in literature.

Although *in vitro* simulation (solubility and/or dialysis) does not represent the complexity of the human digestive process, these *in vitro* methods, with or without chemical modifications have been widely used to estimate the nutrient availability in food, as they have been correlated with *in vivo* models (Perales et al., 2006).

3.4 Contribution of minerals (Fe, Zn, and Ca) in the Recommended Daily Intake (RDI) for breads

French bread, also known as salt bread is the most consumed in Brazil. Approximately 63% of the population consume this product because it is a source of carbohydrates necessary in the diet, besides having good consumers' acceptance and accessibility (IBGE, POF 2008-2009). The consumption of French bread represents 46% of total consumption of bread, with *per capita* consumption of 53 g/day, as disclosed by the IBGE for the Household Budget Survey (IBGE, POF 2008-2009). Based on consumers' information, the contribution to the Recommended Daily Intake (RDI) for the minerals (Fe, Zn and Ca) (IBGE, POF 2008-2009) (Brasil, 2005a).

The RDI for iron, based on the different forms of iron in a French bread portion (53g/day) ranged from 5.83% to 17.70% for control and fortified samples, respectively.

Wheat flour fortification with iron contributed to the RDI for iron, once an increase in mineral ingestion from 3 times was observed after fortification when compared with the control. For the other minerals, the daily consumption of French bread (53 g) can contribute to RDI for Zn and Ca with 5.91% and 0.66%, respectively.

4. CONCLUSIONS

The results showed that the different forms of iron used in fortification of refined wheat flour for the manufacture of French bread affected both dough rheological properties and quality of bread, when compared to the control sample, with no impacts on bread making.

The iron content and the soluble and dialyzed fractions were determined in French breads, and the compound NaFeEDTA and SF microencapsulated proved to be the most effective's forms of iron, due to its higher dialyzed Fe content, thus contributing more effectively to meet body requirements. In addition, it had a positive impact on estimating Zn absorption in the dialysis procedure, ie, Zn naturally presents in bread is more bioaccessible. In contrast, with respect to Ca, the different forms of iron less affected the bioaccessibility of this mineral; however, breads made with flour fortified with microencapsulated FF had the highest Ca dialysis percentage when compared to the other forms of iron used in wheat flour fortification. Furthermore, Fe, Ca and Zn naturally occurring also presented high bioaccessibility.

The results have shown that wheat flour fortification with different forms of iron contributed in the RDI for French breads. An increase from 3 times in mineral ingestion was observed, when compared to the control sample. Moreover, it was possible to evaluate the contribution of Zn and Ca for the RDI when a portion of French bread fortified with different iron sources is consumed.

CAPÍTULO 3:

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES COMPOSTOS DE FERRO NOS PARÂMETROS REOLÓGICOS, TECNOLÓGICOS E BIOACESSIBILIDADE DE MINERIAIS EM PÃES INTEGRAIS.

CAPÍTULO 3: INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES COMPOSTOS DE FERRO NOS PARÂMETROS REOLÓGICOS, TECNOLÓGICOS E BIOACESSIBILIDADE DE MINERAIS EM PÃES INTEGRAIS.

Ana Paula Rebellato¹, Juliana Azevedo Lima Pallone¹.

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

RESUMO

O objetivo do estudo foi verificar a influência de diferentes compostos de ferro utilizados na fortificação de farinha de trigo integral, tanto nas características reológicas da massa, quanto na qualidade tecnológica dos pães; estimar a bioacessibilidade dos diferentes compostos de ferro nos pães pelo método *in vitro*, e avaliar o teor total e as frações, solúvel e dialisada de zinco e cálcio, naturalmente presentes, nos pães integrais tipo francês. Os diferentes compostos de ferro alteraram as propriedades reológicas da massa e a qualidade tecnológica dos pães, porém foi possível a elaboração de pão integral tipo francês fortificado com diferentes compostos de ferro. O NaFeEDTA (sódio ferro etilenodiaminotetracético) demonstrou ser a forma de ferro mais efetiva no processo de fortificação de farinha integral, devido aos maiores teores de solubilidade (44,80%) e diálise (46,14%). Por outro lado, o sulfato ferroso microencapsulado foi a forma do mineral que apresentou as menores porcentagens de solubilidade (5,40%) e diálise (33,12%). A diálise do zinco foi influenciada positivamente pelos compostos NaFeEDTA, sulfato ferroso microencapsulado e fumarato ferroso microencapsulado, enquanto que a diálise do cálcio foi influenciada positivamente pelo sulfato ferroso microencapsulado e negativamente pelo fumarato ferroso microencapsulado.

Key words: Farinha de trigo integral, pão francês, minerais, ensaio *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

O trigo é amplamente utilizado após o processo de refino. Durante este processo ocorre a separação da farinha refinada da fração composta por gérmen e farelo, que contém a maior parte dos nutrientes presentes no grão, como: vitaminas, aminoácidos, antioxidantes, minerais (ferro, zinco, cálcio, magnésio, fósforo, potássio), além de elevado teor de fibras (Buri et al., 2004). Devido à presença destes nutrientes, atualmente é crescente a demanda por produtos integrais pelos benefícios que proporcionam a saúde. No Brasil, o pão tipo francês é o mais consumido entre todos os pães, e a incorporação de farelo com ou sem gérmen neste produto, tem sido realizada com aceitação pela população (Brasil, 2005b).

A farinha de trigo contém minerais naturalmente presentes em sua composição, e tem sido empregada em programas de fortificação, com o intuito de melhorar a ingestão de nutrientes, principalmente o Fe, pois a deficiência deste mineral no organismo pode causar consequências graves (Brasil, 2002). Em crianças está relacionada à dificuldade no desenvolvimento psicomotor e cognitivo, diminuição na capacidade de aprendizagem e baixa imunidade. Em adultos pode estar envolvida com a diminuição da capacidade de trabalho, devido aos sintomas de fraqueza, sonolência, entre outros (Cozzolino, 2012). Atualmente, a anemia ferropriva é considerada um problema de saúde pública, pois aproximadamente 25% da população apresenta deficiência deste mineral (WHO, 2006). O Zn e o Ca também são considerados importantes para o bom funcionamento do organismo humano, pois são responsáveis pelo desenvolvimento do sistema imunológico, desenvolvimento sexual e cognitivo, crescimento, construção e manutenção de ossos e dentes, processo de absorção de minerais, entre outros (Cozzolino, 2012) e a deficiência destes está relacionada ao retardo no crescimento, hipogonadismo, diminuição do apetite e funções cognitivas, além de acarretar a perda de massa óssea (osteoporose) (Casé et al., 2005; Pereira & Hessel, 2009).

A fortificação de farinha de trigo e milho com ferro ocorre em muitos países e no Brasil é realizada desde 2002 (Brasil, 2002). A Legislação Brasileira permite a adição de diferentes compostos de ferro, como: sulfato ferroso desidratado (seco), fumarato ferroso, ferro reduzido, ferro eletrolítico, sódio ferro etilenodiaminotetracético (NaFeEDTA), ferro bisglicina quelato e outros compostos de biodisponibilidade não inferior à dos permitidos (Brasil, 2002). Outros compostos de ferro também estão sendo utilizadas como fonte de fortificação como o pirofosfato

férrico (Kiskini et al., 2010) e o sulfato ferroso microencapsulado (Nabeshima et al., 2005).

Existem estudos na literatura que relacionam o emprego de diferentes compostos de ferro com possíveis alterações que podem ocorrer no alimento, como por exemplo, propriedades sensoriais, propriedades tecnológicas (reologia da massa e produto final), diferença de biodisponibilidade, além do custo de cada composto de ferro, são fatores que devem ser levados em consideração no processo de fortificação (Akhtar et al., 2011; WHO, 2006).

As propriedades reológicas da farinha de trigo podem fornecer informações do comportamento de manipulação da massa durante o processamento, e também servir como um indicativo de qualidade do produto final, e alterações nestes parâmetros não são desejáveis (Sollars & Rubenthaler, 1975). Nabeshima et al. (2005), ao avaliarem os parâmetros tecnológicos e sensoriais de pão de forma fortificado com diferentes compostos de ferro (ferro reduzido, pirofosfato de ferro e sulfato ferroso microencapsulado), verificaram que os parâmetros farinográficos e extensográficos foram afetados quando sulfato ferroso microencapsulado foi utilizado como fortificante na farinha de trigo.

Akhtar et al. (2009) fortificaram farinha de trigo integral com ferro elementar, NaFeEDTA, sulfato de zinco e óxido de zinco e avaliaram a influência destes compostos na reologia da massa de farinha durante o período de 60 dias de estocagem. Os autores verificaram que ocorreu maior absorção de água nas farinhas fortificadas e o composto NaFeEDTA apresentou menor efeito na reologia da farinha do que o ferro elementar. Gupta et al. (2012) também verificaram alterações reológicas na massa de trigo quando fumarato ferroso foi utilizado como fortificante. Sudha & Leelavathi (2008) não verificaram alterações, tanto na reologia, quanto na qualidade de panificação da farinha de trigo, mesmo após o armazenamento, quando sulfato ferroso, FeEDTA e fumarato ferroso foram utilizados.

Os diferentes compostos de ferro também podem apresentar diferença de biodisponibilidade e bioacessibilidade. Vários autores têm estudado a disponibilidade de ferro e outros minerais como forma de conhecer quais compostos são mais efetivos no processo de fortificação, e ensaios *in vitro* (solubilidade e diálise) estão sendo empregados (Benito & Miller, 1998; Cámara et al., 2005a; Cámara et al., 2005b; Fernandez-Garcia et al., 2009; Kiskini et al., 2007; Miller et al., 1981; Perales

et al., 2006; Sahuquillo et al., 2003), entre outros. Além disso, na literatura existem estudos que relacionam uma menor absorção de minerais quando em presença de fatores antinutricionais, como o fitato (Schons et al., 2011). O ácido fítico, por estar presente em sementes e grão de cereais, principalmente no farelo do trigo, tem a capacidade de complexar com os minerais cátions (De Carli et al., 2006) como Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Ca^{2+} , formando a molécula fitato (Ries, 2010), e a ligação pode resultar em sais insolúveis com baixa bioacessibilidade de minerais (Carbonaro et al., 2001). Estudos demonstram que somente os ésteres de *mioinositol* IP5 e o IP6 possuem efeito negativo na absorção de minerais, sendo que os demais compostos apresentam baixa capacidade de complexar-se com os minerais, o que os tornam complexos mais solúveis (Silva & Silva, 1999; Valdés, 2010)

Estudos que relacionam o efeito dos diferentes compostos de ferro na fortificação de farinha de trigo integral, tanto nas características reológicas da massa, bem como nas propriedades de qualidade do pão integral tipo francês e bioacessibilidade de Fe, Zn e Ca, não foram encontrados. Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar a influência dos diferentes compostos de ferro utilizados na fortificação de farinha de trigo integral, tanto nas características reológicas da massa, quanto na qualidade tecnológica dos pães; estimar a bioacessibilidade dos diferentes compostos de ferro, Zn e Ca naturalmente presentes, pelo método *in vitro* (solubilidade e diálise) e ainda avaliar as frações dos ésteres de *mioinositol* (IP6, IP5, IP4, IP3 e IP2) nas amostras de pães.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Farinha de trigo integral

Para a obtenção da farinha de trigo integral (100 kg), 6% de farelo de trigo foi incorporado à farinha de trigo refinada (94%) (Moinho Guaçu Mirim, Mogi Guaçu, Brasil), e posteriormente porções de 10 kg foram fortificadas com 4,2 mg/100 g (\pm 20%), conforme Resolução Normativa, 344 (Brasil, 2002), dos diferentes compostos de ferro, totalizando 6 amostras e uma amostra controle (sem adição de ferro). Os compostos de ferro utilizados foram: sulfato ferroso monohidratado (SF), fumarato ferroso (FF), ferro reduzido (Nutrafine, RS, Brasil) (Fe R), (M Cassab, SP, Brasil); sódio ferro etilenodiaminotetracético (NaFeEDTA), (Vogler Ingredients, SP, Brasil); sulfato ferroso microencapsulado (SF micro) e fumarato ferroso microencapsulado

(FF micro) (Funcional Mikron, Valinhos, Brasil). No processo de fortificação, cada amostra foi homogeneizada em misturador em V (Tecnal, Piracicaba, Brasil), por 30 min, em porções de 5,0 kg. As amostras de farinha de trigo integral foram caracterizadas em relação a sua composição, reologia e teor de ferro, em triplicata.

Pães integrais tipo francês foram elaborados pelo método de massa direto modificado. Os ingredientes secos (100% de farinha de trigo integral, 1,5% de fermento biológico seco instantâneo, 1,8% de sal e 2,5% de melhorador) e água foram misturados em masseira HAE 10 (Hyppolito, Ferraz de Vasconcellos, Brasil), em velocidade lenta por 4 min, e em velocidade alta até total desenvolvimento da rede de glúten. A massa foi dividida em porções de 65 ± 1 g, que foram boleadas e deixadas em descanso por 15 min. Após este período, foram moldadas em modeladora HM2 Hp 0,5 (Hyppolito, Ferraz de Vasconcellos, Brasil) e fermentadas em câmara de fermentação 20B (Super Freezer, Poços de Caldas, Brasil), por 60-70 min, a 27-30 °C e umidade relativa de 85-90%. Nas massas fermentadas foi feito um corte na superfície para a formação da pestana, e em seguida, foram forneadas em forno de lastro HF 4B (Haas, Curitiba, Brasil), com temperaturas de teto (170 °C) e de lastro (180 °C), por 16 ± 3 min. Após o resfriamento (± 30 min) a caracterização da qualidade tecnológica dos pães foi realizada. Além disso, os pães foram analisados quanto ao teor de minerais (Fe, Zn e Ca), frações de *mi*oinositol fosfato (fitatos) e, posteriormente, ensaios de solubilidade e diálise foram empregados para a estimativa da bioacessibilidade. Dez unidades de pão de cada formulação foram moídas, acondicionadas em embalagens plásticas com ausência de luz, e armazenadas em freezer (- 20 °C), para as análises.

2.2 Caracterização da farinha de trigo

As amostras (controle) de farinha de trigo refinada e integral foram caracterizadas quanto à composição centesimal, através das análises de umidade, proteína bruta, lipídeos e cinzas, pelos métodos 44-15.02, 46-13.01, 30-25.01 e 08-01.01 da AACC (2010), respectivamente. O teor de carboidratos totais foi obtido por diferença. O conteúdo de fibra alimentar total foi determinado pelo método 985.29, AOAC (2000). A quantificação do teor de ferro nas farinhas integrais foi realizada, antes e após o processo de fortificação, conforme Rebellato et al. (2015). As análises foram realizadas em triplicata.

Além disso, as mesmas amostras foram submetidas a análises farinográficas, onde se avaliou a absorção de água (AA), tempo de chegada (TC), tempo de desenvolvimento da massa (TDM), estabilidade (EST) e índice de tolerância à mistura (ITM), através do método 54-21.01 da AACC (2010), utilizando farinógrafo Brabender (Duisburg, Alemanha), modelo 827505. As propriedades extensográficas foram avaliadas quanto à resistência a extensão (R), resistência máxima (Rm), extensibilidade (E) e número proporcional ($D = R/E$), em equipamento Brabender (Duisburg, Alemanha), modelo 860703, pelo método 54-10.01 da AACC (2010).

2.3 Caracterização da qualidade dos pães integrais

Os pães integrais tipo francês (fortificados e controle) foram avaliados através dos parâmetros: volume específico (VE), pelo método 10-05.01 da AACC (2010); formato, avaliado através da medida de largura e altura dos pães, segundo Bodroza-Solarov et al. (2008); salto de forno, segundo Shittu et al. (2008); abertura e altura da pestana, segundo Almeida & Chang (2012).

2.4 Determinação das frações de *mi*oinositol fosfato

Para a determinação das frações de *mi*oinositol fosfato as amostras de pães integrais controle e fortificados com os diferentes compostos de ferro foram extraídos conforme descrito por Sandberg et al. (1989) e a quantificação foi conforme o método nº 986.11 da AOAC (2006).

Essa etapa do trabalho foi realizada na Federal Research Institute of Nutrition and Food, Max Rubner-Institut, Germany.

2.5 Bioacessibilidade de minerais em pão integral tipo francês

As amostras de pães integrais foram avaliadas quanto aos teores de Fe, Zn e Ca. Os minerais foram avaliados por espectrometria de absorção atômica com Chama (FAAS), de acordo com Rebellato et al. (2015). Para a determinação de Ca, uma solução de óxido de lantânio foi adicionada para obter uma concentração final de 0,5%, a fim de eliminar possíveis interferentes. O método utilizado para a quantificação de Zn e Ca foi validado com base nos parâmetros de precisão, recuperação, sensibilidade, linearidade e limites de detecção e quantificação.

O parâmetro de precisão foi estabelecido como o valor médio de coeficiente de variação de $\pm 10\%$. A recuperação foi realizada por meio da adição de padrão (Zn e Ca) na amostra controle, em níveis de 50 e 100%. Porcentagens de recuperação próximas a 100% foram consideradas satisfatórias. A sensibilidade foi expressa pelo slope da equação da regressão linear. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação da curva de calibração e pelo gráfico de resíduos e foram considerados satisfatórios para $r \geq 0,995$. Os limites de detecção e quantificação foram calculados com base na curva de calibração e ambos foram expressos em mg/100 g de pão.

Posteriormente, foi realizado o ensaio de solubilidade segundo Cámara et al. (2005a), com modificações conforme descrito por Rebellato et al. (2015). O volume de solução de enzima utilizado na etapa entérica foi ajustado para 6,0 mL (0,4 g de pancreatina suína, P-7545 e 2,5 g de bile bovina e ovina, B-8631, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA, em 100 mL de NaHCO_3 0,1 mol/L).

O ensaio de diálise foi realizado segundo Perales et al. (2006), com modificações conforme Rebellato et al. (2015). Na etapa entérica, 30 mL de solução de tampão PIPES, 0,30 M (piperazina-N, N0-bis [2-etanossulfônico] dissódico sal), ajustado para pH 6,3 com HCl concentrado, foi utilizado na membrana de diálise ao invés de solução de NaHCO_3 , conforme reportado por Kapsokefalou et al. (2005). O volume da solução de enzima (bile e pancreatina) também foi alterado para 6 mL, conforme descrito no ensaio de solubilidade.

Os teores de Fe, Zn e Ca nas frações, solúvel e dialisada, foram determinados por FAAS, conforme descrito por Rebellato et al. (2015).

2.6 Análise dos dados

Os resultados obtidos para os diferentes parâmetros avaliados nos pães integrais fortificados com os diferentes compostos de ferro e controle foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$), para a comparação das médias, utilizando-se o programa Statistica 7.0 (StatSoft, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da farinha de trigo integral

A farinha de trigo integral foi obtida através da reincorporação de 6% de farelo de trigo à farinha de trigo refinada. Para a caracterização do produto foi feita a análise de composição centesimal da farinha de trigo refinada e da farinha de trigo integral (FTI) e os dados estão apresentados na Tabela 1.

A farinha de trigo refinada atende às exigências legais, Instrução Normativa 8 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2005a), portanto pode ser classificada como farinha de trigo refinada, tipo I, e segundo Schiller (1984), o teor de proteína adequado para uma farinha de trigo ser utilizada para a produção de pão deve variar de 11,5 a 14,5%.

Os teores de cinzas, proteínas e umidade da farinha de trigo integral também estão de acordo com a Legislação Brasileira (Brasil, 2005b), onde se estabelece que uma farinha integral deve conter teor máximo de cinzas de 2,5%, teor mínimo de proteínas de 8,0% e teor de umidade máximo de 15%. O teor de fibras totais aumentou de 2,92% na farinha refinada para 6,91% na farinha integral, porém, na legislação atual, não é estabelecida a quantidade de farelo, contendo ou não gérmen, que deve ser adicionada à farinha de trigo refinada para a obtenção da farinha integral. Segundo Pomeranz et al. (1977), a adição de aproximadamente 7% de farelo de trigo à farinha refinada não causa alterações significativas nas propriedades farinográficas e na qualidade do pão.

Tabela 1. Composição centesimal da farinha de trigo refinada e integral

Parâmetros	FT Refinada	FT Integral
Composição Centesimal		
Umidade (%)	13,69 ± 0,06	13,22 ± 0,11
Proteínas (%)*	12,45 ± 0,11	12,95 ± 0,42
Lipídeos (%)*	1,22 ± 0,05	1,29 ± 0,01
Cinzas (%)*	0,60 ± 0,05	0,80 ± 0,02
Carboidratos totais* **	85,73	84,95
Fibras totais (%)* ^o	2,92 ± 0,01	6,91 ± 0,31

Média ± desvio padrão; FT Refinada: farinha de trigo refinada; FT Integral: farinha de trigo integral; * Valores em base seca; **por diferença; ^o Fração inclusa nos carboidratos totais.

A concentração de ferro encontrado na FT refinada foi de $1,01 \pm 0,03$ mg/100 g, após a adição de 6% de farelo de trigo, o teor aumentou para $1,38 \pm 0,06$ mg/100 g de farinha integral. Nas farinhas fortificadas os valores obtidos foram $5,39 \pm 0,08$; $5,64 \pm 0,11$; $4,80 \pm 0,12$; $5,74 \pm 0,25$; $6,29 \pm 0,22$ e $5,23 \pm 0,09$ mg/100 g

para os compostos SF, FF, Fe R, NaFeEDTA, SF micro e FF micro, respectivamente.

O aumento no teor de ferro na farinha integral era esperado, uma vez que os grãos integrais apresentam, em sua composição, teores de nutrientes superiores aos refinados. No processamento do trigo junto ao farelo é removida uma camada externa do endosperma (aleurona), que é rica em minerais (ferro, cálcio, zinco, fósforo, magnésio e potássio) e vitaminas, quando comparada a outras partes do trigo (Buri et al., 2004; Hemery et al., 2010). Eagling et al. (2014) avaliaram duas variedades comerciais de trigo para a elaboração de pão. Os autores verificaram que as farinhas refinadas apresentaram teores de ferro que variaram de 0,67 a 1,19 mg/100 g, enquanto que as farinhas de trigo integral (100% extração) destas mesmas variedades apresentaram teores de ferro que variaram de 3,03 a 4,67 mg/100 g. Akhter et al. (2012) também avaliaram 12 variedades de trigo Paquistânês e verificaram que os teores de ferro variaram de 3,31 a 5,55 mg/100 g.

3.2 Caracterização reológica

As propriedades reológicas da farinha de trigo podem fornecer informações do comportamento de manipulação da massa durante o processamento e também servir como um indicativo da qualidade do produto final, sendo que alterações nestas propriedades não são desejáveis (Sollars & Rubenthaler, 1975).

Os parâmetros farinográficos e extensográficas para as farinhas integrais, controle e fortificada com os diferentes compostos de ferro, estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

A análise farinográfica, é usada para avaliar o comportamento da massa durante a etapa de mistura. Para o parâmetro absorção de água que é a quantidade de água necessária para que a farinha atinja a consistência ótima, a amostra controle apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) somente para a amostra fortificada com NaFeEDTA. Os diferentes compostos de ferro adicionados à farinha de trigo integral não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), ou seja, independente da forma de ferro utilizada na fortificação da farinha, a AA não foi influenciada. Akhtar et al. (2009) avaliaram o efeito da fortificação nas propriedades reológicas de farinha de trigo integral, e verificaram que a adição de Fe e Zn afetou a AA das farinhas fortificadas, porém a farinha fortificada com NaFeEDTA e $ZnSO_4$, não demonstrou efeito sobre o parâmetro AA. Os autores encontraram efeito inverso

ao verificado no presente estudo, onde somente a farinha fortificada com NaFeEDTA apresentou menor AA em comparação à amostra controle.

Tabela 2. Parâmetros farinográficos da farinha de trigo integral e fortificado com diferentes compostos de ferro.

FTI	AA (%)	TC (min)	TDM (min)	EST (min)	ITM (UF)
Controle	56,93 ± 0,58 a	1,11 ± 0,10 a,b	13,43 ± 0,67 b	21,18 ± 1,94 c	37,33 ± 2,89 a
SF	56,23 ± 0,32 a,b	1,07 ± 0,01 b	15,59 ± 0,45 a	27,89 ± 0,37 a	20,67 ± 1,15 d,e
FF	56,30 ± 0,26 a,b	1,24 ± 0,03 a	15,01 ± 0,54 a	22,62 ± 1,65 b,c	30,00 ± 2,00 b,c
Fe R	56,57 ± 0,06 a,b	1,03 ± 0,04 b	14,73 ± 0,49 a,b	26,79 ± 2,42 a,b	23,39 ± 1,21 d
NaFeEDTA	55,97 ± 0,45 b	1,12 ± 0,05 a,b	14,17 ± 0,90 a,b	20,61 ± 1,51 c	34,33 ± 2,31 a,b
SF micro	56,23 ± 0,25 a,b	1,17 ± 0,10 a,b	15,31 ± 0,22 a	25,73 ± 1,75 a,b	26,00 ± 2,00 c,d
FF micro	56,1 ± 0,17 a,b	1,11 ± 0,03 a,b	15,45 ± 0,15 a	27,90 ± 0,82 a	17,33 ± 1,15 e

Média ± desvio padrão. FTI: farinha de trigo integral. AA: absorção de água; TC: tempo de chegada; TDM: tempo de desenvolvimento da massa; EST: estabilidade; ITM: índice de tolerância à mistura; UF: unidades farinográficas. SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF: fumarato ferroso microencapsulado. Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

Os valores obtidos para o parâmetro tempo de chegada (TC), que é o tempo em minutos que a curva leva para atingir a linha de 500 UF, variaram de 1,03 a 1,24 min, e a amostra controle não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação às amostras fortificadas. Stojceska & Butler (2008) encontraram valores para o TC de 1,3 min em farinha de trigo refinada, enquanto que Schmiele et al. (2012) encontraram valores de TC de 1,5 min em amostra de farinha de trigo integral. Em relação ao tempo de desenvolvimento da massa (TDM), que indica o ponto máximo de força da mistura, os valores variaram de 13,43 a 15,59 min e a amostra controle não diferiu ($p > 0,05$) das amostras fortificadas com Fe R e NaFeEDTA. As demais amostras apresentaram um pequeno aumento do TDM em relação ao controle. É possível verificar também, que não ocorreu diferença significativa entre os compostos de ferro utilizados na fortificação da farinha.

O parâmetro de estabilidade (EST), que é o tempo em minutos que a curva se mantém acima da linha de 500 UF, variou de 20,61 a 27,90 min para as amostras fortificadas com NaFeEDTA e FF micro, respectivamente. É possível verificar na Tabela 2 que este parâmetro foi aumentado pelos compostos de ferro empregados na fortificação e pode indicar um fortalecimento da farinha. Exceção ocorreu para a forma FF e NaFeEDTA, que apresentaram semelhança ao controle. O mesmo efeito foi observado por Akhtar et al. (2009), que verificaram um aumento

da EST quando ferro elementar foi utilizado, e valores semelhantes ao controle quando o NaFeEDTA foi utilizado na fortificação de farinha de trigo integral.

Em relação ao índice de tolerância à mistura (ITM), que mede a queda de consistência da massa em UF, os valores variaram de 17,33 a 37,33 UF, para as amostras fortificadas com FF micro e o controle, respectivamente. Este parâmetro teve seus valores reduzidos pelos diferentes compostos de ferro empregados e a amostra controle não apresentou diferença significativa da fortificada com NaFeEDTA. A redução do ITM pode indicar que os compostos de ferro utilizados podem causar um fortalecimento da farinha. De modo geral, é possível verificar que o ferro, na forma NaFeEDTA, foi o que menos alterou os parâmetros farinográficos da farinha de trigo integral quando comparado à amostra controle (37,33). Por este critério, todas as farinhas fortificadas com os diferentes compostos de ferro foram consideradas adequadas para a elaboração de pães.

Na análise extensográfica (Tabela 3), avalia-se o comportamento da massa durante as etapas de descanso e fermentação. Para o parâmetro de resistência à extensão (R) no tempo de 45 min, é possível verificar que a amostra controle apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) somente da amostra fortificada com NaFeEDTA. Em relação aos demais tempos, 90 e 135 min, a amostra controle não diferiu significativamente ($p > 0,05$) das amostras fortificadas com os diferentes compostos de ferro. O mesmo efeito foi verificado no parâmetro de resistência máxima à extensão (R_m) e no número proporcional (D), onde a amostra controle somente diferiu da fortificada com NaFeEDTA no tempo de 45 min; nos demais tempos a amostra controle não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) das amostras que foram fortificadas.

Para o parâmetro de extensibilidade (E), a amostra controle não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação às amostras de pães fortificados, nos diferentes tempos avaliados, indicando que qualquer forma de ferro pode ser utilizada sem causar alterações neste parâmetro.

De modo geral, o composto NaFeEDTA, foi o que mais afetou os parâmetros extensográficos avaliados (Tabela 3), porém os parâmetros farinográficos foram menos afetados quando este composto foi empregado, ou seja, o composto NaFeEDTA apresentou uma ação tardia quando utilizado e comparado à amostra controle, porém, seu emprego não impossibilita a obtenção de pão integral tipo francês, pois segundo Pizzinatto (1997), uma farinha de trigo pode ser

classificada em relação aos parâmetros extensográficos, e é considerada forte e adequada para a panificação, quando apresenta valores de R, Rm e D maiores que 560 UE, 840 UE e 3,6 UE/mm, respectivamente, e valor de E menor que 155 mm.

Tabela 3. Parâmetros extensográficos da farinha de trigo integral e fortificada com diferentes compostos de ferro

Parâmetro	FTI	Tempo (min)		
		45	90	135
Resistência à extensão, R (UE)	Controle	694,33 ± 26,63 b,c	1088,67 ± 34,99 a,b	1011,00 ± 85,77 a
	SF	664,33 ± 30,50 b,c	1128,67 ± 38,66 a	955,67 ± 22,50 a
	FF	637,00 ± 6,24 c	1067,00 ± 55,56 a,b	989,67 ± 62,50 a
	Fe R	723,67 ± 26,50 a,b	965,67 ± 43,68 b	1155,00 ± 123,04 a
	NaFeEDTA	779,33 ± 44,38 a	1060,00 ± 24,43 a,b	1018,00 ± 21,66 a
	SF micro	675,67 ± 19,35 b,c	1145,33 ± 48,60 a	1005,33 ± 18,01 a
	FF micro	735,00 ± 23,58 a,b	1156,33 ± 64,66 a	1088,00 ± 25,24 a
Resistência máxima à extensão, Rm (UE)	Controle	796,00 ± 7,50 a	1107,57 ± 32,19 a	1084,80 ± 27,50 a,b
	SF	746,93 ± 23,30 a	1110,00 ± 6,33 a	985,53 ± 21,03 b
	FF	720,43 ± 11,59 a	1074,13 ± 57,93 a	1042,87 ± 29,20 a,b
	Fe R	800,20 ± 25,13 a	1078,70 ± 74,06 a	1159,17 ± 105,67 a
	NaFeEDTA	883,50 ± 54,71 b	1066,50 ± 21,04 a	1069,80 ± 71,50 a,b
	SF micro	741,83 ± 34,57 a	1150,17 ± 50,09 a	1066,43 ± 44,70 a,b
	FF micro	791,47 ± 25,48 a	1159,30 ± 68,51 a	1117,40 ± 9,90 a,b
Extensibilidade, E (mm)	Controle	107,03 ± 2,97 a	80,13 ± 6,61 a	71,87 ± 2,10 a
	SF	105,87 ± 4,32 a	74,87 ± 2,69 a	71,33 ± 7,84 a
	FF	105,63 ± 1,12 a	77,70 ± 4,97 a	66,30 ± 2,46 a
	Fe R	102,53 ± 1,46 a	69,20 ± 1,11 a	70,37 ± 3,25 a
	NaFeEDTA	99,03 ± 7,28 a	73,93 ± 4,41 a	70,83 ± 3,91 a
	SF micro	102,53 ± 0,40 a	75,77 ± 0,40 a	70,13 ± 5,49 a
	FF micro	99,50 ± 6,51 a	73,20 ± 4,47 a	68,70 ± 4,27 a
Número proporcional, D (UE/mm)	Controle	6,5 ± 0,37 b,c	13,65 ± 1,12 a	15,01 ± 0,48 a,b
	SF	6,29 ± 0,54 c	15,09 ± 0,63 a	13,50 ± 1,34 b
	FF	6,03 ± 0,09 c	13,07 ± 0,87 a	14,92 ± 0,40 a,b
	Fe R	7,06 ± 0,32 a,b,c	14,02 ± 0,57 a	15,78 ± 0,89 a
	NaFeEDTA	7,88 ± 0,14 a	14,36 ± 0,74 a	15,51 ± 0,44 a,b
	SF micro	6,59 ± 0,20 b,c	15,11 ± 0,71 a	14,39 ± 0,98 a,b
	FF micro	7,42 ± 0,74 a,b	14,89 ± 0,32 a	15,86 ± 0,62 a

Média ± desvio padrão. R: resistência à extensão; Rm: resistência máxima à extensão; E: extensibilidade; D: número proporcional (R/E); UE: unidades extensográficas. FTI: farinha de trigo integral; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilendiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF: fumarato ferroso microencapsulado. Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05).

É possível verificar também que a maioria dos compostos de ferro que foram utilizados na fortificação da farinha integral apresentou um efeito mais pronunciado na análise farinográfica do que na análise extensográfica.

3.3 Caracterização da qualidade tecnológica dos pães integrais tipo francês

Os pães integrais tipo francês foram avaliados tecnologicamente através dos parâmetros: volume específico (VE); formato, através da medida de largura e altura dos pães; salto de forno; abertura e altura da pestana, e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Os valores de volume específico (VE) variaram de 4,94 a 6,30 cm³/g e não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre o controle e os pães fortificados. Valores similares foram reportados por Esteller & Lannes (2005), que avaliaram o VE de pão tipo francês, comercializado em São Paulo, e obtiveram valor médio de 4,63 cm³/g. Gupta et al. (2012) estudaram a influência de ácidos orgânicos na panificação quando empregados diferentes fortificantes. Os autores verificaram que o VE dos pães tipo francês variou de 3,57 a 3,97 cm³/g, para a amostra controle e fortificado com uma mistura de fumarato ferroso, ácido fólico e ácido málico, respectivamente.

Em relação ao formato, avaliado pela relação altura/largura, os valores variaram de 0,74 a 0,84, porém não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre o controle e os pães que foram fortificados com os diferentes compostos de Fe. Em relação à altura, foi verificado que o controle apresentou o menor valor em relação ao pão fortificado com NaFeEDTA, porém entre os compostos de ferro que foram utilizados na fortificação da farinha integral não houve diferença significativa ($p>0,05$). Já o parâmetro largura foi influenciado pelos compostos de ferro e o pão integral com SF foi o que apresentou o maior valor de largura, e a amostra controle não diferiu significativamente dos pães fortificados com NaFeEDTA e FF micro. Nogueira & Steel (2016) estudaram a utilização de massa ácida para a redução de sódio em pão tipo francês e obtiveram valor médio de formato, na amostra controle (farinha comercial), de 0,72. Segundo Bodroza-Solarov et al. (2008), o pão francês pode apresentar formato regular quando a relação altura/largura for igual a 0,5; esférico quando for maior que 0,5 e valor menor indica um formato plano.

O salto de forno foi influenciado negativamente pelos diferentes compostos de ferro, quando comparado à amostra controle (2,03). Este parâmetro

variou de $1,15 \pm 0,20$ a $2,03 \pm 0,10$ cm, para o pão fortificado com SF e o controle, respectivamente. Nogueira & Steel (2016) apresentaram valor médio de salto de forno em pão tipo francês de 1,43 cm.

Tabela 4. Parâmetros de qualidade dos pães integrais tipo francês

FTI	VE (cm ³ /g)	Altura (cm)	Largura (cm)
Controle	$5,54 \pm 0,56$ a,b	$5,36 \pm 0,37$ b	$6,72 \pm 0,26$ c
SF	$6,18 \pm 0,39$ a	$5,68 \pm 0,14$ a,b	$7,66 \pm 0,19$ a
FF	$6,3 \pm 0,36$ a	$5,63 \pm 0,09$ a,b	$7,16 \pm 0,10$ b
Fe R	$6,09 \pm 0,22$ a	$5,83 \pm 0,16$ a,b	$7,19 \pm 0,07$ b
EDTA	$4,94 \pm 0,19$ b	$5,89 \pm 0,03$ a	$7,01 \pm 0,09$ b,c
SF micro	$5,10 \pm 0,29$ b	$5,73 \pm 0,38$ a,b	$7,25 \pm 0,03$ b
FF micro	$5,17 \pm 0,12$ b	$5,52 \pm 0,11$ a,b	$7,05 \pm 0,24$ b,c

FTI	Formato	Salto (cm)	Abertura da pestana (cm)
Controle	$0,80 \pm 0,08$ a,b	$2,03 \pm 0,18$ a	$0,65 \pm 0,10$ c
SF	$0,74 \pm 0,02$ b	$1,15 \pm 0,20$ b	$0,76 \pm 0,14$ b,c
FF	$0,79 \pm 0,01$ a,b	$1,18 \pm 0,05$ b	$1,06 \pm 0,12$ a
Fe R	$0,81 \pm 0,02$ a,b	$1,52 \pm 0,11$ b	$1,04 \pm 0,02$ a
EDTA	$0,84 \pm 0,01$ a	$1,50 \pm 0,12$ b	$0,88 \pm 0,03$ a,b,c
SF micro	$0,79 \pm 0,05$ a,b	$1,28 \pm 0,14$ b	$1,02 \pm 0,08$ a
FF micro	$0,78 \pm 0,02$ a,b	$1,28 \pm 0,08$ b	$0,97 \pm 0,02$ a,b

Média \pm desvio (n = 4). VE: volume específico; FTI: farinha de trigo integral; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF: fumarato ferroso microencapsulado. Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05).

Em relação à abertura da pestana, é possível verificar que os pães fortificados com FF, Fe R, SF micro e FF microencapsulado apresentaram os melhores resultados quando comparados ao pão controle, conforme apresentado na Tabela 4. A altura da pestana também foi avaliada, porém todos os pães integrais apresentaram ausência (valor zero) neste parâmetro. Possivelmente a incorporação de fibras, proveniente do farelo de trigo, pode ter influenciado este parâmetro devido uma menor quantidade de glúten presente na farinha. Segundo Almeida & Chang (2012) uma pestana ideal em pão francês deve apresentar valores de abertura de 2,7 a 3,6 cm e valores de altura de 0,90 a 1,3 cm. Valores inferiores são caracterizados pela falta de abertura e altura de pestana.

3.4 Determinação das frações de *mi*oinositol fosfato

As frações de *mi*oinositol fosfato nas amostras de pães controle e fortificadas com os diferentes compostos de ferro estavam abaixo dos limites de detecção (8×10^{-9} mol L⁻¹) do método analítico e não foram detectados.

Embora existam estudos na literatura que relatem a presença das frações de *mioinositol* fosfato em produtos de panificação, oriundos de farinha de trigo refinada, farinha de trigo integral, farinha de outros tipos de cereais (Brune et al., 1992; Frontela et al., 2011; Park et al., 2011; Sanz-Penella et al., 2012), neste estudo não foram encontradas. Segundo Frontela et al. (2011), as etapas de fermentação e cozimento reduzem significativamente o teor de fitato em processos de panificação. Os mesmos autores observaram redução de 90% no conteúdo de fitato após o assamento de produtos de panificação como pão, pão integral e muffin (Frontela et al., 2011).

3.5 Bioacessibilidade de minerais em pão tipo francês

Para as análises dos teores de Zn e Ca em pães integrais, inicialmente foi feita a validação do método de análise, já validado para o Fe (Rebellato et al., 2015). Para a determinação do elemento Ca, uma solução de óxido de lantânio foi adicionada tanto na amostra quanto na curva de calibração, para eliminação de possíveis interferentes, de forma que a concentração final fosse 0,5% (m/v).

Para o estabelecimento da linearidade, curvas de calibração foram construídas e as concentrações variaram para o Zn de 0,008 a 0,750 mg/L e para o Ca de 0,5 a 5,0 mg/L. Os coeficientes de correlação das curvas de calibração foram considerados adequados ($r > 0,9995$). Os gráficos de resíduos foram plotados e demonstraram uma distribuição normal em torno do zero, livre de tendências. A sensibilidade foi considerada adequada para a determinação de Zn e Ca nos pães integrais. Os limites de detecção e quantificação para o Zn foram 0,005 e 0,02 mg/100 g, e para o Ca foram de 0,4 e 1,5 mg/100 g, respectivamente.

Para a avaliação da precisão, os valores de coeficiente de variação foram 2,41% para o Zn e 2,55% para o Ca. A precisão intermediária foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), com nível de 95% de confiança, e os valores de F calculado foram menores que o F tabulado (4,26) para os teores de Zn e Ca no pão controle. Os valores de recuperação, nos níveis de 50 e 100%, para o Zn foram 115 e 114%; e para o Ca foram 113 e 114%, respectivamente. Portanto, através dos parâmetros avaliados, é possível afirmar que o método para a determinação de Zn e Ca em pão integral francês é adequado.

A estimativa da bioacessibilidade dos minerais Fe, Zn e Ca foi avaliada nos pães integrais, controle e fortificados com diferentes compostos de ferro,

utilizando ensaios *in vitro* de solubilidade e diálise, e os valores obtidos estão apresentados nas Tabelas 5, 6 e 7, respectivamente.

O pão integral controle apresentou teores médios de Fe, Zn e Ca de 2,86, 1,13 e 12,95 mg/100 g, respectivamente. A porção de farelo de trigo adicionada à farinha de trigo refinada elevou os teores de ferro, zinco e cálcio nos pães em 1,32, 0,35 e 0,09 mg/100 g, respectivamente. Este valor foi obtido em estudo realizado por Rebellato (2016), onde se avaliou o teor destes minerais em pão tipo francês elaborado com a mesma farinha de trigo utilizada neste trabalho para a obtenção de farinha de trigo integral com a incorporação de farelo. O aumento nestes teores era esperado, uma vez que o farelo de trigo é rico em minerais, como o ferro, zinco, cálcio, fósforo, magnésio e potássio (Buri et al., 2004).

Tabela 5. Teores de ferro em pão integral tipo francês

Pão Integral Francês	Fe total (mg/100 g)	Fe solúvel (mg/100 g)	Solubilidade (%)	Fe dialisado (mg/100 g)	Diálise (%)
Controle	2,86 ± 0,03 e	0,34 ± 0,02 d	11,75	1,06 ± 0,08 d	37,17
SF	5,61 ± 0,25 b,c	1,05 ± 0,05 b	18,80	1,88 ± 0,20 b,c	33,50
FF	4,83 ± 0,06 d	1,07 ± 0,07 b	21,99	1,80 ± 0,18 b,c	37,33
Fe R	5,28 ± 0,12 b,c,d	0,96 ± 0,04 b,c	18,30	1,68 ± 0,15 c	31,79
NaFeEDTA	5,71 ± 0,12 b	2,56 ± 0,13 a	44,80	2,64 ± 0,14 a	46,14
SF micro	6,34 ± 0,10 a	0,34 ± 0,03 d	5,40	2,10 ± 0,24 b	33,12
FF micro	5,21 ± 0,42 c,d	0,82 ± 0,11 c	14,80	1,80 ± 0,07 b,c	34,65

Média ± desvio (n = 4). Fe: ferro. SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF: fumarato ferroso microencapsulado. Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05).

Após a fortificação com os diferentes compostos de ferro, os pães apresentaram concentrações de ferro que variaram de 4,83 a 6,34 mg/100 g, em média 5,50 mg/100 g. Esta diferença pode estar relacionada à homogeneização do lote de farinha integral fortificada com ferro, pois a quantidade do mineral adicionado à farinha foi equivalente para todas os compostos de ferro (4,2 mg/100 g farinha). Khouzam et al. (2011) avaliaram a bioacessibilidade de Fe em alimentos, inclusive pão Libanês, e encontraram teores de ferro que variaram de 4,1 a 4,7 mg/100 g. Já a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO (NEPA, 2011), relata teor de ferro em pão de forma integral de 3,0 mg/100 g.

Yeung et al. (2005) estudaram a biodisponibilidade de vários tipos de ferro elementar (reduzido, H-reduzido, CO-reduzido, carbonil e eletrolítico) em pães integrais. Os autores verificaram que os teores de ferro nos pães fortificados

variaram de 10,37 a 10,76 mg/100 g e na amostra controle o teor foi de 3,08 mg/100 g. Os teores de Fe reportados pelos autores são superiores aos obtidos no presente estudo. Dependendo do grau de extração do trigo para a obtenção da farinha e da variedade utilizada, os teores de nutrientes, incluindo ferro, podem variar.

Quanto ao estudo de solubilidade, a concentração de ferro solúvel não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre a amostra controle e a fortificada com SF micro (0,34 mg/100 g). Os demais compostos de ferro empregados na fortificação da farinha integral apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao controle, e a forma NaFeEDTA foi a que apresentou a maior fração solúvel (2,56 mg/100 g) e também a maior porcentagem de solubilidade. As amostras de pães com os diferentes compostos de ferro apresentaram porcentagem de solubilidade que variou de 5,40 (SF micro) a 44,80% (NaFeEDTA). Para os demais compostos de Fe ocorreu menor variação dos resultados e os valores de porcentagem de solubilidade ficaram entre 14,80 e 21,99%.

Khouzam et al. (2011) realizaram estudos de bioacessibilidade em “produtos Libaneses” e verificaram que, em pães, a solubilidade variou de 11 a 12%. Neste mesmo período, Frontela et al. (2011) verificaram que pão integral elaborado com 80% farinha de trigo refinada e 20% de farinha de trigo integral, apresentou porcentagem de solubilidade para o ferro de 18,63%.

Em relação à avaliação da diálise para o ferro, a amostra controle apresentou teor do mineral dialisável de 1,06 mg/100 g, enquanto que os pães fortificados apresentaram teores de ferro dialisável de 1,68 a 2,64 mg/100 g. Todas os compostos de ferro empregados na fortificação apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) quando comparadas ao controle. As porcentagens de diálise variaram de 31,79 (Fe R) a 46,14% (NaFeEDTA), para os pães fortificados e a amostra controle apresentou porcentagem de diálise superior (37,17%) ao Fe reduzido utilizado na fortificação. O percentual de Fe dialisável obtido neste estudo foi superior ao reportado por Frontela et al. (2011), que obtiveram 26% de diálise para o ferro. Já Gautam et al. (2011) encontraram teor de diálise para o ferro de 5,07%, ao avaliar a bioacessibilidade de ferro em trigo pelo método de diálise.

Kiskini et al. (2007) estudaram a diálise de ferro (%) em pães sem glúten fortificados com diferentes compostos de ferro (pirofosfato férrico, pirofosfato férrico, NaFeEDTA, ferro eletrolítico, gluconato ferroso, lactato ferroso e sulfato ferroso) e verificaram que os pães sem glúten fortificados com pirofosfato férrico, NaFeEDTA,

bis-glicinato ferroso, gluconato ferroso e sulfato ferroso apresentaram teores de diálise maiores que os pães sem glúten fortificados com ferro eletrolítico, lactato ferroso e pirofosfato férrico.

Yeung et al. (2005) estudaram a biodisponibilidade (digestão *in vitro*/ células Caco-2) de vários tipos de ferro elementar (reduzido, H-reduzido, CO-reduzido, carbonil e eletrolítico) em pão integral e verificaram que o pão fortificado com sulfato ferroso foi o que apresentou o Fe mais biodisponível em comparação com o fortificado com ferro reduzido; o mesmo foi observado no presente estudo, comparando esses dois compostos. Os mesmos autores, em 2003, relataram que a forma de ferro NaFeEDTA apresenta melhor biodisponibilidade do que os compostos na forma elementar e SF quando empregadas na fortificação de farinha.

Vale ressaltar que os compostos de ferro como: sulfato ferroso, fumarato ferroso, NaFeEDTA e sulfato ferroso microencapsulado, são compostos indicados para a fortificação de cereais, pois espera-se que serão melhor absorvidos pelo organismo (Akhtar et al., 2009; Hurrell et al., 2010). Além disso, o composto microencapsulado apresenta a vantagem de proteger o alimento de alterações organolépticas indesejáveis, além de prevenir da oxidação (Cocato et al., 2007). Existem trabalhos que sugerem a substituição do sulfato ferroso pelo mesmo composto, porém, microencapsulado, como alternativa de fortificação, devido às vantagens que o composto apresenta (Cocato et al., 2007; Gotelli et al., 1996; Lysionek et al., 2001). Os resultados obtidos no presente estudo, para o ensaio de diálise, demonstraram que os compostos microencapsulados (SF, FF) não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparados aos compostos não microencapsulados.

Com o objetivo de verificar a bioacessibilidade do Zn quando diferentes compostos de ferro são utilizadas na fortificação da farinha integral foram avaliados o teor, a solubilidade e a diálise nas amostras fortificadas de pão integral tipo francês. Quanto à concentração, verificou-se que o teor de Zn variou de 1,13 a 1,47 mg/100 g. Novamente, esta diferença pode estar relacionada à homogeneização do lote quando a farinha integral foi preparada e a porção utilizada para a elaboração dos pães. As concentrações de Zn obtidas no presente estudo são próximas aos valores reportados pela TACO (NEPA, 2011), que apresenta concentração de Zn em amostras de pão de forma integral de 1,6 mg/100 g (não foram encontrados dados para pão tipo francês integral).

A fração de Zn solúvel e a porcentagem de solubilidade variaram de 0,08 a 0,19 mg/100 g e 7,88 a 15,30%, respectivamente. A amostra controle não diferiu significativamente ($p>0,05$) das amostras fortificadas com FF e Fe R. As amostras fortificadas com SF, NaFeEDTA e FF micro apresentaram os maiores teores de Zn solúvel e porcentagem de solubilidade, respectivamente, e não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre si.

Após o ensaio de diálise, o teor de Zn variou de 0,21 a 0,49 mg/100 g. O pão integral controle somente apresentou diferença significativa ($p<0,05$) dos compostos de ferro microencapsulado (sulfato e fumarato ferroso). Em relação à porcentagem de diálise dos pães fortificados com NaFeEDTA, SF micro e FF micro (35,96; 33,06 e 36,42%, respectivamente), foi verificado que estes compostos apresentaram os maiores valores. Hemalatha et al. (2007) estudaram a bioacessibilidade de zinco em grãos de cereais e encontraram porcentagem de diálise para o trigo de $8,93 \pm 0,44\%$. Esses dados indicam que os compostos de Fe utilizadas na fortificação de farinhas interferem também na possibilidade de absorção do Zn naturalmente presente em pães integrais.

Tabela 6. Teores de zinco em pão integral tipo francês

Pão Integral Francês	Zn total (mg/100 g)	Zn solúvel (mg/100 g)	Solubilidade (%)	Zn dialisado (mg/100 g)	Diálise (%)
Controle	1,13 ± 0,02 c	0,09 ± 0,01 c	7,88	0,26 ± 0,02 b	23,39
SF	1,21 ± 0,02 b,c	0,17 ± 0,01 a	14,41	0,26 ± 0,03 b	21,05
FF	1,20 ± 0,02 b,c	0,08 ± 0,01 c	6,75	0,28 ± 0,03 b	23,27
Fe R	1,15 ± 0,01 b,c	0,11 ± 0,01 b,c	9,67	0,21 ± 0,01 b	18,40
FeNaEDTA	1,21 ± 0,02 b,c	0,18 ± 0,02 a	15,30	0,44 ± 0,02 a	35,96
SF micro	1,47 ± 0,14 a	0,14 ± 0,02 b	9,62	0,49 ± 0,06 a	33,06
FF micro	1,28 ± 0,01 b	0,19 ± 0,02 a	14,99	0,47 ± 0,04 a	36,42

Média ± desvio (n = 4). Fe: ferro. SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF: fumarato ferroso microencapsulado. Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ($p<0,05$).

Khouzam et al. (2011) avaliaram a bioacessibilidade de minerais em diferentes alimentos Libaneses, inclusive em pão integral (os autores não relatam se houve ou não a fortificação dos alimentos com minerais), e verificaram que o teor total de zinco variou de 2,4 a 3,4 mg/100 g. Em relação à solubilidade, os valores obtidos pelos mesmos autores foram de 5,9 a 9,5%, enquanto que no nosso estudo valores superiores foram verificados (6,75 a 15,30%). Frontela et al. (2011), ao estudarem a bioacessibilidade de minerais naturalmente presentes em pão integral,

obtiveram valor de Zn similar (15,73%) aos encontrados neste estudo para o ensaio de solubilidade, enquanto que para o ensaio de diálise, o valor encontrado pelos autores foi inferior (4,13%) aos obtidos.

Através dos dados obtidos é possível verificar que o zinco naturalmente presente na farinha de trigo pode ser influenciado positivamente na absorção pelos compostos de ferro empregados na fortificação, e os compostos NaFeEDTA, SF micro e FF micro promoveram as maiores porcentagens de solubilidade e diálise. Existem estudos que relatam o efeito positivo do uso de Na₂EDTA e/ou NaFeEDTA sobre a absorção de ferro e zinco (Hettiarachchi et al., 2004; Moretti et al., 2014; Zhu et al., 2009).

O teor, a solubilidade e a diálise de Ca também foram avaliados nas amostras de pão integral tipo francês fortificado com diferentes compostos de ferro, com o intuito de verificar a bioacessibilidade do mineral frente aos diferentes compostos de ferro utilizados na fortificação de farinha de trigo.

Tabela 7. Teores de cálcio em pão integral tipo francês

Pão Integral Francês	Ca total (mg/100 g)	Ca solúvel (mg/100 g)	Solubilidade (%)	Ca dialisado (mg/100 g)	Diálise (%)
Controle	12,95 ± 0,57 b	7,71 ± 0,71 c	63,33	6,88 ± 0,75 b,c	53,01
SF	14,31 ± 0,27 a	11,84 ± 0,99 a	82,87	8,12 ± 0,36 a,b	56,75
FF	14,14 ± 0,55 a	10,17 ± 0,57 b	72,09	7,42 ± 0,89 a,b,c	52,35
Fe R	12,54 ± 0,03 b	7,50 ± 0,68 c	59,86	6,60 ± 0,23 c,d	52,61
NaFeEDTA	12,92 ± 0,10 b	7,85 ± 0,46 c	60,57	6,36 ± 0,26 c,d	49,23
SF micro	13,2 ± 0,27 b	3,18 ± 0,01 d	24,07	8,42 ± 0,41 a	63,77
FF micro	14,47 ± 0,30 a	4,26 ± 0,49 d	29,50	5,55 ± 0,66 d	38,29

Média ± desvio (n = 4). Fe: ferro. SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilendiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF: fumarato ferroso microencapsulado. Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05).

O teor total de Ca nas amostras de pães integrais fortificadas com os diferentes compostos de ferro variou de 12,54 a 14,47 mg/100 g. O pão controle apresentou diferença significativa das amostras fortificadas com SF, FF e FF micro. Esta variação pode estar relacionada à homogeneização da farinha, conforme já mencionado. Teores de Ca de 132; 31,83 e 16 mg/100 g, em amostras de pão de forma integral com 6,9% de fibras, pão de forma tradicional e pão tipo francês, respectivamente, já foram reportados (NEPA, 2011; Oliveira et al., 2011). Estas diferenças podem ser decorrentes de variações climáticas e regionais, além do grau

de extração da farinha de trigo utilizada e do tipo de pão formulado (Afridi et al., 2011).

O teor de Ca solúvel variou de 3,18 a 11,84 mg/100 g entre as amostras. O controle não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) das amostras fortificadas com Fe R e NaFeEDTA. É possível verificar que a solubilidade do Ca foi influenciada positivamente pelas amostras fortificadas com SF e FF, as quais apresentaram os maiores teores de Ca solúvel, enquanto que as amostras fortificadas com os compostos de ferro microencapsuladas foram influenciadas negativamente. A porcentagem de solubilidade variou de 24,07 a 82,87% para as amostras fortificadas com SF micro e SF, respectivamente.

Já a concentração de Ca dialisado variou de 5,55 a 8,42 mg/100 g, o que corresponde a 38,29 e 63,77% de diálise, respectivamente. A amostra controle somente apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), no ensaio de diálise, com as amostras fortificadas com os compostos microencapsuladas.

Akhter et al. (2012) avaliaram 12 variedades de trigo Paquistânês e estudaram a bioacessibilidade de cálcio, verificando que o teor total variou de 25,1 a 53,5 mg/100 g e a porcentagem de diálise de 17 a 19,5%. Os teores de Ca total obtidos no presente estudo foram menores que os reportados pelo autor, porém a porcentagem de diálise no nosso estudo foi 2,5 vezes maior do que as encontradas nos trigos Paquistaneses. Frontela et al. (2011) obtiveram porcentagem de solubilidade e diálise para Ca em amostra de pão integral de 10,57 e 4,27%, respectivamente. Os valores reportados pelos autores são menores do que os obtidos no presente estudo e também pelos descritos por Akhter et al. (2012).

A simulação *in vitro* (solubilidade e/ou diálise) não representa a complexidade do processo digestivo humano, pois é realizada de forma pontual e não sofre a influência de fatores fisiológicos que podem afetar a biodisponibilidade de minerais. Contudo, os métodos *in vitro*, com ou sem modificações químicas, têm sido amplamente utilizados com o intuito de predizer uma tendência sobre a disponibilidade de nutrientes presentes nos alimentos, pois têm sido bem correlacionados com modelos *in vivo* (Hur et al., 2011).

Dados sobre a bioacessibilidade de minerais Fe (diferentes compostos), Zn e Ca naturalmente presentes em pães integrais são importantes para a verificação da estimativa do potencial de absorção desses minerais essenciais quando pães são consumidos.

4. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que os diferentes compostos de ferro utilizados na fortificação de farinha de trigo integral para a elaboração de pão integral tipo francês influenciaram as características reológicas da massa e também a qualidade dos pães, quando comparadas à amostra controle, porém estes parâmetros não afetaram a elaboração dos pães. Não foram detectadas as frações de *mi*oinositol fosfato nas amostras de pão integral controle e fortificadas com os diferentes compostos de ferro.

Os compostos NaFeEDTA, sulfato ferroso microencapsulado e fumarato ferroso demonstraram ser os mais eficientes para a fortificação de farinha de trigo refinada com 6% de farelo de trigo, por apresentarem as maiores porcentagens de Fe solúvel e dialisado, podendo contribuir efetivamente para a redução da anemia ferropriva. Estes compostos também permitiram maior disponibilidade do Zn naturalmente presente na farinha de trigo. O cálcio apresentou maior compatibilidade para os compostos de ferro, como sulfato ferroso, fumarato ferroso e sulfato ferroso microencapsulado.

CAPÍTULO 4:
EFEITOS DA FORTIFICAÇÃO COM DIFERENTES COMPOSTOS DE FERRO NA
ESTABILIDADE DA FARINHA DE TRIGO REFINADA.

CAPÍTULO 4: EFEITOS DA FORTIFICAÇÃO COM DIFERENTES COMPOSTOS DE FERRO NA ESTABILIDADE DA FARINHA DE TRIGO REFINADA.

Ana Paula Rebellato¹, Juliana Azevedo Lima Pallone¹.

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

RESUMO

Devido a possível efeito pró-oxidante do ferro, a caracterização das alterações que podem ocorrer durante o armazenamento de farinha de trigo fortificada com diferentes compostos de ferro é uma ferramenta valiosa para a compreensão das variações que podem acontecer na qualidade do produto final. Portanto, objetivou-se avaliar o efeito da fortificação de farinha de trigo refinada com diferentes compostos de ferro (sulfato ferroso, fumarato ferroso, ferro reduzido, sódio ferro etilenodiaminotetracético, sulfato ferroso microencapsulado e fumarato ferroso microencapsulado), nos parâmetros de qualidade e/ou estabilidade. Para tal, foram avaliados a acidez titulável, cor, índice de peróxido e hexanal durante o período de estocagem de 120 dias. Os teores de ferro de 1,0 mg/100 g na farinha não fortificada (controle) e de 4,41 a 5,84 mg/100 g nas amostras fortificadas com os diferentes compostos de ferro estavam de acordo com o esperado. A fortificação de farinha de trigo com diferentes compostos de ferro causou alteração durante a estocagem. O sulfato ferroso demonstrou ser o composto que mais modificou os parâmetros de qualidade da farinha. Os compostos microencapsulados (sulfato e fumarato ferroso) alteraram negativamente a qualidade da farinha em consideração ao parâmetro hexanal, relacionado com a oxidação de lipídeos. Já os compostos de ferro reduzido e NaFeEDTA, foram os que menos alteraram os parâmetros de qualidade das farinhas avaliadas.

Keywords: Ferro, degradação, qualidade, hexanal, gas chromatography,

1. INTRODUÇÃO

O trigo é um cereal amplamente cultivado e apresenta grande importância na alimentação humana. A farinha de trigo contém carboidratos (70 – 75%), água (12 – 14%), proteínas (8 – 16%), lipídeos (1 - 2%), cinzas (1%), além de vitaminas e minerais (Morita et al., 2002). A fração lipídica é composta por aproximadamente 51% de lipídeos não polares ou neutros (triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres, entre outros) e 49% por lipídeos polares, compostos por glicolipídeos e fosfolipídeos (Pomeranz, 1988). A estabilidade oxidativa da farinha de trigo pode ser afetada, entre outros fatores, pela fração de ácidos graxos que é composta pelos ácidos: palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1c), linoléico (C18:2), linolênico (C18:3) e eicosenoico (C20:1) (Cramer et al., 2005). Variações na quantidade e composição dos constituintes da farinha de trigo podem ocorrer em função da genética das cultivares e podem influenciar a qualidade do produto final (Morita et al., 2002; Rutz, 2012).

Atualmente toda farinha de trigo comercializada no Brasil, assim como em outros países, deve ser fortificada com ferro com o intuito de reduzir a prevalência de anemia ferropriva, causada pela reduzida ingestão de ferro biodisponível (Brasil, 2002; WHO, 2006). Esta deficiência é considerada um problema de saúde pública, pois aproximadamente 25% da população apresenta falta deste mineral (WHO, 2006).

No Brasil, a Legislação permite adicionar diferentes compostos de ferro em farinha de trigo, sendo autorizados os compostos: sulfato ferroso desidratado (seco), fumarato ferroso, ferro reduzido, ferro eletrolítico, sódio ferro etilenodiaminotetracético (NaFeEDTA), ferro bisglicina quelato e outros compostos de biodisponibilidade não inferior à dos compostos permitidos (BRASIL, 2002). Outros compostos de ferro, como o pirofosfato férrico (Kiskini et al., 2010) e sulfato ferroso microencapsulado (Nabeshima et al., 2005), também estão sendo utilizados no Brasil e em outros países.

Durante o processo de fortificação, alguns parâmetros devem ser levados em consideração para que não ocorra o comprometimento da qualidade da matéria-prima nem do produto final, tais como, alteração de cor, custo, propriedades tecnológicas e de qualidade, capacidade de absorção no organismo, além do efeito do ferro (pro oxidante) sobre a oxidação lipídica (Akhtar et al., 2011; WHO, 2006).

A caracterização das mudanças que ocorrem devido a oxidação dos ácidos graxos insaturados durante o armazenamento, é uma ferramenta valiosa para a compreensão de alterações que podem ocorrer na qualidade da farinha de trigo, sendo assim, pode contribuir com informações para a previsão da vida de prateleira desse produto, quando fortificado com ferro. As indústrias que utilizam a farinha de trigo como base de seus produtos, visam a estabilidade da matéria prima por um período longo, a fim de fornecer um produto final com qualidade (Jensen et al., 2011).

Os lipídios presentes na farinha de trigo, mesmo que em pequenas quantidades, são os responsáveis pelo processo de rancificação (hidrolítica e oxidativa). A hidrolítica ocorre por mecanismo enzimático (através das lipases) ou químico (ação de ácidos ou bases) que atuam sob a ligação éster dos triacilgliceróis, formando como produto glicerol e ácidos graxos livres.

Já a oxidação lipídica é uma das principais causas de deterioração em alimentos, pois reduz sua estabilidade e ocasiona a formação de sabores que afetam de forma negativa a qualidade, a conservação e sua aceitação pelo consumidor (Muresan et al., 2010). O processo oxidativo ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação. As reações iniciais da oxidação lipídica podem ser promovidas por absorção de energia e por reação redox. As reações redox são catalisadas por metais de transição, como cobre, manganês e ferro (reações de Fenton/Harber-Weiss), e são capazes de romper a barreira eletroquímica entre o oxigênio e ligações insaturadas das moléculas de ácidos graxos presente no alimento. Assim promovem a iniciação do processo oxidativo (Ferrari, 1998). Estas reações podem causar modificações na qualidade da farinha de trigo comprometendo a cor, sabor, além de degradar vitaminas, aminoácidos e ácidos graxos essenciais (Ortolan et al., 2008; Rutz, 2012). Portanto, a avaliação da cor em farinha de trigo é uma ferramenta importante para a avaliação da qualidade, pois a coloração amarela transmitida pelos carotenoides (principalmente luteína e ésteres de ácidos graxos) podem sofrer alterações devido a condições de estocagem, entre outros fatores (Hidalgo et al., 2014).

Vários são os métodos empregados para a avaliação da estabilidade oxidativa em alimentos, porém nenhum método indica perfeitamente as modificações químicas e organolépticas produzidas no decurso das reações de oxidação. Dessa forma, existe a necessidade do uso combinado das informações físico-químicas para avaliar um estado particular do processo oxidativo.

Determinações que utilizam métodos colorimétricos, iodométrico, entre outros, são utilizados para análise de produtos primários de oxidação, como o índice de peróxidos (IP), que deve ser determinado no primeiro estado do processo oxidativo (Silva et al., 1999). No processo de decomposição de peróxidos são produzidos diferentes compostos como aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, entre outros. Estes compostos são considerados produtos secundários e a quantificação pode ser realizada por métodos colorimétricos e cromatográficos.

Uma vez que as farinhas de trigo são fortificadas com diferentes compostos de ferro que apresentam diferentes reatividades, o acompanhamento da qualidade e/ou estabilidade durante o armazenamento é necessária, a fim de verificar possíveis alterações. Estudos que abordam os parâmetros de qualidade e/ou estabilidade de farinha de trigo fortificada com diferentes compostos de ferro durante a estocagem são escassos. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da fortificação de farinha de trigo refinada com diferentes compostos de ferro em relação aos parâmetros de qualidade e/ou estabilidade como, acidez, cor, índice de peróxido e hexanal durante o período de estocagem de 120 dias, além de avaliar o teor de ferro. Com o intuito de verificar quais variáveis apresentaram maior influência sobre a qualidade e/ou estabilidade da farinha de trigo fortificada com diferentes compostos de ferro, uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Farinha de trigo refinada

Uma amostra de 100 kg de farinha de trigo refinada (Moinho Guaçu Mirim, Mogi Guaçu, Brasil), composta por $13,69 \pm 0,06\%$ de umidade, $12,45 \pm 0,11\%$ de proteínas, $1,22 \pm 0,05\%$ de lipídios, $0,60 \pm 0,05\%$ de cinzas, $2,92 \pm 0,01\%$ de fibras e $85,73\%$ de carboidratos, foi fracionada em porções de 10 Kg e fortificada com $4,2 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ($\pm 20\%$), conforme Resolução Normativa, nº 344 de 2002. Foram utilizados diferentes compostos de ferro, totalizando 6 amostras e um controle (sem adição de ferro). Os compostos de ferro utilizados foram: sulfato ferroso monohidratado (SF), fumarato ferroso (FF), ferro reduzido (Fe R), (M Cassab, SP, Brasil); sódio ferro etilenodiaminotetracético (NaFeEDTA - Ferrazone), (Vogler Ingredients, SP, Brasil); sulfato ferroso microencapsulado (SF micro) e fumarato ferroso microencapsulado (FF micro), (Funcional Mikron, Valinhos, Brasil). No processo de fortificação as

farinhas de trigo foram homogeneizadas em misturador em V (Tecnal, Piracicaba, Brasil), por 30 min, em porções de 5 kg. Porções de 1 kg foram embaladas em embalagem plástica e estocadas a temperatura ambiente média de 24,4 °C (20,9 a 27,5 °C) para simulação da vida de prateleira. Após o processo de fortificação as amostras de farinha de trigo refinada controle e as fortificadas com os diferentes compostos de ferro foram avaliadas quanto aos parâmetros de acidez titulável, cor, índice de peróxido, área de hexanal e teor de ferro, no tempo inicial (T1). Após este período, as amostras foram mantidas em embalagens fechadas, a temperatura ambiente e mensalmente uma porção foi retirada para análise de acidez titulável, cor, índice de peróxido e área de hexanal, para o acompanhamento da vida de prateleira, durante 120 dias (T2, T3, T4 e T5, como 30, 60, 90 e 120 dias, respectivamente).

2.2 Métodos

O teor de ferro total foi realizado de acordo com Rebellato et al. (2015). A acidez titulável foi realizada segundo método descrito por Pizzinatto (1997) e o índice de peróxido segundo Jensen et al. (2011). A determinação da cor foi realizada através dos parâmetros de luminosidade L^* (variam entre zero = preto e 100 = branco) e coordenadas de cromaticidade a^* ($-a^*$ = verde e $+a^*$ = vermelho) e b^* ($-b^*$ = azul e $+b^*$ = amarelo) utilizando espectrofotômetro MiniScan (Hunterlab, Reston, Estados Unidos), seguindo o sistema CIELab (MINOLTA, 1993). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.3 Extração dos compostos voláteis da farinha

O método para a extração dos compostos voláteis nas farinhas fortificadas com os diferentes compostos de ferro foi realizado segundo Kaseleht et al. (2011).

As amostras foram retiradas do ultrafreezer e homogeneizadas na própria embalagem, 5 g das amostras de farinha foram retiradas, e condicionadas em frascos de vidro âmbar de 20 mL fechados com tampas de silicone revestido com PTFE. Os compostos voláteis foram extraídos do *headspace* das amostras utilizando a técnica de microextração em fase sólida (HS-SPME). A fibra de SPME de revestimento Carboxen/polidimetilsiloxano (Car/PDMS) (75 μm \times 10 mm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) foi utilizada na extração. A fibra foi previamente condicionada

seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Os frascos contendo as amostras foram submetidos à extração por 40 min, em banho-maria a 40 °C. Antes da extração, cada frasco contendo as amostras foi submetido a um tempo de pré-equilíbrio na mesma temperatura de extração, sem exposição da fibra por 10 min. Após o término da extração, a fibra foi removida e inserida no injetor do cromatógrafo para dessorção térmica dos analitos.

2.4 Análise cromatográfica

A etapa cromatográfica foi realizada conforme Cramer et al. (2005). Após a extração, os compostos voláteis foram analisados em cromatógrafo de fase gasosa equipado com detector de ionização de chama (GC-FID; Varian Star 3400CX; CA, EUA)). A fibra foi dessorvida termicamente na porta de injeção a temperatura de 250 °C durante 10 min, em modo de *splitless* durante 2 min. Os compostos foram separados em coluna capilar polar de sílica fundida ZB-WAX Plus (60 m × 0,25 mm × 0,25 µm; Phenomenex, USA). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a pressão constante (30 psi). A temperatura inicial da coluna foi de 35 °C e mantida em isoterma por 5 min, posteriormente um aumento a 2 °C/min foi acionado até 50 °C, seguido de aumento de 4 °C/min até 150 °C, e então aumentando 10 °C/min até 210 °C e mantido em condições isotérmicas durante 5 min. A temperatura do detector foi mantida a 230 °C. Uma série de n-alcenos homólogos foram analisados sob as mesmas condições cromatográficas para calcular o índice de retenção linear (LRI).

A análise qualitativa de voláteis foi efetuada por cromatógrafo à gás da marca Shimadzu QP2010 Plus acoplado a espectrômetro de massas (GC/MS, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). Para estas análises foram usadas as mesmas condições cromatográficas acima descritas e hélio foi utilizado como o gás de arraste. O detector foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons com uma energia de ionização de 70 eV e um intervalo de digitalização de massas 35-350 m/z. Os analitos foram identificados com base na comparação com os espectros de massas disponível na biblioteca National Institute of Standards and Technology (NIST) e por comparação do LRI calculado com aqueles disponíveis na literatura científica.

2.5 Análise dos dados

Os resultados obtidos, nos diferentes parâmetros avaliados, para as diferentes amostras de farinha de trigo refinada controle e fortificada com os diferentes compostos de ferro, foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$) para a comparação das médias entre as amostras e entre os tempos avaliados, utilizando o programa Statistica 7.0 (StatSoft, EUA). Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA), através do Pirouette 3.11 software (Infometrix, Inc., Bothell, WA), para isso, os dados foram autoescalados, pois os resultados obtidos apresentaram diferença nos valores em ordem de grandeza.

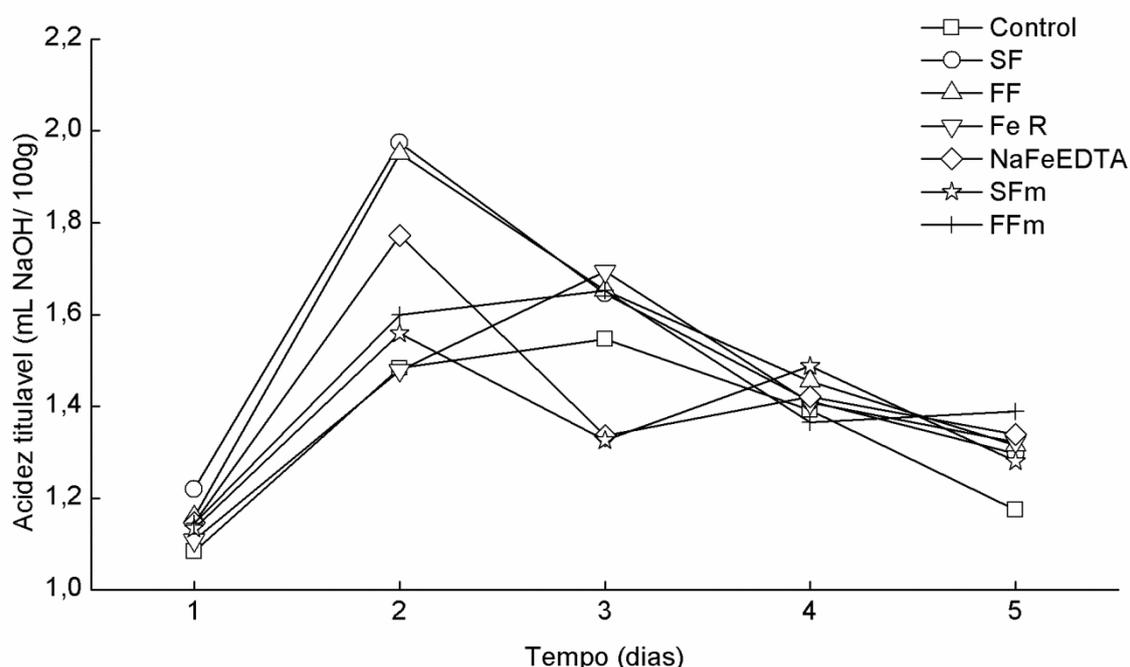
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A farinha de trigo refinada controle (sem adição de ferro) continha originalmente $1,01 \pm 0,03$ mg/100 g de ferro, e as amostras fortificadas com SF, FF, Fe R, NaFeEDTA, SF micro e FF micro apresentaram teores de $5,84 \pm 0,12$, $5,07 \pm 0,16$, $4,41 \pm 0,07$, $5,24 \pm 0,30$, $5,17 \pm 0,41$ e $5,22 \pm 0,15$ mg/100g, respectivamente. O teor de ferro obtido na amostra controle está de acordo com dados publicados na literatura (NEPA, 2011) e para as amostras fortificadas os valores estão de acordo com a Resolução Normativa RDC 344 (Brasil, 2002), e condizem com os valores reportados por Frontela et al. (2011) que avaliaram amostras de farinha de trigo comercial fortificada com ferro.

Alterações nutricionais em farinhas de cereais (trigo, milho e arroz) podem ocorrer naturalmente durante a estocagem (Rehman, 2006), e o parâmetro de acidez utilizado como indicador de qualidade durante o armazenamento, tanto dos grãos, quanto da farinha de trigo (Rutz, 2012). Este parâmetro está relacionado com o estado de conservação, e envolve tanto aspectos químicos como microbiológicos (Ortolan et al., 2008). Os resultados obtidos para a acidez titulável em farinha de trigo refinada e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante o armazenamento, estão apresentados da Figura 1 (para visualização dos resultados, incluindo o tratamento estatístico, a Tabela 1 encontra-se no Apêndice A).

Para o parâmetro de acidez titulável, foi verificado que no tempo inicial (T1) os valores de acidez variaram de 1,08 a 1,22 mL de NaOH/100 g. A amostra controle apenas apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) das farinhas de trigo fortificadas com SF, FF e NaFeEDTA, ou seja, estes compostos de ferro

promoveram um maior aumento na acidez já no tempo inicial, o que influenciou negativamente a qualidade da farinha. Após 30 dias de estocagem (T2) é possível verificar que os valores de acidez aumentaram para todas as amostras de farinha de trigo (1,48 a 1,97 mL de NaOH/100 g de farinha), sendo verificado que os mesmos compostos de ferro que influenciaram o tempo T1 influenciaram também o tempo T2, em relação à amostra controle. Também foi verificado que neste período (T2) ocorreu o maior aumento de acidez.



Valor médio (n=3). Control: farinha de trigo sem fortificação; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SFm: sulfato ferroso microencapsulado; FFm: fumarato ferroso microencapsulado. 1: T1 (início); 2: T2 (30 dias); 3: T3 (60 dias); 4: T4 (90 dias); 5: T5 (120 dias).

Figura 1. Valores de acidez titulável em farinha de trigo refinada e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante 120 dias de armazenamento.

No período T3 (60 dias de estocagem) as amostras fortificadas com SF, FF, NaFeEDTA e SF micro tiveram redução na acidez. No tempo T4 (90 dias), os valores de acidez (1,37 a 1,49 mL de NaOH/100 g de farinha) diferiram significativamente ($p < 0,05$) da farinha de trigo fortificada com SF micro. Para a farinha fortificada com SF micro observou-se aumento da acidez e para as demais amostras diminuição. Já no tempo T5 (120 dias), os valores de acidez (1,17 a 1,39 mL de NaOH/100 g de farinha) da amostra controle apresentou diferença

significativa das farinhas fortificadas com Fe R, NaFeEDTA e FF micro. Em relação aos valores de acidez encontrados entre as amostras nos diferentes períodos de tempo é possível verificar que a acidez da farinha de trigo estudada aumentou de forma diferenciada quando diferentes compostos de ferro foram utilizados na fortificação das farinhas, ou seja, a qualidade da farinha de trigo foi influenciada negativamente.

O resultado da influência da acidez titulável ao longo do tempo mostra que as amostras de farinha de trigo controle, Fe R e FF micro apresentaram o mesmo comportamento, ou seja, os maiores valores de acidez titulável foram no tempo T3, com valores de 1,55, 1,70 e 1,65 mL de NaOH/100 g de farinha, respectivamente. Já as demais amostras de farinha de trigo fortificada (SF, FF, NaFeEDTA e SF micro) apresentaram os maiores valores de acidez no tempo T2, e os valores variaram de 1,56 a 1,97 mL de NaOH/100 g de amostra. Estes resultados estão condizentes com os reportados por Rehman (2006) que avaliaram os valores de acidez em trigo durante 6 meses e obtiveram valores que variaram de 2,85 a 4,00 mg NaOH/100 g. Nogueira & Steel (2016) também avaliaram a acidez titulável em farinha de trigo comercial fortificada com ferro e obtiveram valores superiores ao obtido nesse trabalho ($3,40 \pm 0,06$ mL de NaOH/100 g). Miranda & El-Dash (2002) avaliaram a estabilidade de farinha de trigo integral germinado durante 6 meses de armazenamento. Os autores verificaram aumento da acidez ao longo do tempo avaliado tanto para a amostra controle quanto para as amostras germinadas.

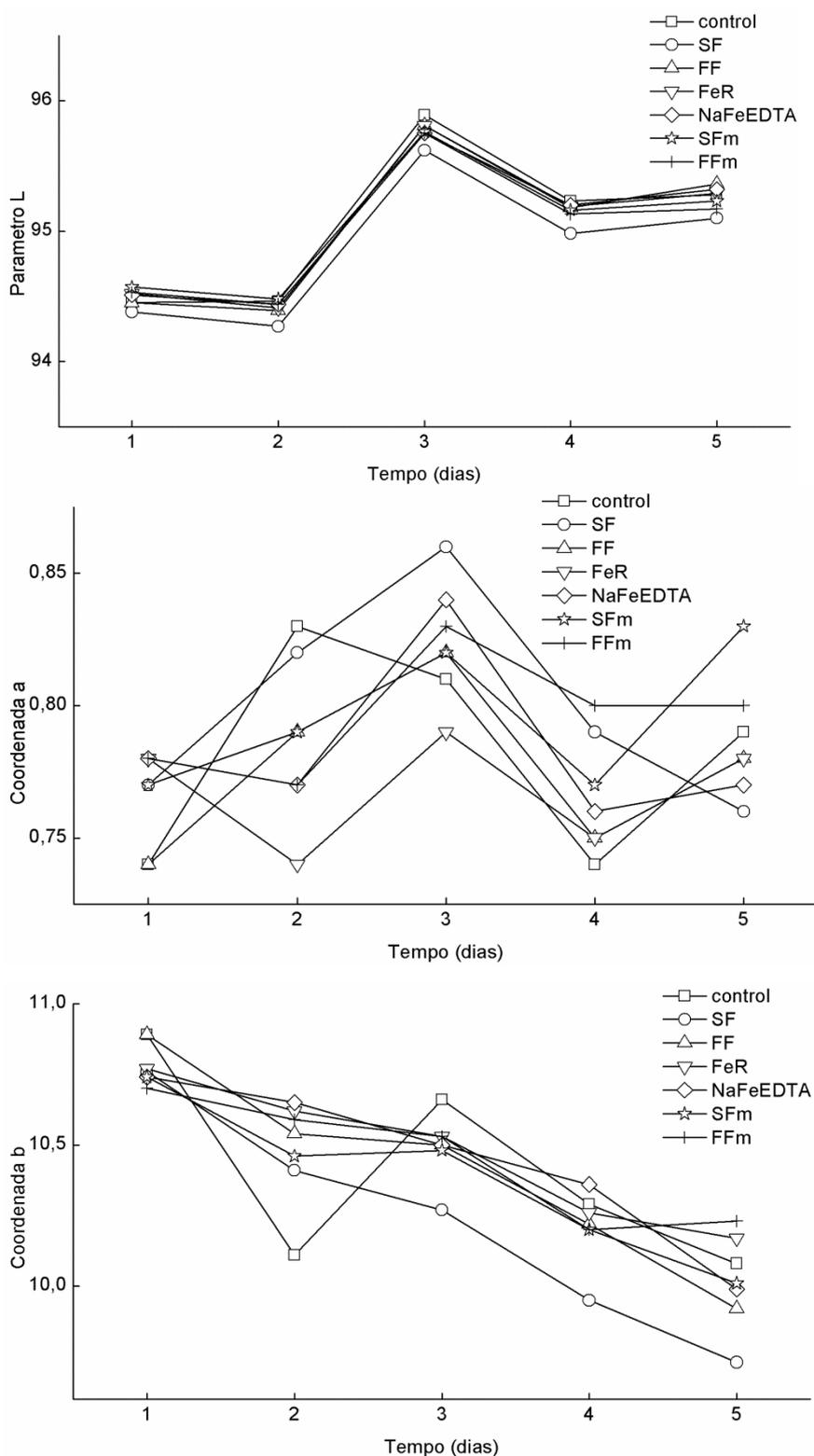
O aumento da acidez, ocasionada pela quebra hidrolítica das gorduras com formação de ácidos graxos livres durante a estocagem, sinaliza o estágio inicial da perda de qualidade da farinha. A rancidez hidrolítica na farinha de trigo pode ocorrer durante o armazenamento inadequado, em operações de processamento e no produto final (Rutz, 2012). A reação que ocorre se inicia pela presença da lipase, a qual está presente na camada mais externa do grão, e, com a moagem do grão de trigo até farinha, a lipase é liberada atuando sob a ligação éster entre lipídios e glicerol, com isso ocorre a liberação de ácidos graxos, e conseqüentemente se torna responsável pela deterioração da farinha de trigo durante o armazenamento (Mousia et al., 2004). A acidez das amostras se origina a partir da hidrólise enzimática de lipídios para liberar os ácidos graxos livres e, em menor extensão da oxidação dos ácidos graxos insaturados para formar produtos de degradação ácidos.

Quanto aos parâmetros de cor da farinha de trigo, os valores de L^* , a^* e b^* , foram avaliados nas amostras de farinha de trigo refinada e fortificada com diferentes compostos de ferro e estão apresentados na Figura 2 ou Apêndice B.

Ao avaliar os valores de L^* do controle em relação às amostras fortificadas com os diferentes compostos de ferro é possível verificar que no tempo T1, logo após a fortificação das farinhas, a amostra controle não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação às amostras fortificadas, somente houve diferença significada entre as amostras fortificadas com SF (94,38) e SF micro (94,57). Em relação aos valores de a^* e b^* , no tempo inicial (T1), todas as amostras apresentaram valores positivos e não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras. No tempo T2 (30 dias de armazenamento), somente a amostra fortificada com SF apresentou diferença significativa em relação ao controle, para o parâmetro L^* . Os valores de a^* e b^* , neste período, também foram positivos e não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

Para o tempo T3 (60 dias de estocagem), a amostra controle apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras fortificadas com SF, NaFeEDTA, SF micro e FF micro, ou seja, a amostra controle apresentou a coloração mais próxima do branco ($L=100$) do que as farinhas fortificadas. Os valores de a^* não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si, e nos valores de b^* foi possível verificar diferença significativa entre a amostra controle e a fortificada com SF, ou seja, a amostra controle estava ligeiramente mais amarela do que a fortificada com SF. No tempo T4 (90 dias de armazenamento), para o valor de L^* , a amostra controle apresentou diferença significativa das amostras fortificadas com SF e FF microencapsulado, e os valores de a^* e b^* não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

Após 120 dias de estocagem (T5), foi possível verificar que a amostra controle apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) somente da amostra fortificada com SF para o valor de L^* . Para os valores de a^* e b^* , não foi verificado diferença significativa entre o controle e as amostras de farinha fortificada com os diferentes compostos de ferro.



Média (n=3). Control: farinha de trigo sem fortificação; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SFm: sulfato ferroso microencapsulado; FFm: fumarato ferroso microencapsulado. 1: T1 (início); 2: T2 (30dias); 3: T3 (60 dias); 4: T4 (90 dias); 5: T5 (120 dias).

Figura 2. Valores dos parâmetros de cor: luminosidade L^* e das coordenadas a^* e b^* em farinha de trigo refinada e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante 120 dias de armazenamento.

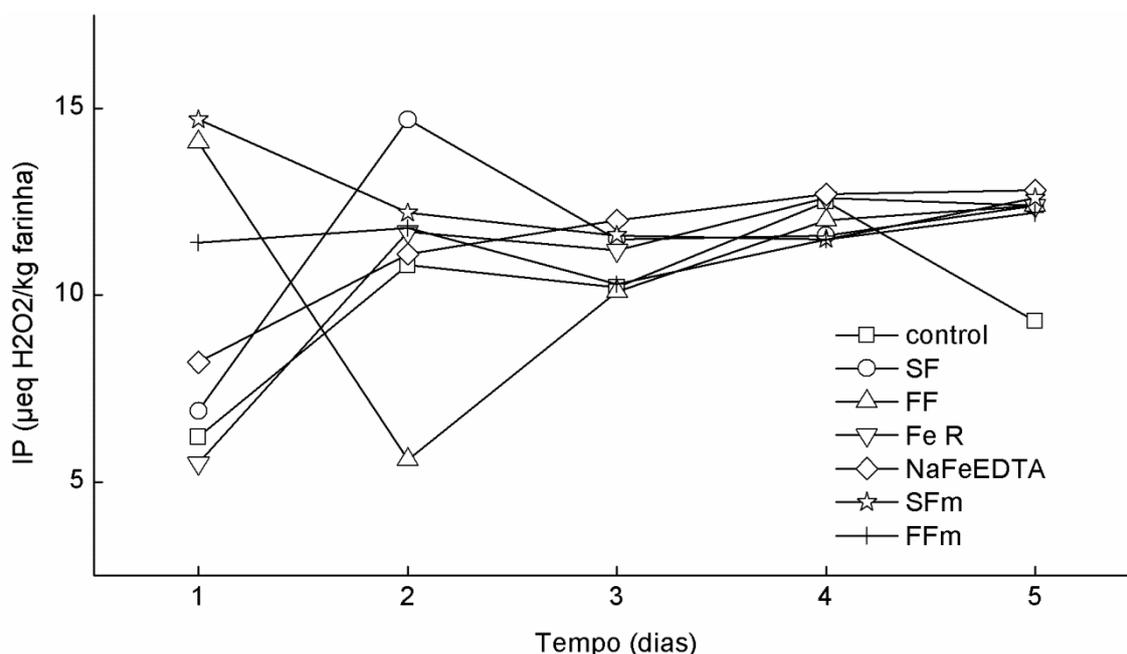
Então, em relação à avaliação da cor ao longo do tempo para cada amostra de farinha de trigo, é possível verificar que a amostra controle apresentou os menores valores de L^* nos primeiros dois meses (94,45), no tempo T3 ocorreu um aumento no valor de L^* (95,89) e nos tempos seguintes ocorreu uma leve redução no valor de L^* (95,23). O mesmo perfil de comportamento da amostra controle foi verificado com as demais amostras de farinha de trigo fortificada com os diferentes compostos de ferro para o parâmetro L^* . Em relação à coordenada a^* , não foi verificado diferença significativa ($p>0,05$) ao longo do tempo para nenhuma das amostras avaliadas. Para a coordenada b^* , a amostra controle não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) ao longo do tempo, ou seja, a coloração amarela permaneceu estável durante o período avaliado.

As amostras fortificadas com os diferentes compostos de ferro apresentaram redução no valor de b^* ao longo do tempo, ou seja, ocorreu diminuição da coloração amarela nestas amostras, principalmente nos dois últimos meses. Este parâmetro foi influenciado pela adição de ferro e pode estar associado à redução dos carotenoides livres, principalmente luteínas, naturalmente presente na farinha de trigo, durante o período de armazenamento, quando os diferentes compostos de ferro foram utilizados no processo de fortificação. Gutkoski et al. (2008) avaliaram o efeito da fortificação da farinha de trigo com ferro reduzido por um período de 180 dias e obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo, onde ocorreu aumento do parâmetro L^* e diminuição de b^* ao longo do período avaliado. Resultados semelhantes também foram reportados por Ortolan et al. (2008), com exceção ao parâmetro a^* que sofreu alteração no valor, durante o período avaliado.

De modo geral, uma modificação da coloração da farinha de trigo da cor creme para o branco é a principal alteração de cor que ocorre durante a estocagem (Ortolan et al., 2008) e se devem ao processo de maturação da farinha com o aumento do tempo de armazenamento e ocorrem pelas reações de oxidação das proteínas do glúten e dos carotenoides (Gutkoski et al., 2008). Porém o processo de fortificação influenciou este parâmetro de forma negativa uma vez que a amostra fortificada com SF foi a qual apresentou maiores alterações nos parâmetros L^* e b^* quando comparado à amostra controle.

Para a verificação da oxidação de lipídios em farinhas de trigo, a avaliação de índice de peróxido e o hexanal, foram avaliados. O índice de peróxido

(IP) é utilizado para avaliar a qualidade e/ou estabilidade da farinha de trigo, pois é oriundo de produtos primários da oxidação lipídica que podem diminuir a vida de prateleira, além do valor nutritivo do alimento (Silva & Silva, 1999). Os valores de IP da farinha de trigo refinada e fortificada com diferentes compostos de ferro durante a estocagem estão apresentados na Figura 3 ou Apêndice C.



Média (n=4). Control: farinha de trigo sem fortificação; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SFm: sulfato ferroso microencapsulado; FFm: fumarato ferroso microencapsulado. 1: T1 (início); 2: T2 (30 dias); 3: T3 (60 dias); 4: T4 (90 dias); 5: T5 (120 dias).

Figura 3. Índice de peróxido em farinha de trigo refinada e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante 120 dias de armazenamento.

No tempo inicial (T1) as amostras controle e fortificadas com SF e Fe R apresentaram os menores valores de IP e não diferiram entre si, já as amostras de farinha de trigo fortificada com FF, NaFeEDTA, SF micro e FF micro apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle e apresentaram os valores de IP mais elevados. No tempo T2 (30 dias), o controle apresentou diferença significativa das amostras SF e FF, sendo que a amostra fortificada com SF apresentou o maior valor de IP (0,0147 milieq. H_2O_2 /kg amostra). No tempo T3 (60 dias) a amostra controle apenas diferiu significativamente das amostras fortificadas com SF e NaFeEDTA. As amostras fortificadas com SF, SF micro e FF micro apresentaram diferença significativa em relação à amostra controle no tempo T4 (90

dias), e no tempo T5 (120 dias). Todas as amostras fortificadas com os diferentes compostos de ferro apresentaram diferença significativa em relação ao controle, ou seja, os compostos de ferro que foram adicionados à farinha de trigo quando comparadas ao controle influenciaram negativamente o parâmetro de IP avaliado.

Em relação ao IP avaliado durante o período de estocagem, é possível verificar que a amostra controle apresentou o maior valor de IP no tempo T4, enquanto que as amostras fortificadas com os diferentes compostos de ferro apresentaram os maiores valores para o IP em tempo inferior ao T4. Provavelmente, este parâmetro foi influenciado negativamente pelos compostos de ferro que foram adicionados as amostras de farinha de trigo. Existem estudos na literatura que associam que o processo de oxidação pode ser catalisado por uma variedade de pró-oxidantes como enzimas, exposição à luz e íons metálicos como o ferro (Ostdal et al., 2000). Os metais reativos decompõem peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos por via de ciclo redox. O Fe(II) decompõe hidrogênio muito mais rápido do que o Fe(III), além do que, o Fe(II) é mais solúvel do que o Fe(III), tornando-o mais disponível para promover a decomposição de hidroperóxidos em alimentos (Fennema, 2009).

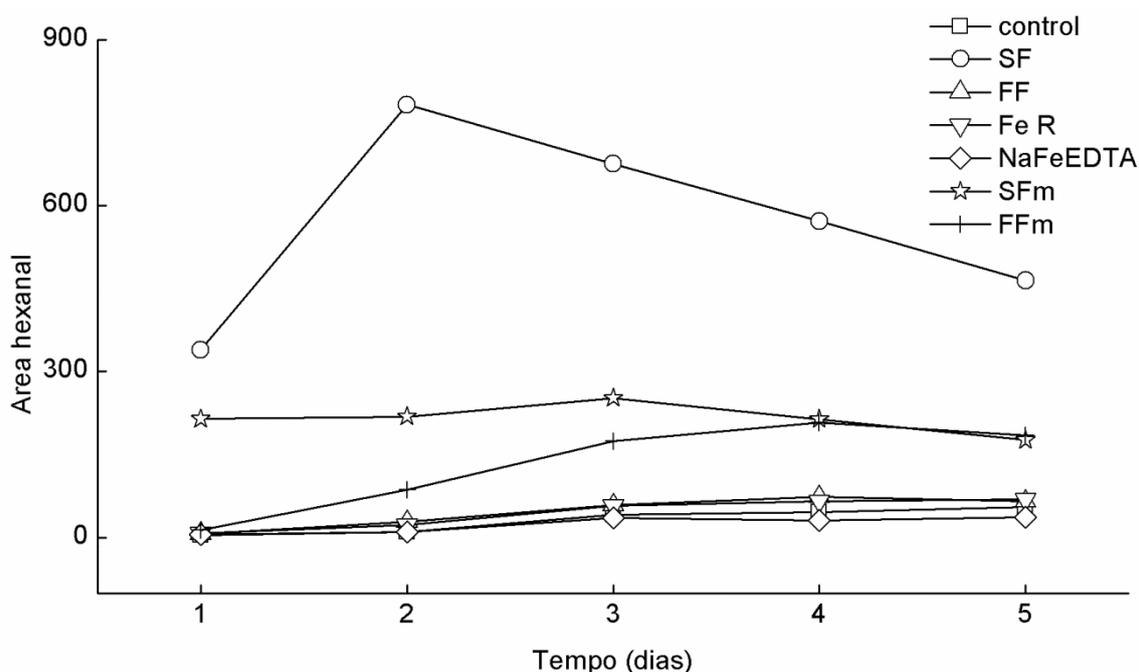
Jensen et al. (2011) avaliaram a estabilidade oxidativa de pão integral durante a estocagem (5 semanas), empregando vários marcadores de oxidação lipídica, inclusive IP. Os autores verificaram que o teor de hidroperóxidos oriundos da oxidação primária de lipídios foi maior no miolo do pão do que na crosta, e o armazenamento também teve efeito significativo sobre o IP, principalmente entre a segunda e terceira semana de estocagem.

Os compostos voláteis, hidrocarbonetos, cetonas, alcoóis, ácidos e aldeídos como hexanal, são produtos resultantes da decomposição dos produtos primários do processo oxidativo (peróxidos) e muitos destes compostos de degradação apresentam odor desagradável (Silva & Silva, 1999). Atualmente, a técnica de microextração em fase sólida (SPME) tem sido empregada para a extração e posterior análise de compostos voláteis, como hexanal, em farinhas de cereais (Cramer et al., 2005; Giannetti et al., 2014; Kaseleht et al., 2011). Os resultados tem sido expresso em área sob a curva dos compostos voláteis em análise (Bauer et al., 2013; Cramer et al., 2005).

Neste contexto, a avaliação de hexanal torna-se também um parâmetro importante para verificar a qualidade e/ou estabilidade da farinha de trigo. Os

resultados obtidos em área de hexanal nas farinhas de trigo refinada controle e fortificada com diferentes compostos de ferro durante o armazenamento estão apresentados na Figura 4 ou Apêndice D.

Inicialmente (T1), as amostras controle, FF, NaFeEDTA e Fe R foram as quais apresentaram os menores valores de área de hexanal e não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre si. As demais amostras fortificadas (SF, SF micro e FF micro), além de apresentarem resultados de áreas superiores, também diferiram significativamente ($p<0,05$) em relação à amostra controle. Após 30 dias de estocagem (T2), as farinhas de trigo fortificadas com SF, SF micro e FF micro foram as amostras que apresentaram os maiores valores de área de hexanal e diferiram significativamente das demais. Este mesmo comportamento foi verificado nos tempos T3, T4 e T5, para as amostras fortificadas com SF, SF micro e FF micro em relação ao controle.



Média (n=3). Área de hexanal* x 10⁴. Control: farinha de trigo sem fortificação; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF micro: fumarato ferroso microencapsulado. 1: T1 (início); 2: T2 (30dias); 3: T3 (60 dias); 4: T4 (90 dias); 5:T5 (120 dias).

Figura 4. Área de hexanal em farinha de trigo refinada e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante 120 dias de armazenamento.

Ao avaliar o processo de oxidação das farinhas ao longo do tempo, as amostras de farinha de trigo refinada controle e fortificadas com FF, Fe R e

NaFeEDTA apresentaram comportamento semelhantes em relação a área de hexanal até os 60 dias de armazenamento. No tempo inicial os valores de área foram menores que 10×10^4 , no tempo T2 ocorreu um aumento no valor de hexanal e entre os tempo T2 e T3 ocorreu o maior aumento de área, nos tempos T3 e T4 permanecem estáveis e no T5 os valores aumentam e apresentam os maiores valores de hexanal.

Já a amostra fortificada com SF apresentou comportamento diferente do relatado anteriormente. Esta amostra apresentou o maior valor de área do hexanal no tempo inicial em relação aos demais tratamentos, seguido de um aumento significativo de área já nos primeiros 30 dias de estocagem, após este período os valores obtidos apresentaram decréscimo ao longo do tempo, onde no tempo T5, o valor de área de hexanal foi de $4,64 \times 10^6$. As amostras fortificadas com SF micro apresentaram ligeiro aumento nos valores de hexanal até o tempo T3 porém sem diferença significativa, já as amostras fortificadas com FF micro um aumento significativo ocorreu até o T4 e no tempo T5 ocorreu um decréscimo no valor de hexanal em ambos os tratamentos.

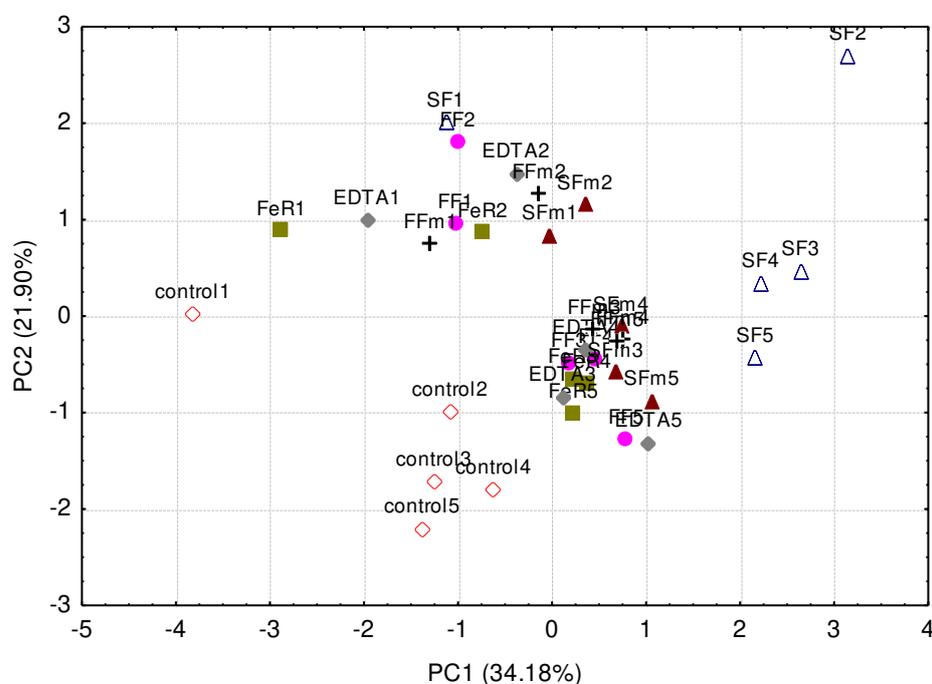
Miranda & El-Dash (2002) monitoraram a estabilidade de farinha de trigo integral (controle) e farinha de trigo integral germinado, sem fortificação, durante 6 meses e um dos parâmetros avaliados foi hexanal. Os autores verificaram que a amostra controle apresentou teores de hexanal já no início do estudo, após 3 meses de estocagem e no sexto mês os teores de hexanal aumentaram significativamente. Su-Chuen et al. (2007) avaliaram a estabilidade à oxidação lipídica em quinoa sob condições de envelhecimento acelerado e utilizaram alguns compostos como marcadores da oxidação, inclusive o hexanal, e verificaram que durante o período estudado os lipídeos presentes na quinoa não apresentaram alterações significativas.

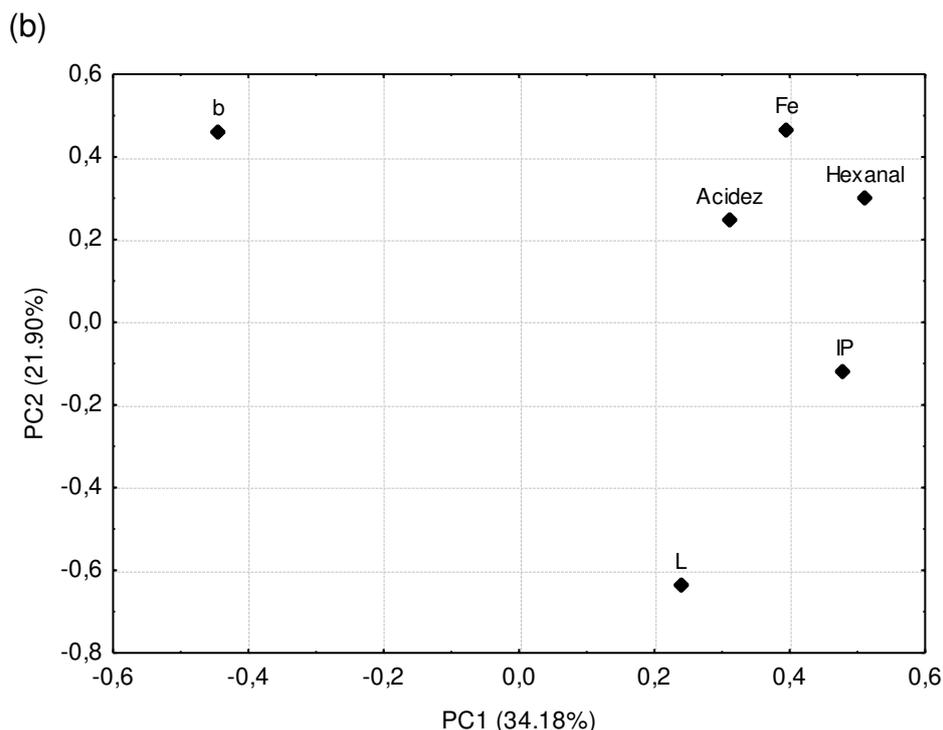
Menteş et al. (2008) verificaram que a estabilidade oxidativa de leites em pó fortificados com ferro, expresso pelo índice de TBA, foi influenciada pela adição do mineral. Os pesquisadores verificaram também que o ferro aminoácido quelato ocasionou menor oxidação de lipídeos, quando comparado ao sulfato ferroso. Nielsen & Hansen (2008) estudaram a estabilidade da vitamina E em farinha de trigo refinada e integral, obtidas por dois processos de moagem (rolos e pedra) e também investigaram a oxidação dos ácidos graxos insaturados pelo monitoramento de hexanal durante o armazenamento. Os autores verificaram que a farinha de trigo

obtida pela moagem em moinho de rolos apresentou formação de hexanal logo após a moagem, enquanto que a farinha obtida no moinho de pedra apresentou ausência de hexanal em um período de 22 dias, o que confirmou a função da vitamina E como um antioxidante eficaz presente no gérmen de trigo.

Com o intuito de verificar as correlações existentes entre as variáveis estudadas e as relações com os tratamentos de fortificação com os diferentes compostos de ferro aplicadas nas amostras de farinha de trigo, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA). Para isso, uma matriz de dados (6 variáveis \times 35 amostras) foi construída usando as variáveis teor de ferro, acidez titulável, coordenadas de cor L^* e b^* , índice de peróxido e hexanal (o parâmetro de cor a^* não foi empregado pois não apresentou diferença significativa entre as amostras), como coluna e as amostras como linhas. Três componentes principais foram utilizados para descrever 71,20% do total da variância. Os resultados obtidos na PCA para os parâmetros de qualidade e/ou estabilidade de farinha de trigo refinada fortificada com diferentes compostos de ferro estão apresentados na Figura 5, onde (a) descreve o gráfico de scores e (b) o gráfico de loading.

(a)





Control: farinha de trigo sem fortificação; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF micro: fumarato ferroso microencapsulado. 1: T1 (início); 2: T2 (30dias); 3: T3 (60 dias); 4: T4 (90 dias); 5: T5 (120 dias).

Figura 5. Análise de Componentes Principais para parâmetros de qualidade e/ou estabilidade de farinha de trigo refinada com diferentes compostos de ferro, (a) Gráfico de scores (amostras), (b) Gráfico de loading (variáveis).

As variáveis dominantes para a primeira componente principal (PC1) foram hexanal, IP (positivamente correlacionado) e a coordenada b^* (negativamente correlacionada), e estas variáveis descreveram 34,18% da variância total dos resultados. A segunda componente principal (PC2) foi responsável por descrever 21,90% do total da variância e as variáveis teor de ferro e coordenada b^* , positivamente correlacionados, e a coordenada L^* , negativamente correlacionada, foram as variáveis que mais contribuíram. Já a PC3 descreveu 15,12% do total da variância e a acidez titulável foi a variável que mais contribuiu para a variabilidade das amostras, positivamente correlacionada.

No gráfico de scores (a) é possível visualizar que ocorreu agrupamento entre as amostras e que houve diferença entre elas. As amostras controle estão do lado esquerdo do gráfico de scores o que significa que estas amostras contêm os menores valores de ferro, acidez, índice de peróxido, cor e hexanal. A amostra

fortificada com sulfato ferroso (SF2) foi a que apresentou os maiores valores de acidez, teor de ferro e hexanal, ou seja, o tempo de armazenamento para esta amostra é diretamente influenciada por estas variáveis e as amostras SF3, SF4, SF5 apresentaram os maiores valores de IP. É possível verificar também as amostras SF1, FF1, FF2, Fe R1, Fe R2, NaFeEDTA1, NaFeEDTA2, SF micro1, SF micro2, FF micro1, FF micro2, foram as quais apresentaram os maiores valores de b^* , que está relacionada a maior coloração amarela.

4. CONCLUSÃO

A fortificação da farinha de trigo com diferentes compostos de ferro promoveu alterações nos parâmetros de qualidade e/ou estabilidade estudados. A acidez aumentou ao longo do período avaliado para todas as amostras e os compostos de ferro SF, FF e NaFeEDTA apresentaram os maiores valores iniciais e após 30 dias de estocagem.

Na avaliação da cor, os parâmetros L^* e b^* foram influenciados pelos compostos de ferro utilizados na fortificação, principalmente pela forma sulfato ferroso, provavelmente relacionado a degradação dos carotenoides presentes na farinha e afetando a qualidade da mesma.

Os parâmetros IP e hexanal foram afetados quando os diferentes compostos de ferro foram utilizados. O composto SF apresentou o maior valor de IP, no segundo mês de análise, e os compostos SF, SF micro e FF micro apresentaram os maiores valores de hexanal.

Os compostos de Fe que promoveram as menores alterações nas propriedades de qualidade e/ou estabilidade das farinhas avaliadas durante a estocagem foram o Fe R e o NaFeEDTA. Estes compostos portanto, apresentaram os melhores parâmetros para serem utilizados no processo de fortificação de farinha de trigo durante a estocagem.

CAPÍTULO 5

FORTIFICAÇÃO DE FARINHA DE TRIGO INTEGRAL COM DIFERENTES COMPOSTOS DE FERRO: EFEITOS NA ESTABILIDADE DURANTE A ESTOCAGEM.

CAPÍTULO 5: FORTIFICAÇÃO DE FARINHA DE TRIGO INTEGRAL COM DIFERENTES COMPOSTOS DE FERRO: EFEITOS NA ESTABILIDADE DURANTE A ESTOCAGEM.

Ana Paula Rebellato¹, Juliana Azevedo Lima Pallone¹.

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

RESUMO

A farinha de trigo integral apresenta conteúdo maior de nutrientes em relação a refinada, incluindo a fração lipídica, fazendo-se necessária a caracterização das alterações que podem ocorrer durante sua estocagem quando fortificada com diferentes compostos de ferro. Devido ao efeito pró-oxidante do ferro pode ocorrer oxidação lipídica e afetar a qualidade do produto. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito da fortificação de farinha de trigo integral com diferentes compostos de ferro sulfato ferroso (SF), fumarato ferroso (FF), ferro reduzido (FeR), sódio ferro etilenodiaminotetracético (NaFeEDTA), sulfato ferroso microencapsulado (SF micro) e fumarato ferroso microencapsulado (FF micro), em parâmetros de qualidade e/ou estabilidade, tais como acidez titulável, cor, índice de peróxido e hexanal durante 120 dias de armazenamento. Foi detectado um teor de ferro de 1,38 mg/100 g na farinha integral não fortificada (controle) e após o processo de fortificação os teores variaram de 4,80 a 6,29 mg/100 g. A fortificação de farinha de trigo integral com diferentes compostos de ferro mostrou alteração nas propriedades avaliadas durante a estocagem com exceção ao parâmetro de cor. Os compostos SF e FF micro apresentaram os maiores valores de IP em 30 dias de estocagem, 15,7 e 16,5 $\mu\text{eqH}_2\text{O}_2/\text{kg}$ respectivamente, quando comparado ao controle. Já as farinhas fortificadas com SF ($320,49 \times 10^4$) após 30 dias e SF micro ($211,66 \times 10^4$) após 90 dias foram as que apresentaram os maiores valores de hexanal, ambos relacionados com a oxidação lipídica. Já as farinhas fortificadas com Fe R e NaFeEDTA foram as que menos sofreram alteração em relação aos parâmetros de qualidade avaliados. Portanto, os diferentes compostos de ferro quando empregados na fortificação de farinha de trigo integral podem influenciar de forma diferenciada a estabilidade do produto durante a estocagem.

Key words: Degradação, qualidade, cromatografia gasosa, hexanal.

1. INTRODUÇÃO

Durante o processo de moagem do trigo ocorre a separação da farinha refinada da fração composta por gérmen e farelo, que contém a maior parte dos nutrientes, como: vitaminas, aminoácidos, antioxidantes, minerais (ferro, zinco, cálcio, magnésio, fósforo, potássio), além de elevado teor de fibras (Buri et al., 2004; Zhu et al., 2009). Atualmente, é crescente a demanda por produtos integrais, devido à presença destes nutrientes e aos benefícios que proporcionam à saúde.

A farinha de trigo apresenta em sua composição, 70 a 75% de carboidratos, 12 a 14% de água, 8 a 16% de proteínas, 1 a 2% de lipídios, 1% de cinzas, além de vitaminas e minerais. A fração lipídica é composta por aproximadamente 51% de lipídeos não polares ou neutros (triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres, entre outros) e 49% por lipídeos polares (glicolipídeos e fosfolipídeos), sua estabilidade pode ser afetada pela composição de ácidos graxos (palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1c), linoléico (C18:2), linolênico (C18:3) e eicosenoico (C20:1) (Cramer et al., 2005). Variações na quantidade e composição dos constituintes da farinha de trigo integral podem ocorrer em função das diferentes proporções de farelo e/ou gérmen que podem ser reincorporados a farinha de trigo refinada (Gutkoski et al., 2008; Morita et al., 2002; Rutz, 2012).

Na Legislação Brasileira não é estabelecido a proporção mínima necessária de farelo e/ou gérmen que pode ser reincorporado a farinha de trigo refinada para ser rotulada como farinha integral (Brasil, 2005b). Segundo Pomeranz et al. (1977) a adição de aproximadamente 7% de farelo de trigo a farinha refinada, não causa alterações significativas nas propriedades farinográficas e na qualidade tecnológica dos pães, como variação do volume e cor.

Atualmente toda farinha de trigo deve ser fortificada com ferro com o intuito de reduzir a prevalência de anemia ferropriva, causada pela baixa ingestão de ferro biodisponível proveniente da dieta alimentar (Brasil, 2002; WHO, 2006). No Brasil, a Legislação permite a adição de diferentes compostos de ferro como: sulfato ferroso desidratado (seco), fumarato ferroso, ferro reduzido, ferro eletrolítico, sódio ferro etilenodiaminotetracético (NaFeEDTA), ferro bisglicina quelato e outros compostos de biodisponibilidade não inferior à dos já permitidos (BRASIL, 2002). Pirofosfato férrico e sulfato ferroso microencapsulado também estão sendo

empregados como fortificantes em farinha de trigo (Kiskini et al., 2010; Nabeshima et al., 2005).

Durante o processo de fortificação, alguns parâmetros devem ser levados em consideração para que não afete a qualidade da matéria-prima nem do produto final como, cor, reologia, capacidade de absorção no organismo, além do efeito pró-oxidante de metais, como o ferro, sobre a oxidação lipídica (Akhtar et al., 2011; WHO, 2006).

A cor pode ser alterada pela quantidade de farelo reincorporada a farinha integral, pela presença de material estranho, adição de ferro e da quantidade de pigmentos oriundos do trigo. Além disso, é considerado um fator importante para a aceitação ou rejeição do produto para o consumo (Akhtar et al., 2011; Rutz, 2012).

Alterações nutricionais em farinhas de trigo podem ocorrer naturalmente durante a estocagem (Rehman, 2006). O parâmetro de acidez pode ser utilizado como indicador de qualidade durante o armazenamento, tanto dos grãos, quanto da farinha de trigo (Rutz, 2012). Os lipídios presentes na farinha de trigo, mesmo que em pequenas quantidades, são os responsáveis pelos processos de hidrólise e oxidação. A hidrólise ocorre por mecanismo enzimático, através das lípases. Esta reação pode causar modificações na qualidade da farinha de trigo comprometendo a cor, sabor, além de degradar vitaminas, aminoácidos e ácidos graxos essenciais (Ortolan et al., 2008; Rutz, 2012).

O índice de peróxido (IP) também é um parâmetro utilizado para avaliar a qualidade e/ou estabilidade da farinha de trigo, pois é oriundo de produtos primários da oxidação lipídica, pode diminuir a vida de prateleira e o valor nutritivo do alimento (Silva & Silva, 1999). Os compostos voláteis, hidrocarbonetos, cetonas, alcoóis, ácidos e aldeídos como hexanal, são produtos resultantes da decomposição dos produtos primários do processo oxidativo (peróxidos) e muitos destes compostos de degradação apresentam odor desagradável (Silva & Silva, 1999).

O processo de oxidação ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação. As reações iniciais da oxidação lipídica podem ser promovidas por absorção de energia e por reação redox. As reações redox são catalisadas por metais de transição, como cobre, manganês e ferro (reações de Fenton/Harber-Weiss) e são capazes de romper a barreira eletroquímica entre o oxigênio e as moléculas de ácidos graxos insaturados presente no alimento promovendo a iniciação do processo oxidativo (Ferrari, 1998). Uma vez que as farinhas integrais

apresentam maiores quantidades de lipídios e são fortificados com diferentes compostos de ferro, o acompanhamento da qualidade e/ou estabilidade durante o armazenamento torna-se necessário, a fim de verificar possíveis alterações que possam ocorrer.

A avaliação de hexanal, resultante da oxidação lipídica, também é utilizada para avaliar a qualidade e/ou estabilidade da farinha de trigo. Atualmente, a técnica de microextração em fase sólida (SPME) tem sido bem empregada para a extração e posterior análise dos compostos voláteis, como hexanal, em farinhas de cereais (Cramer et al., 2005; Giannetti et al., 2014; Kaseleht et al., 2011) e os resultados têm sido expresso em área sob a curva dos compostos voláteis em análise (Bauer et al., 2013; Cramer et al., 2005).

Estudos que abordam os parâmetros de qualidade e/ou estabilidade de farinha de trigo integral fortificada com diferentes compostos de ferro durante a estocagem não foram encontrados. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da fortificação de farinha de trigo integral com diferentes compostos de ferro em relação aos parâmetros de qualidade e/ou estabilidade como, cor, acidez, índice de peróxido e hexanal durante o período de estocagem de 120 dias. Para verificar quais variáveis apresentaram maior influência sobre a qualidade e/ou estabilidade da farinha de trigo integral fortificada com diferentes compostos de ferro, uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo das amostras e delineamento experimental

Para a obtenção da farinha de trigo integral (100 kg), 6% de farelo de trigo foi incorporado a farinha de trigo refinada (94%), (Moinho Guaçu Mirim, Mogi Guaçu, Brasil), e sua composição foi de: $13,22 \pm 0,11$; $12,95 \pm 0,42$; $1,29 \pm 0,01$; $0,80 \pm 0,02$; $6,91 \pm 0,31$ e 84,95% de umidade, proteínas, lipídios, cinzas, fibras e carboidratos totais, respectivamente. Posteriormente porções de 10 kg foram fortificadas com 4,2 mg/100 g ($\pm 20\%$), conforme Resolução Normativa, 344 (Brasil, 2002), com diferentes compostos de ferro, totalizando 6 amostras e um controle (sem adição de ferro). Os compostos de ferro utilizados foram: sulfato ferroso monohidratado (SF), fumarato ferroso (FF), ferro reduzido (Nutrafine, RS, Brasil) (Fe R), (M Cassab, SP, Brasil); sódio ferro etilenodiaminotetracético (NaFeEDTA), (Vogler Ingredients, SP,

Brasil); sulfato ferroso microencapsulado (SF micro) e fumarato ferroso microencapsulado (FF micro), (Funcional Mikron, Valinhos, Brasil). No processo de fortificação, cada amostra foi homogeneizada em misturador em V (Tecnal, Piracicaba, Brasil), por 30 min, em porções de 5,0 kg. Porções de 1,0 kg foram acondicionadas em embalagem plástica e estocadas a temperatura ambiente, para simulação da vida de prateleira.

Após a adição dos diferentes compostos de ferro na farinha de trigo integral as amostras controle e as fortificadas foram avaliadas quanto aos parâmetros de acidez titulável, cor, índice de peróxido e hexanal, no tempo inicial (T1) logo após a obtenção das farinhas fortificadas. O teor de ferro foi avaliado antes e após o processo de fortificação nas amostras de farinha de trigo integral. Após este período, as amostras foram mantidas em embalagens fechadas, a temperatura ambiente e mensalmente uma embalagem de cada amostra foi aberta e analisada quanto aos parâmetros de acidez titulável, cor, índice de peróxido e hexanal para o acompanhamento da vida de prateleira, durante 120 dias e os tempos foram designados por T2 (30 dias), T3 (60 dias), T4 (90 dias) e T5 (120 dias).

2.2 Análises físico-químicas

Todas as análises foram realizadas em três repetições em cada ponto de armazenamento.

Determinação do teor de ferro: O teor de ferro total foi determinado de acordo com Rebellato et al. (2015).

Análise de cor: A determinação da cor foi realizada através dos parâmetros de luminosidade L^* (variam entre zero = preto e 100 = branco) e coordenadas de cromaticidade a^* ($-a^*$ = verde e $+a^*$ = vermelho) e b^* ($-b^*$ = azul e $+b^*$ = amarelo) através de espectrofotômetro MiniScan (Hunterlab, Reston, Estados Unidos), seguindo o sistema CIELab (MINOLTA, 1993).

Parâmetros de oxidação lipídica: A acidez titulável foi realizada segundo método descrito por Pizzinatto (1997) e o índice de peróxido segundo Jensen et al. (2011).

Análise de hexanal:

As amostras foram retiradas do ultrafreezer e homogeneizadas na própria embalagem, 5 g das amostras de farinha foram retiradas, e condicionadas em

frascos de vidro âmbar de 20 mL fechados com tampas de silicone revestido com PTFE. Os compostos voláteis foram extraídos do *headspace* das amostras utilizando a técnica de microextração em fase sólida (HS-SPME). A fibra de SPME de revestimento Carboxen/polidimetilsiloxano (Car/PDMS) (75 μm \times 10 mm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) foi utilizada na extração. A fibra foi previamente condicionada seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Os frascos contendo as amostras foram submetidos à extração por 40 min, em banho-maria a 40 °C. Antes da extração, cada frasco contendo as amostras foi submetido a um tempo de pré-equilíbrio na mesma temperatura de extração, sem exposição da fibra por 10 min. Após o término da extração, a fibra foi removida e inserida no injetor do cromatógrafo para dessorção térmica dos analitos.

Análise cromatográfica:

Após a extração, os compostos voláteis foram quantificados por cromatógrafo de fase gasosa Varian Star 3400CX (CA, EUA) equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID). A fibra foi dessorvida termicamente na porta de injeção a temperatura de 250 °C durante 10 min, em modo de *splitless* durante 2 min. Os compostos foram separados numa coluna capilar polar de sílica fundida ZB-WAX Plus (60 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a pressão constante (30 psi). A temperatura inicial da coluna foi ajustada para 35 °C e mantida durante 10 min. Em seguida, um gradiente de temperatura foi iniciado subindo a 3 °C/min até 50 °C, seguido por aumento a 4 °C/min até 150 °C, aumentando 10 °C/min até 210 °C e mantida em condições isotérmicas durante 5 min. A temperatura do detector foi mantida a 230 °C. Uma série de n-alcenos homólogos foram analisados sob as mesmas condições cromatográficas para calcular o índice de retenção linear (LRI).

A análise qualitativa de voláteis foi efetuada por cromatógrafo à gás Shimadzu QP2010 Plus acoplado a espectrômetro de massas (GC/MS, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). Para estas análises, foram usadas as mesmas condições cromatográficas acima descritas e hélio foi utilizado como o gás de arraste. O detector foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons com uma energia de ionização de 70 eV e um intervalo de digitalização de massas 35-350 m/z. Os analitos foram identificados com base na comparação com os espectros de massas

disponível na biblioteca National Institute of Standards and Technology (NIST) e por comparação do LRI calculado com aqueles disponíveis na literatura científica.

2.3 Análises dos dados

Os resultados obtidos, nos diferentes parâmetros avaliados, para as diferentes amostras de farinha de trigo integral controle e fortificada com os diferentes compostos de ferro, foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$) para a comparação das médias entre as amostras e entre os tempos avaliados, utilizando o programa Statistica 7.0 (StatSoft, EUA). Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA), através do programa Pirouette 3.11 (Infometrix, Inc., Bothell, WA), para isso, os dados foram autoescalados, pois os resultados obtidos apresentaram diferença nos valores em ordem de grandeza.

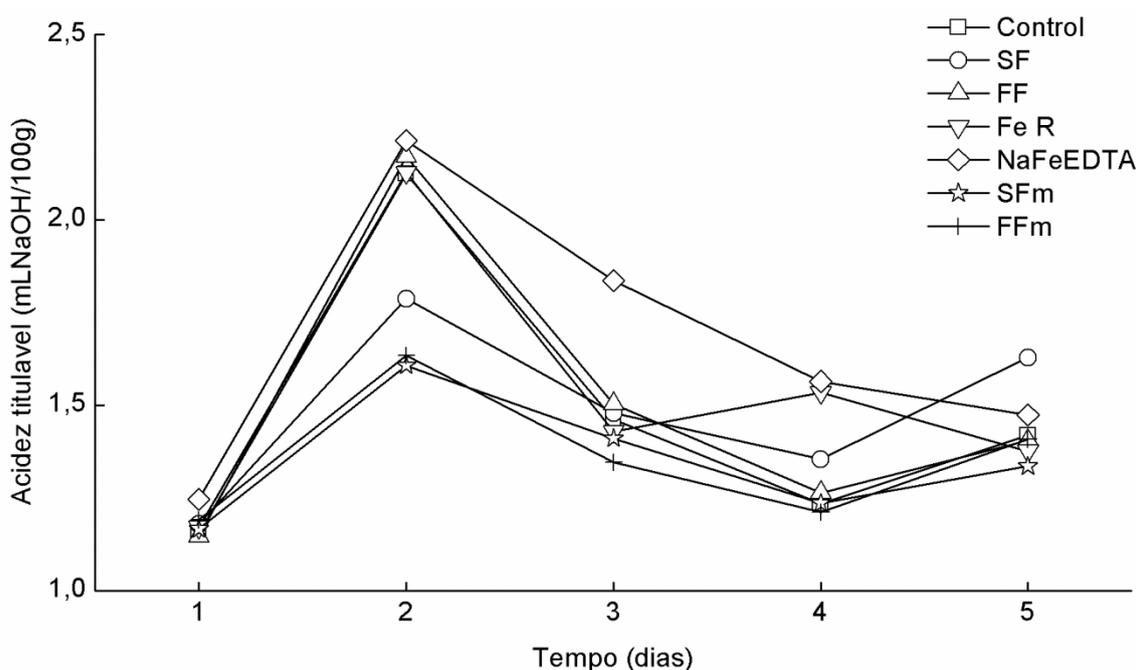
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de ferro presente originalmente na amostra controle foi de 1,38 mg/100 g. Após o processo de fortificação os valores foram $5,39 \pm 0,08$; $5,64 \pm 0,11$; $4,80 \pm 0,12$; $5,74 \pm 0,25$; $6,29 \pm 0,22$ e $5,23 \pm 0,09$ mg/100 g, para as amostras fortificadas com SF, FF, Fe R, NaFeEDTA, SF micro e FF micro, respectivamente. Os valores obtidos de ferro estão de acordo com a Resolução Normativa 344 (Brasil, 2002) e coincide com os valores reportados por Rehman et al. (2006).

Os resultados obtidos para a acidez titulável em farinha de trigo integral e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante o armazenamento, estão apresentados da Figura 1 (para visualização dos resultados, incluindo o tratamento estatístico, a Tabela 1 encontra-se no Apêndice E).

No tempo inicial (T1), os valores de acidez variaram de 1,15 a 1,25 mL de NaOH/100 g e a amostra controle somente apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) da amostra fortificada com NaFeEDTA. Após 30 dias de estocagem (T2) os valores de acidez variaram de 1,61 a 2,21 mL/100 g e a amostra controle não apresentou diferença significativa das amostras fortificadas com FF e Fe R. No tempo T3, os valores variaram de 1,35 a 1,84 mL/100 g e a amostra controle apresentou diferença significativa das amostras fortificadas com NaFeEDTA e FF micro. Aos 90 dias de estocagem (T4), os valores de acidez variaram de 1,21 a 1,57 mL/100 g e a amostra controle apresentou diferença significativa das amostras

fortificadas com SF, Fe R e NaFeEDTA. No tempo T5, os valores variaram de 1,34 a 1,63 mL/100 g e o controle somente apresentou diferença significativa da farinha integral fortificada com SF. Verifica-se portanto, que o parâmetro de acidez foi ligeiramente afetado quando os diferentes compostos de ferro, principalmente o NaFeEDTA, foram empregados no processo de fortificação, o que alterou negativamente a qualidade da farinha, quando comparados ao controle.



Média (n=3). Control: farinha de trigo integral sem fortificação; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SFm: sulfato ferroso microencapsulado; FFm: fumarato ferroso microencapsulado. 1: T1 (início); 2: T2 (30dias); 3: T3 (60 dias); 4: T4 (90 dias); 5: T5 (120 dias).

Figura 1. Valores de acidez titulável em farinha de trigo integral e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante 120 dias de armazenamento.

Em relação à influência da acidez titulável ao longo do tempo para cada amostra, é possível verificar que as amostras apresentaram o mesmo comportamento, no T1 as amostras apresentaram um menor valor de acidez, no T2 foi o período que as amostras apresentaram o maior valor de acidez, nos tempos T3 e T4 ocorreu uma diminuição nos valores avaliados e no T5, um ligeiro aumento no valor de acidez foi verificado para a maioria das amostras.

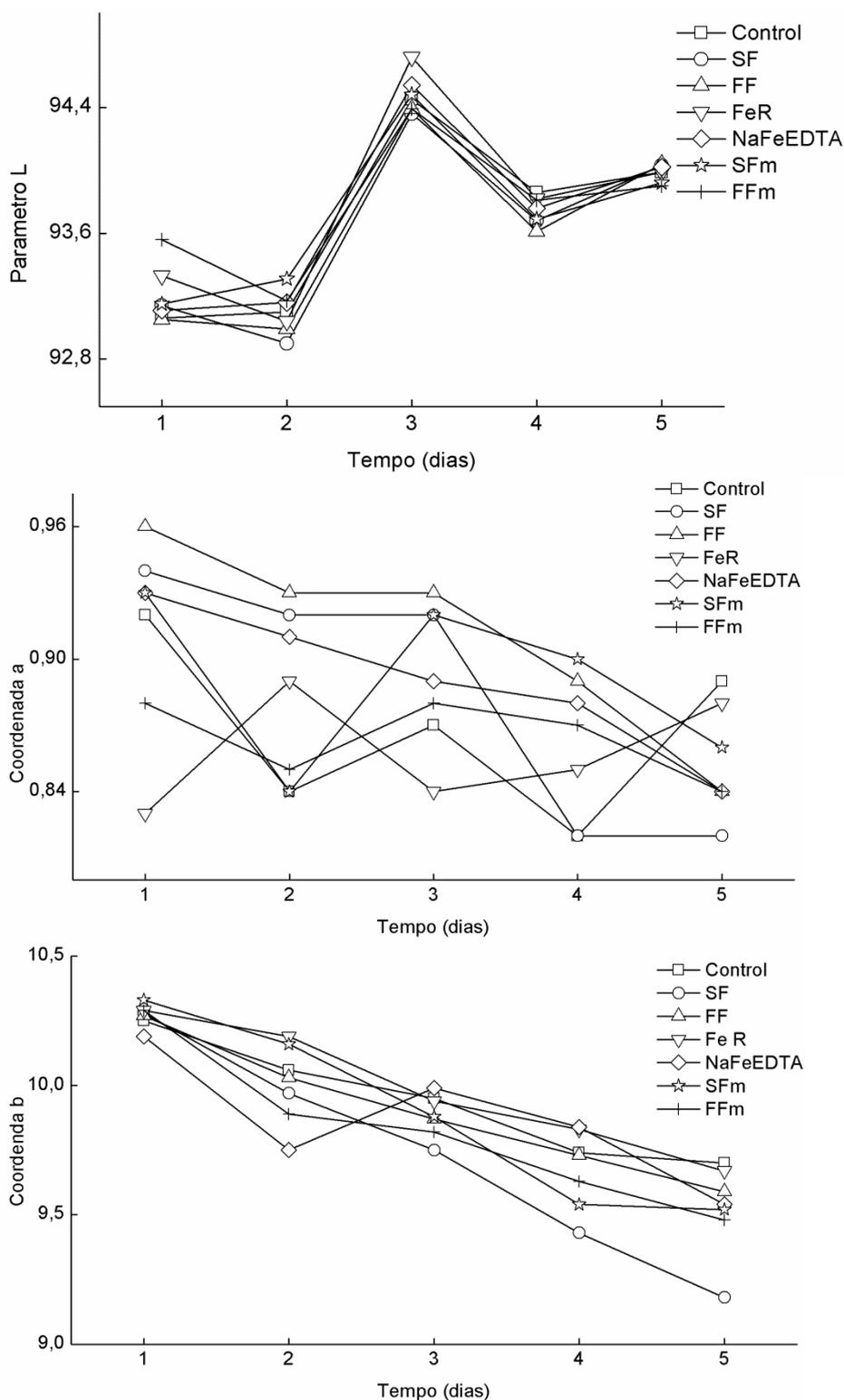
Rehman (2006) avaliou os efeitos do armazenamento na qualidade nutricional de cereais. Os autores verificaram que os valores de acidez em trigo variaram de 2,85 a 4,00 mg NaOH/100 g, durante a estocagem de 6 meses. Miranda

& El-Dash (2002) realizaram um estudo de acompanhamento da estabilidade de farinha de trigo integral germinado durante 6 meses de armazenamento e verificaram que os valores de acidez aumentaram durante o período avaliado, tanto na amostra controle quanto nas amostras germinadas, e atribuíram essa ocorrência a fenômenos de hidrólise gradual de lipídios.

O aumento da acidez, ocasionada pela quebra hidrolítica das gorduras e a formação de ácidos graxos livres durante a estocagem, está relacionado ao estágio inicial da perda de qualidade das farinhas. A rancidez hidrolítica na farinha ocorre durante o armazenamento, especialmente em condições inapropriadas, em operações de processamento e no produto final (Araújo, 2004; Pomeranz, 1974). A reação que ocorre se inicia pela presença da lipase, a qual está presente na camada mais externa do grão, com a moagem do grão de trigo em farinha, a lipase é liberada e atua sob a ligação éster entre lipídios e glicerol, liberando ácidos graxos e em menor quantidade da oxidação dos ácidos graxos insaturados para formar produtos de degradação ácidos, acarretando a deterioração da farinha de trigo durante o armazenamento (Mousia et al., 2004).

Em relação aos parâmetros de cor, L^* , a^* e b^* foram avaliados nas amostras de farinha de trigo integral e fortificados com os diferentes compostos de ferro e estão apresentados na Figura 2 (Apêndice F).

Os valores de L^* , a^* e b^* , entre as amostras nos períodos T1, T2, T3, T4 e T5 foram avaliados e não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$) entre a amostra controle e as amostras fortificadas com os diferentes compostos de ferro, ou seja, independentemente da forma de ferro empregada na fortificação da farinha de trigo integral não foram verificadas alterações nos parâmetros de cor. O farelo de trigo utilizado no preparo da farinha integral apresenta coloração escura e a presença do ferro, também de coloração escura, tornou-se imperceptível (Alam et al., 2009).



Média (n=3). Control: farinha de trigo integral sem fortificação; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SFm: sulfato ferroso microencapsulado; FFm: fumarato ferroso microencapsulado. 1: T1 (início); 2: T2 (30dias); 3: T3 (60 dias); 4: T4 (90 dias); 5: T5 (120 dias).

Figura 2. Valores dos parâmetros de cor: luminosidade L^* e das coordenadas a^* e b^* em farinha de trigo integral e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante 120 dias de armazenamento.

Quanto à avaliação da cor ao longo do tempo para cada amostra, é possível verificar que as farinhas apresentaram um mesmo comportamento para o parâmetro L^* . Nos tempos T1 e T2 os valores não sofreram alteração, com exceção da amostra fortificada com FF micro que apresentou uma diminuição no parâmetro L^* no tempo T2. No tempo T3, todas as amostras apresentaram o maior valor de L^* , e uma ligeira diminuição foi verificada no tempo T4 e o T5 não sofreu alteração. Em relação à coordenada a^* , não foi verificado diferença significativa ($p>0,05$) ao longo do tempo para nenhuma das amostras avaliadas. Para a coordenada b^* , as amostras controle, SF e Fe R apresentaram o mesmo comportamento ao longo do tempo, ou seja, a coloração amarela permaneceu estável até o tempo T3 e ocorreu uma diminuição da coloração amarela no tempo T4, o qual não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) do tempo T5. A farinha fortificada com FF somente apresentou alteração de cor no tempo T5. Já as farinhas fortificadas com SF micro e FF micro apresentaram diminuição da coloração amarela nos tempos T3 e T2, respectivamente, alterações nos demais tempos não foram verificadas.

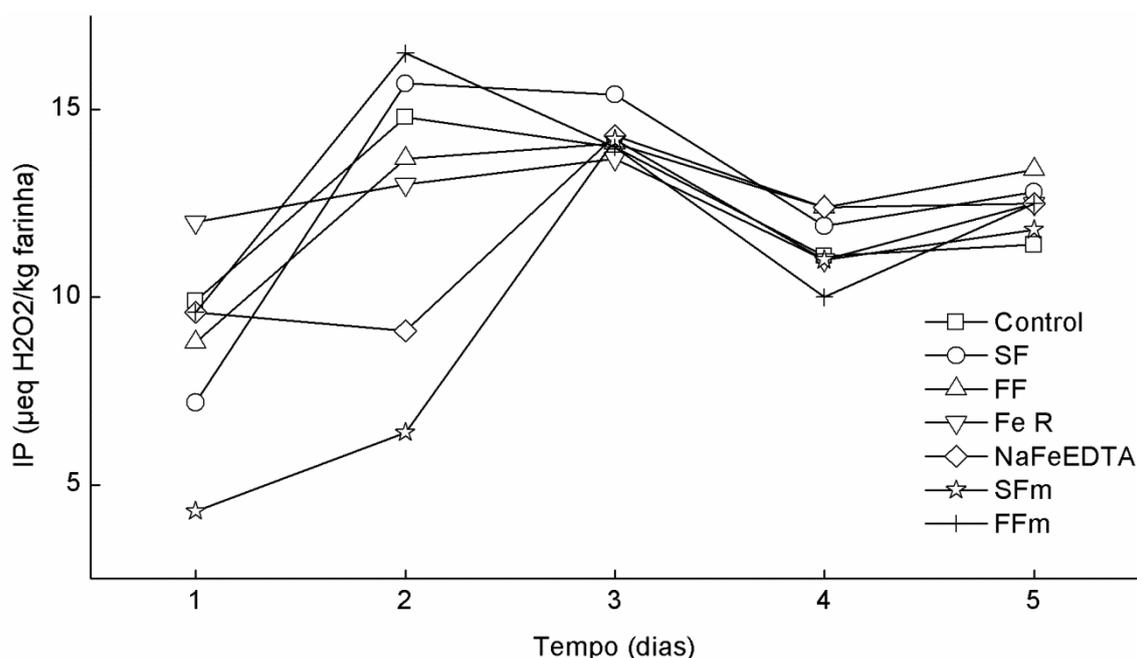
Os parâmetros L^* e b^* foram influenciados pelo tempo durante o período avaliado que pode estar associado à redução dos carotenóides livres, principalmente as luteínas, naturalmente presente na farinha de trigo. Gutkoski et al. (2008) avaliaram o efeito da fortificação de farinha de trigo com ferro reduzido por um período de 180 dias e obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo, onde ocorreu aumento do parâmetro L^* e diminuição de b^* ao longo do período avaliado. Alam et al. (2009) também verificaram alterações de cor em farinha de trigo integral fortificada com Fe^{2+} .

De forma geral, pode ocorrer uma alteração da coloração da farinha de trigo pode ocorrer durante a estocagem (Ortolan et al., 2008), devido ao processo de maturação com o aumento do tempo de armazenamento e pelas reações de oxidação das proteínas do glúten e dos pigmentos carotenóides (Gutkoski et al., 2008).

Os valores de IP avaliados durante os 120 dias de estocagem nas farinhas de trigo integral controle e fortificados com diferentes compostos de ferro estão apresentados na Figura 3 (Apêndice G).

No tempo T1 a amostra não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) das amostras fortificadas com FF, NaFeEDTA e FF micro e a farinha fortificada com ferro reduzido apresentou o maior valor de IP. Após 30 dias de estocagem, a

amostra controle somente diferiu das amostras fortificadas com NaFeEDTA e SF micro. No tempo T3, somente a farinha fortificada com SF apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. No tempo T4, o IP da farinha controle apresentou diferença significativa das amostras fortificadas com FF e NaFeEDTA e no tempo T5, somente as amostras fortificadas com NaFeEDTA e SF micro não apresentaram diferença significativa em relação a amostra controle.



Média (n=4). Control: farinha de trigo integral sem fortificação; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SFm: sulfato ferroso microencapsulado; FFm: fumarato ferroso microencapsulado. 1: T1 (início); 2: T2 (30 dias); 3: T3 (60 dias); 4: T4 (90 dias); 5: T5 (120 dias).

Figura 3. Índice de peróxido em farinha de trigo integral e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante 120 dias de armazenamento.

Em relação à avaliação ao longo do tempo para cada amostra, o IP para as amostras controle e fortificadas com SF e FF apresentaram o mesmo comportamento, ou seja, os maiores valores de IP foram verificados no T2, permaneceram estáveis no T3, diminuiu no T4 e continuaram estáveis em T5. As amostras fortificadas com Fe R, NaFeEDTA e SF micro apresentaram os maiores valores de IP no tempo de T3, enquanto que a farinha integral fortificada com FF micro apresentou o maior valor de IP no período T2.

Poucos estudos foram encontrados na literatura sobre a estabilidade oxidativa de farinha de trigo integral fortificada com diferentes compostos de ferro

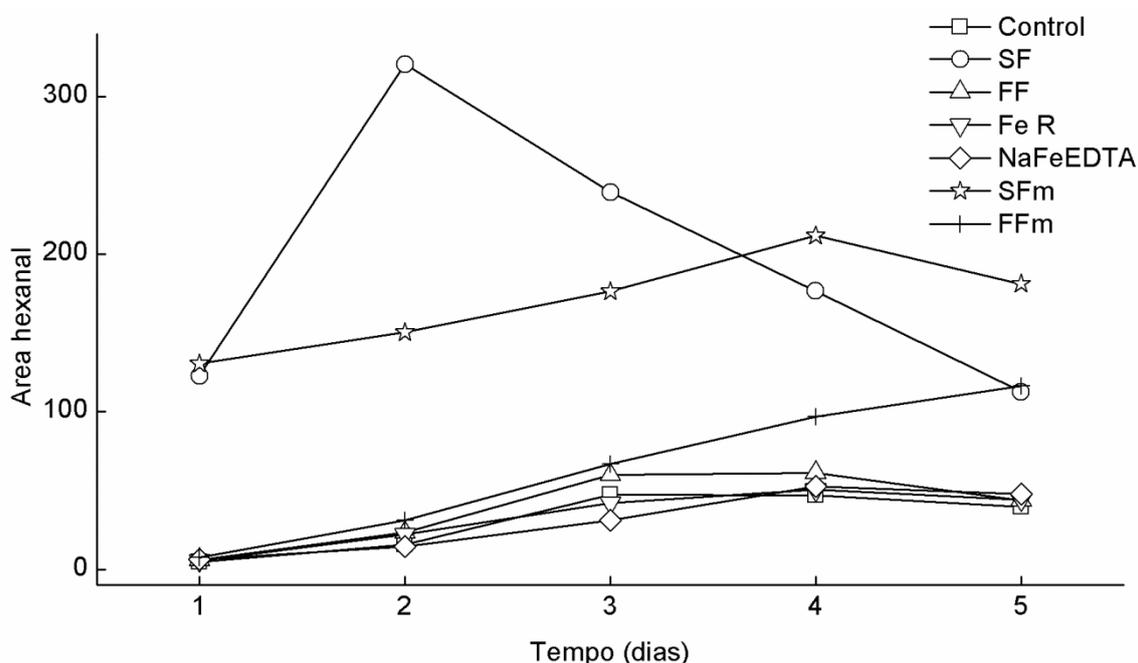
durante a estocagem, o que torna difícil a comparação dos resultados, porém, Hurrell et al. (2010) publicaram recomendações para a fortificação de farinha de trigo com ferro e discutem que o composto NaFeEDTA deve ser empregado pois não promove a oxidação em farinhas durante a estocagem. Já o ferro eletrolítico é pouco solúvel, porém não promove alteração sensorial no alimento. O composto fumarato ferroso deve apresentar menor impacto na avaliação sensorial quando comparado ao sulfato ferroso, e os compostos encapsulados devem prevenir a oxidação lipídica das farinhas durante a estocagem. Neste trabalho constatou-se que o NaFeEDTA promoveu menores alterações na estabilidade, porém alterações nos parâmetros de acidez, IP e hexanal foram observadas quando comparado ao controle. Além disso, os compostos microencapsulados estudados também promoveram alterações nos parâmetros estudados.

Rehman et al. (2006) avaliaram a estabilidade de Fe^{2+} em farinha de trigo integral fortificada (FeSO_4 , EDTA e ácido fólico) durante 42 dias de estocagem. Os autores verificaram que as amostras não apresentaram diferença significativa em relação ao teor de ferro total, porém, uma conversão de Fe^{2+} a Fe^{3+} foi observada decorrente a oxidação ocorrida durante o período de estocagem. Alam et al. (2009) estudaram a estabilidade de farinha de trigo integral adicionada de FeSO_4 , EDTA e ácido fólico durante 60 dias de estocagem e verificaram diminuição do Fe^{2+} e aumento do Fe^{3+} durante o período avaliado devido a oxidação do ferro.

Chung (2009) estudou a influência da adição de farinha de batata doce roxa sobre a estabilidade oxidativa de cookies, durante 80 dias a 60 °C e observou que tanto os valores de acidez quanto de peróxido aumentaram durante o período de armazenamento. Jensen et al. (2011) acompanharam a estabilidade de pão integral durante cinco semanas de estocagem e utilizaram vários marcadores de oxidação lipídica, inclusive IP. Os autores verificaram que o teor de hidroperóxidos oriundos da oxidação primária de lipídios foi maior no miolo do pão do que na crosta, e o armazenamento também apresentou efeito significativo sobre o IP, principalmente entre a segunda e terceira semana de estocagem. Altunkaya et al. (2013) investigaram a estabilidade oxidativa de pão enriquecido com diferentes porcentagens de farinha de casca de romã, e verificaram que a concentração de peróxidos lipídicos (IP) aumentou significativamente em todas as amostras de pães durante o armazenamento.

Os resultados obtidos em área de hexanal nas farinhas de trigo integral controle e fortificada com diferentes compostos de ferro durante o armazenamento estão apresentados na Figura 4 (Apêndice H).

No tempo inicial (T1), a amostra controle somente apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) das amostras fortificadas com SF e SF micro, e estas amostras foram as que apresentaram os maiores valores de área de hexanal. Após 30 dias de armazenamento, a amostra controle somente apresentou diferença significativa das amostras fortificadas com SF, SF micro e FF micro, e também foram as amostras que apresentaram os maiores valores de hexanal. No tempo T3, as amostras fortificadas com SF, FF, NaFeEDTA, SF micro e FF micro foram as farinhas que apresentaram os maiores valores de hexanal e diferiram significativamente do controle. Em 90 dias de estocagem (T4), o controle não diferiu das amostras fortificadas com Fe R e NaFeEDTA, e as amostras fortificadas com SF e SF micro foram as que apresentaram os maiores valores de hexanal. Aos 120 dias de estocagem (T5), o controle apresentou diferença significativa das amostras fortificadas com SF, SF micro e FF micro, e estas amostras foram as que apresentaram os maiores valores de hexanal.



Média (n=3). *Área de hexanal x 10^4 . Control: farinha de trigo integral sem fortificação; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF micro: fumarato ferroso microencapsulado. 1: T1 (início); 2: T2 (30 dias); 3: T3 (60 dias); 4: T4 (90 dias); 5: T5 (120 dias).

Figura 4. Área de hexanal em farinha de trigo integral e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante o período de armazenamento.

Ao avaliar os valores de área de hexanal das amostras ao longo do tempo, é possível verificar que a amostra controle apresentou os maiores valores nos tempos T3 (60 dias) e T4 (90 dias). O mesmo comportamento foi verificado com a farinha integral fortificada com FF. Já a amostra fortificada com SF apresentou o maior valor de hexanal logo após 30 dias de estocagem, enquanto que a fortificada com FF micro o maior valor foi verificado no tempo T5 (120 dias). As demais amostras (Fe R, NaFeEDTA e SF micro) apresentaram os maiores valores de hexanal em 90 dias de estocagem (T4). Portanto, verifica-se que os diferentes compostos de ferro utilizados na fortificação influenciaram negativamente a estabilidade das amostras de farinha de trigo integral.

Cramer et al. (2005) analisaram compostos voláteis em cevada e trigo utilizando a técnica de extração SPME e só encontraram hexanal nas amostras de cevada. Giannetti et al. (2014) utilizaram a técnica de HS-SPME seguida de CG/MS para avaliar a fração volátil de massa elaborada com farinha de trigo duro produzida sob diferentes condições de processo e verificaram a presença de alguns produtos de oxidação lipídica, inclusive hexanal.

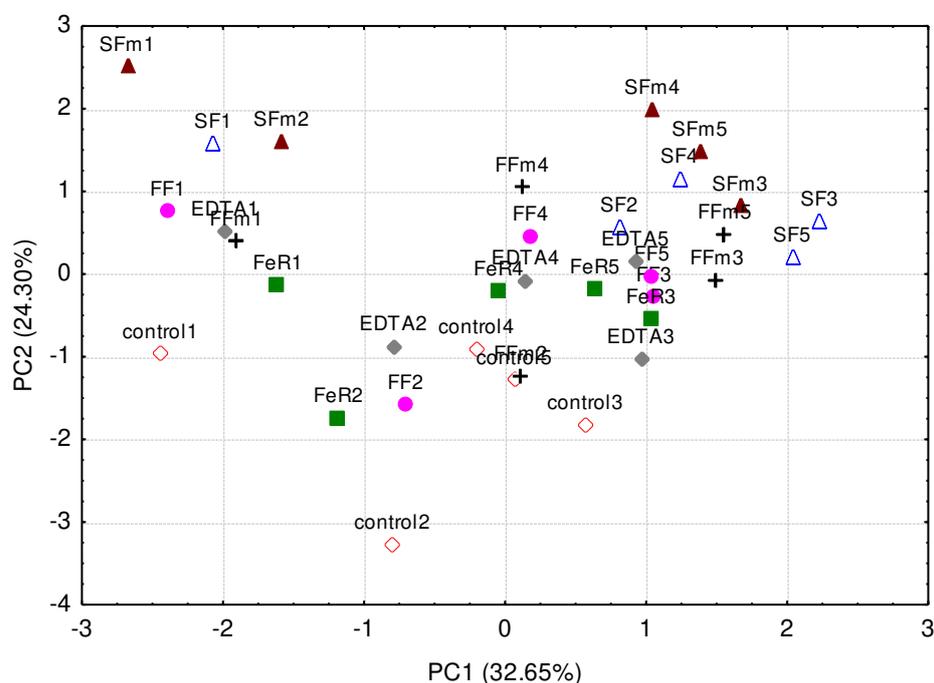
Com a finalidade de verificar as correlações existentes entre as variáveis estudadas e as relações com os diferentes compostos de ferro empregados na fortificação das amostras de farinha de trigo integral, uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada. Para tanto, uma matriz de dados (6 variáveis x 35 amostras) foi construída utilizando as variáveis: teor de ferro, acidez titulável, coordenadas de cor (L^* e b^* , a coordenada a^* não foi utilizada pois não houve diferença significativa entre as amostras e entre os tempos de estocagem), índice de peróxido e hexanal, como coluna, e as amostras avaliadas mensalmente, como linhas. Três componentes foram utilizados para descrever 76,28% do total da variância. Os resultados da PCA para os parâmetros avaliados na farinha de trigo integral controle e fortificada com diferentes compostos de ferro estão apresentados na Figura 5, onde (a) descreve o gráfico de scores e (b) o gráfico de loading.

As variáveis dominantes para a primeira componente principal (PC1) foram os parâmetros de cor L^* (positivamente correlacionado), b^* (negativamente correlacionado) e IP (positivamente), descreveram 32,65% da variância total dos resultados. A segunda componente principal (PC2) foi responsável por descrever 24,30% do total da variância e com exceção das variáveis de cor (L^* e b^*) todas as demais contribuíram para a variabilidade dos resultados. Já a PC3 descreveu

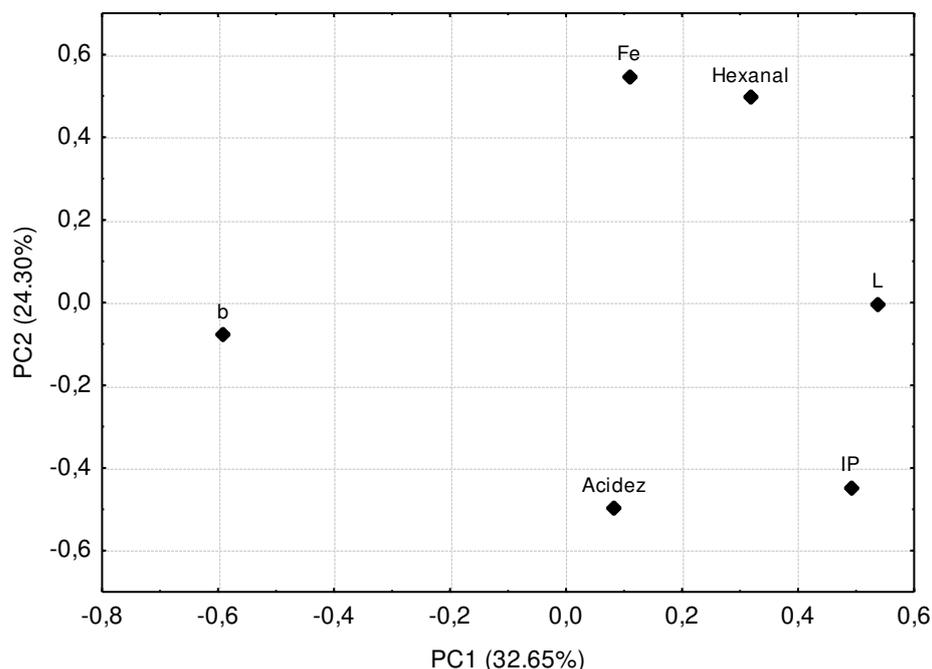
19,32% da variância e as variáveis acidez (positivamente correlacionada) e a coordenada L* (negativamente correlacionada) foram as que mais contribuíram para a variabilidade das amostras.

Através do gráfico de scores (a) é possível verificar que ocorreu agrupamento entre as amostras e que houve diferença entre elas. As amostras controle estão na parte inferior do gráfico de scores o que significa que estas amostras contêm os menores valores de ferro e hexanal. As amostras que foram fortificadas com SF3, SF4, SF5, SFm3, SFm4, SFm5, FFm3, FFm5, nos respectivos tempos, foram as amostras que apresentaram os maiores valores de ferro e hexanal, ou seja, o tempo de armazenamento para a farinha de trigo integral fortificada com estes compostos de ferro é diretamente influenciado pela oxidação lipídica, devido aos maiores valores de hexanal. Já as farinhas integrais fortificadas com os diferentes compostos de ferro, nos tempos T1 e T2 foram às amostras que apresentaram as menores influências em relação aos parâmetros avaliados.

(a)



(b)



Control: farinha de trigo integral sem fortificação; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; EDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético (NaFeEDTA); SFm: sulfato ferroso microencapsulado; FFm: fumarato ferroso microencapsulado. 1: T1 (início); 2: T2 (30dias); 3: T3 (60 dias); 4: T4 (90 dias); 5:T5 (120 dias).

Figura 5. Análise de Componentes Principais para parâmetros de qualidade de farinha de trigo integral com diferentes compostos de ferro, (a) Gráfico de scores (amostras), (b) Gráfico de loading (variáveis).

4. CONCLUSÃO

A fortificação da farinha de trigo integral com os diferentes compostos de ferro promoveu alterações nos parâmetros estudados.

As farinhas fortificadas com SF, SF micro e FF micro apresentaram maiores alterações nos parâmetros avaliados. Para as adicionadas com os compostos NaFeEDTA e Fe R constatou-se menores alterações, portanto, estes compostos foram considerados mais estáveis e apresentaram comportamento similar ao controle quando utilizados no processo de fortificação durante a estocagem.

DISCUSSÃO GERAL

No Brasil, assim como em muitos outros países, a fortificação de farinha de trigo com ferro é uma prática realizada desde 2002, com o intuito de reduzir a prevalência de anemia ferropriva, causada pela baixa ingestão de ferro biodisponível proveniente da dieta alimentar. Para que os programas de fortificação tenham um efeito positivo, o veículo utilizado deve ser de fácil acesso e de baixo custo para abranger a maior parte da população. Porém, alguns parâmetros devem ser levados em consideração para que sua incorporação não afete a qualidade da matéria-prima nem do produto final como, propriedades reológicas e tecnológicas, capacidade de absorção no organismo, além do efeito pró-oxidante (ferro) sobre a oxidação lipídica. Sendo assim, a farinha de trigo se enquadra neste perfil, pois é um ingrediente amplamente utilizado para a elaboração de massas, bolos e pães e o pão tipo francês é o mais consumido pela população brasileira. Além disso, atualmente é crescente a demanda por produtos integrais devido aos benefícios que proporcionam a saúde e a incorporação de farelo e/ou gérmen na farinha para a elaboração de pães, tem sido realizado com aceitação pela população.

Nesse contexto, vale ressaltar que minerais podem competir no processo de absorção e não se tem dados da influência da fortificação de farinhas com diferentes compostos de ferro na bioacessibilidade de outros minerais importantes como zinco e cálcio.

Nesse trabalho foi realizado o estudo da fortificação de farinhas de trigo refinada e integral com diferentes compostos de ferro como: sulfato ferroso (SF), fumarato ferroso (FF), ferro reduzido (Fe R), sódio ferro etilenodiaminotetracético (NaFeEDTA), sulfato ferroso microencapsulado (SF micro) e fumarato ferroso microencapsulado (FF micro) e a avaliação das propriedades reológicas da massa, na qualidade tecnológica dos pães e a bioacessibilidade dos minerais Fe, Zn e Ca, tanto em farinha de trigo refinada quanto em integral (adicionada de 6% de farelo de trigo), e estão apresentados nos capítulos 2 e 3, respectivamente. Já os capítulos 4 e 5 abordaram como os diferentes compostos de ferro utilizados na fortificação das farinhas podem influenciar as propriedades de qualidade e/ou estabilidade da farinha de trigo refinada e integral, respectivamente, durante o período de estocagem de 120 dias.

Inicialmente foi realizada a caracterização da farinha de trigo refinada e os teores, em base seca, obtidos na composição centesimal foram: $13,69 \pm 0,06$; $12,45$

$\pm 0,11$; $1,22 \pm 0,05$; $0,60 \pm 0,05$; 85,73; $2,92 \pm 0,01\%$ de umidade, proteínas, lipídios, cinzas, carboidratos e fibras, respectivamente. Os valores de índice de glúten, glúten úmido e glúten seco foram: $96,28 \pm 4,32$; $28,54 \pm 1,33$ e $10,04 \pm 0,62$ g/100 g, respectivamente. O teor de ferro encontrado na farinha de trigo foi de $1,01 \pm 0,03$ mg/100 g. Para a obtenção da farinha de trigo integral foi reincorporado 6% de farelo de trigo na farinha refinada e a composição centesimal foi realizada, obtendo-se os seguintes valores (em base seca): $13,22 \pm 0,11$; $12,95 \pm 0,42$; $1,29 \pm 0,01$; 84,95 e $6,91 \pm 0,31\%$ de umidade, proteínas, lipídios, cinzas, carboidratos e fibras totais, respectivamente, e o teor de ferro foi de $1,38 \pm 0,06$ mg/100 g.

Os valores da composição centesimal tanto na farinha refinada quanto na integral estão de acordo com a Legislação Brasileira (Brasil, 2005). O teor de ferro nas farinhas refinada e integral também está concordante com o reportado em outros trabalhos científicos e uma maior concentração no teor de ferro na farinha integral era esperada, uma vez que os grãos integrais apresentam em sua composição, teores de nutrientes, superiores aos refinados.

Uma vez caracterizadas as farinhas, refinada e integral, foi realizado o processo de fortificação com ferro e os resultados para o teor do mineral variaram de $4,41 \pm 0,07$ a $5,84 \pm 0,12$ mg/100 g para a farinha refinada e de 4,80 a 6,29 mg/100 g para a integral. As quantidades dos compostos de ferro utilizados para a fortificação das farinhas e os teores obtidos obedecem a Resolução Normativa 344 (Brasil, 2002).

As farinhas fortificadas com os diferentes compostos de ferro e a farinha controle (sem adição de ferro), refinada e integral, foram submetidas à caracterização das propriedades reológicas da massa. Para isso, os parâmetros farinográficos e extensográficos foram avaliados. Na análise farinográfica para a farinha refinada, o parâmetro absorção de água (AA) foi influenciado pelas farinhas fortificadas com sulfato ferroso, fumarato ferroso e ferro reduzido, pois apresentaram valores superiores de absorção quando comparado à amostra controle. Em relação ao tempo de chegada (TC), não foi verificada diferença significativa entre a amostra controle e as amostras fortificadas. O tempo de desenvolvimento da massa (TDM) foi influenciado pelos compostos de Fe R, NaFeEDTA e FF micro e a estabilidade (EST) pela amostra fortificada com FF. Já o índice de tolerância a mistura (ITM) foi influenciado pelas amostras fortificadas com Fe R, SF micro e FF micro, pois estas amostras apresentaram resultados inferiores a amostra controle.

Em relação à farinha integral, o parâmetro de AA foi influenciado pela amostra fortificada com NaFeEDTA. O TC não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre a amostra controle e as fortificadas. Em relação ao TDM a amostra controle não diferiu ($p>0,05$) das amostras fortificadas com Fe R e NaFeEDTA. O parâmetro EST foi alterado pelos compostos de ferro empregados na fortificação, exceção ocorreu para o FF e NaFeEDTA que apresentaram semelhança ao controle. O ITM foi influenciado pela maioria dos compostos de ferro empregados, exceção ocorreu para a amostra fortificada com NaFeEDTA que não apresentou diferença do controle.

De modo geral, todos os parâmetros farinográficos foram afetados pelos diferentes compostos de ferro. No entanto, a farinha refinada fortificada com Fe R foi a que mais alterou esses parâmetros, enquanto que, a farinha integral fortificada com NaFeEDTA foi a que menos afetou as análises farinográficas das farinhas estudadas

Em relação às propriedades extensográficas para a farinha de trigo refinada, o parâmetro resistência à extensão (R) foi afetado pelas amostras fortificadas com NaFeEDTA e SF micro em 45 min; no tempo de 90 min, a amostra controle apresentou diferença significativa das amostras com SF, FF, NaFeEDTA e SF micro e em 135 min o controle somente diferiu da farinha com FF. Já para o parâmetro de resistência máxima à extensão (Rm) não foi verificada diferença significativa ($p>0,05$) entre o controle e as amostras fortificadas nos diferentes tempos avaliados. Para o parâmetro de extensibilidade (E), com exceção da amostra fortificada com Fe R, todas as amostras apresentaram diferença significativa do controle, nos diferentes tempos avaliados. Já para o número proporcional (D), a amostra controle apresentou semelhança em relação às amostras fortificadas com SF, Fe R e FF micro no tempo de 45 min, em 90 e 135 min.

Para as amostras de farinha de trigo integral é possível observar que somente a farinha fortificada com NaFeEDTA influenciou o parâmetro R em 45 min, nos tempos de 90 e 135 min, as amostras fortificadas não apresentaram diferença significativamente em relação ao controle. O mesmo efeito foi verificado para o parâmetro de resistência máxima a extensão (Rm). Para o parâmetro de extensibilidade (E), não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre o controle e as amostras de pães fortificados. Já para o número proporcional (D), somente no tempo de 45 min a amostra fortificada com NaFeEDTA diferiu do controle.

Com exceção do parâmetro R_m , todos os parâmetros extensográficos foram afetados quando os diferentes compostos de ferro foram utilizados na fortificação de farinha refinada. No entanto, o composto de Fe R foi o que menos influenciou as análises extensográficas. Por outro lado, os parâmetros extensográficos nas farinhas integrais somente foram afetados quando o composto NaFeEDTA foi empregado no tempo 45 min.

De modo geral, mesmo que alguns parâmetros farinográficos e extensográficos tenham sido afetados pelos compostos de ferro estudados, isso não impossibilitou a obtenção de pães (branco e integral) tipo francês, pois segundo Pizzinatto (1997) pães de boa qualidade são obtidos quando se utiliza farinha forte, que apresentam propriedades farinográficas de AA superior a 58%, TDM de 4 a 8 minutos, EST de 8-15 min e ITM de 15-50 UF, e ainda, a farinha pode ser classificada em relação aos parâmetros extensográficos, e é considerada forte, ou seja, adequada para a panificação, quando apresentam valores de R, R_m e D maiores que 560 UE, 840 UE e 3,6 UE/mm, respectivamente, e valor de E menor que 155 mm.

A caracterização dos pães tipo francês (refinado e integral) foi realizada pelos parâmetros: volume específico (VE), formato através da relação altura/largura, salto de forno, abertura (Ab) e altura (Al) da pestana.

Para o pão elaborado com farinha refinada foi verificado que o volume específico (VE) do pão controle somente apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) dos pães fortificados com NaFeEDTA e FF micro, os quais apresentaram maiores valores de VE, 5,67 e 5,93 (cm^3/g), respectivamente. Em relação ao formato, avaliado pela relação altura/largura, foi verificado que o pão fortificado com Fe R apresentou o maior valor de altura (7,5 cm) e apresentou diferença significativa entre os demais pães avaliados; a largura variou de 6,56 a 8,71 cm, porém a amostra controle diferiu ($p < 0,05$) somente das amostras fortificadas com FF e Fe R; o formato variou de 0,8 a 0,91 e somente os pães fortificados com FF e FF micro apresentaram diferença significativa em relação aos demais.

Para o parâmetro salto de forno, o pão controle (1,99 cm) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) somente dos pães fortificados com SF micro e Fe R com valores de 1,48 e 3,40 cm, respectivamente. Em relação à abertura e altura da pestana, os pães fortificados com SF e FF micro apresentaram os menores valores

de pestana e diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos demais pães, inclusive do controle.

Para os pães elaborados com farinha integral os valores de VE variaram de 4,94 a 6,30 cm^3/g e não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o controle e os pães fortificados. Em relação ao formato, os valores variaram de 0,74 a 0,84 e não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a amostra controle e as fortificadas. Para a altura, foi verificado que o pão controle apresentou o menor valor em relação ao pão fortificado com NaFeEDTA. Já a largura foi influenciada pelos compostos de ferro e o pão integral com SF foi o que apresentou o maior valor de largura, e a amostra controle não diferiu significativamente dos pães fortificados com NaFeEDTA e FF micro.

O salto de forno foi influenciado negativamente pelos diferentes compostos de ferro, quando comparado à amostra controle. Este parâmetro variou de $1,15 \pm 0,20$ a $2,08 \pm 0,10$ cm, para o pão fortificado com SF e o controle, respectivamente.

Em relação à abertura da pestana, é possível verificar que os pães fortificados com FF, Fe R, SF micro e FF microencapsulado apresentaram os melhores resultados quando comparados ao pão controle. A altura da pestana também foi avaliada, porém todos os pães integrais apresentaram ausência (valor zero) neste parâmetro. Possivelmente a incorporação de fibras, proveniente do farelo de trigo, pode ter influenciado este parâmetro devido a menor quantidade de glúten presente na farinha.

De forma geral, os parâmetros de qualidade dos pães (refinado e integral) foram alterados pelos diferentes compostos de ferro, quando comparados à amostra controle, porém, nenhum composto de ferro empregado na fortificação foi inadequado do ponto de vista tecnológico para a elaboração dos pães tipo francês. Para uma farinha de trigo ser considerada adequada ou com potencial para panificação é necessário que apresente a capacidade de produzir, uniformemente, um pão atrativo e com custo competitivo. Se a mesma não apresentar estas características, poderá ainda, ser suplementada com aditivos visando sua correção (Queji, 2006).

Após a caracterização dos pães foram determinados os teores de Ca e Zn. Para tanto, foi realizada a validação do método de acordo com os guias de validação de métodos analíticos e os parâmetros de linearidade, sensibilidade,

precisão, recuperação e limites de detecção e quantificação, foram avaliados e demonstraram-se adequados. Em seguida os ensaios *in vitro* (solubilidade e diálise) foram realizados tanto nos pães elaborados com farinha refinada quanto nos integrais, a fim de avaliar o comportamento dos diferentes compostos de ferro adicionados às farinhas, além da presença natural dos minerais Zn e Ca, nos pães.

O teor de Fe no pão controle refinado foi de 1,54 mg/100 g e os demais pães fortificados apresentaram teores que variaram de 4,33 a 5,44 mg/100 g. A fração de ferro solúvel nos pães variou de 0,77 a 2,58 mg/100 g. Foi possível verificar que o pão controle não diferiu significativamente ($p > 0,05$) em relação ao fortificado com SF micro. Os pães fortificados com FF e NaFeEDTA, também não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$) e foram os que apresentaram as maiores concentrações de solubilidade, 2,58 e 2,56 mg/100 g, respectivamente. A porcentagem de solubilidade (%) variou de 19,75 a 59,24%, para os pães fortificados com SF micro e FF, respectivamente.

Em relação à diálise, o pão controle apresentou teor de 0,51 mg/100 g, enquanto que as demais amostras apresentaram variações de 1,41 a 2,66 mg/100 g. Os compostos de ferro, SF, FF, Fe R e FF micro não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$) e a forma NaFeEDTA foi a que apresentou o maior teor de ferro dialisado. Em relação à porcentagem de diálise, é possível notar que a amostra controle, mesmo não sendo fortificada, apresentou porcentagem de Fe dialisado semelhante à maioria das amostras fortificadas, o que indica que a forma de ferro naturalmente presente na farinha de trigo, apresenta boa disponibilidade de absorção, e a forma NaFeEDTA foi a que apresentou a maior porcentagem de diálise (52,43%). Vale ressaltar que os compostos de ferro microencapsulados (sulfato e fumarato ferroso) apresentaram porcentagem de diálise de 40,11 e 36,20%, respectivamente, o que pode ser um fator importante a ser considerado no processo de fortificação, pois os compostos microencapsulados apresentam a vantagem de não alterar as características organolépticas do alimento, além de apresentar biodisponibilidade elevada e não interferir no valor nutricional do veículo que foi utilizado para a fortificação (Cocato et al., 2007).

O teor médio de Zn, nas amostras de pão tipo francês foi 0,78 mg/100 g, e não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o controle e as demais amostras. O teor de Zn solúvel e a porcentagem de solubilidade variaram de 0,21 a 0,38 mg/100 g e 27,56 a 49,13%, respectivamente. O pão controle e as amostras

fortificadas com SF, FF e FF micro não diferiram significativamente entre si ($p>0,05$), já as amostras fortificadas com Fe R e NaFeEDTA apresentaram os menores teores de Zn solúvel, 0,21 e 0,29 mg/100 g, respectivamente. Em relação à diálise, os valores variaram de 0,08 a 0,25 mg/100 g, o que corresponde a 10,66 a 32,17% de diálise. O pão controle não diferiu significativamente ($p>0,05$) das amostras fortificadas com Fe R e FF micro. As amostras fortificadas com SF e SF micro, apresentaram os menores teores de Zn dialisado e a fortificada com NaFeEDTA o maior teor. Através dos dados obtidos é possível verificar que a bioacessibilidade do Zn naturalmente presente na farinha de trigo pode ser influenciada pelos diferentes compostos de Fe empregados na fortificação, e que a fortificação com NaFeEDTA apresentou a maior porcentagem de diálise para o Zn. Neste contexto, este composto pode ser considerado uma opção de fortificante utilizado em farinha de trigo. Vale ressaltar que o composto NaFeEDTA utilizado na fortificação, além de apresentar elevada porcentagem de diálise para o Fe também apresentou elevada porcentagem para o Zn.

O teor de Ca nas amostras de pães fortificados com os diferentes compostos de ferro variaram de 11,70 a 13,57 mg/100 g. O pão controle apresentou diferença significativa das amostras fortificadas com SF e SF micro. Em relação ao teor de Ca solúvel, o pão controle apresentou diferença significativa ($p<0,05$) das amostras fortificadas com Fe R, NaFeEDTA, SF micro e FF micro, e os valores variaram de 5,85 a 9,30 mg/100 g. A amostra controle foi a que apresentou o maior teor de Ca solúvel, ou seja, o Ca naturalmente presente na matriz alimentar apresenta alta disponibilidade para ser absorvido pelo organismo humano, nas condições do método. Para o Ca dialisado, o teor variou de 5,34 a 8,80 mg/100 g, o que corresponde a 44,01 e 64,85% de diálise e não foi verificada diferença significativa ($p>0,05$) da amostra controle em relação às amostras fortificadas.

Para os pães elaborados com farinha de trigo integral (controle) foram obtidos os teores médios de Fe, Zn e Ca de 2,86, 1,13 e 12,95 mg/100 g, respectivamente. Após a fortificação com os diferentes compostos de ferro, os pães integrais apresentaram teores de ferro que variaram de 4,83 a 6,34 mg/100 g, em média 5,50 mg/100 g. Quanto ao estudo de solubilidade, a concentração de ferro solúvel variou de 0,34 a 2,56 mg/100 g. Os pães fortificados com SF, FF, NaFeEDTA e FF micro, diferiram em relação ao controle, e a forma NaFeEDTA foi a que apresentou a maior fração solúvel (2,56 mg/100 g). A porcentagem de solubilidade

variou de 5,40 (SF micro) a 44,80% (NaFeEDTA). Em relação à avaliação da diálise, a amostra controle apresentou teor do mineral de 1,06 mg/100 g, enquanto que os pães fortificados apresentaram teores de ferro dialisável de 1,68 a 2,64 mg/100 g e todos os pães fortificados apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) do controle. As porcentagens de diálise variaram de 31,79 (Fe R) a 46,14% (NaFeEDTA) e o pão controle apresentou porcentagem de diálise superior (37,17%) ao pão fortificado com Fe R.

Quanto ao teor total de Zn nos pães integrais, verificou-se variação de 1,13 a 1,47 mg/100 g. A fração de Zn solúvel e a porcentagem de solubilidade variaram de 0,08 a 0,19 mg/100 g e 7,88 a 15,30%, respectivamente. A amostra controle não diferiu significativamente ($p > 0,05$) das amostras fortificadas com FF e Fe R, e as amostras fortificadas com SF, NaFeEDTA e FF micro foram as que apresentaram os maiores teores de Zn solúvel e porcentagem de solubilidade, respectivamente. Para o ensaio de diálise, o teor de Zn variou de 0,21 a 0,49 mg/100 g. O pão integral controle somente apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) dos compostos de ferro microencapsulado (sulfato e fumarato ferroso). Em relação à porcentagem de diálise, os pães fortificados com NaFeEDTA, SF micro e FF micro foram os que apresentaram os maiores valores, 35,96; 33,06 e 36,42%, respectivamente. Esses dados indicam que os compostos de Fe utilizados na fortificação de farinhas interferem também na possibilidade de absorção do Zn naturalmente presente dos pães integrais, nas condições estudadas.

O teor total de Ca nas amostras de pães integrais variou de 12,54 a 14,47 mg/100 g. O pão controle apresentou diferença significativa das amostras fortificadas com SF, FF e FF micro. O teor de Ca solúvel e a porcentagem de solubilidade variaram de 3,18 a 11,84 mg/100 g e 24,07 a 82,87%, respectivamente, e a amostra controle não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) das amostras fortificadas com Fe R e NaFeEDTA. Já a concentração de Ca dialisado variou de 5,55 a 8,42 mg/100 g, o que corresponde a 38,29 e 63,77% de diálise, respectivamente, e pão controle somente diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos pães fortificados com os compostos microencapsulados (SF e FF).

Nos pães integrais fortificados com os diferentes compostos de ferro, por apresentar uma porção de farelo na sua composição, ainda foi realizada a determinação das frações de *mi*oinositol fosfato nas amostras controle e fortificadas,

e os teores das frações não foram detectados, pois estavam abaixo dos limites de detecção ($8 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$) e quantificação ($12 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$) do método analítico.

Para o estudo dos efeitos da fortificação com diferentes compostos de ferro na qualidade e/ou estabilidade das farinhas refinada e integral (durante 120 dias de estocagem) foram avaliados os parâmetros de acidez titulável, cor, índice de peróxido, hexanal e o teor de ferro total.

Em relação ao parâmetro de acidez para farinhas refinadas foi verificado um aumento da acidez de forma diferenciada quando diferentes compostos de ferro foram utilizados na fortificação das farinhas, ou seja, a qualidade da farinha de trigo foi influenciada negativamente. Ao avaliar a influência da acidez ao longo do tempo para cada amostra, verificou-se que as farinhas controle, Fe R e FF micro apresentaram o mesmo comportamento, ou seja, os maiores valores de acidez foram verificados no tempo T3 (60 dias). Já as demais amostras fortificadas com SF, FF, NaFeEDTA e SF micro, apresentaram os maiores valores de acidez no tempo T2 (30 dias).

Para as farinhas integrais foi verificado que a acidez foi afetada quando os diferentes compostos de ferro foram utilizados, principalmente o NaFeEDTA, o que alterou negativamente a qualidade da farinha. Em relação à influência da acidez titulável ao longo do tempo para cada amostra, verificou-se que as amostras apresentaram o mesmo comportamento, no tempo inicial (T1) menor valor de acidez foi observado, após 30 dias (T2) foi o período que as amostras apresentaram o maior valor de acidez, nos tempos T3 e T4 ocorreu diminuição nos valores avaliados e no T5, ligeiro aumento no valor de acidez foi verificado.

Para o parâmetro cor foi verificada alteração nos parâmetros L^* e b^* , para a farinha de trigo refinada. De modo geral, uma modificação da coloração da farinha de trigo é esperada durante a estocagem (Ortolan et al., 2008) e se devem ao processo de maturação da farinha com o aumento do tempo de armazenamento e ocorrem pelas reações de oxidação das proteínas do glúten e dos carotenoides (Gutkoski et al., 2008). No entanto, o processo de fortificação das farinhas refinadas com diferentes compostos de ferro influenciou este parâmetro de forma negativa, e a amostra fortificada com SF foi a que apresentou maiores alterações nos parâmetros L^* e b^* quando comparado à amostra controle.

Já para as farinhas integrais não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$), ou seja, independentemente da forma de ferro empregada na fortificação

não foram verificadas alterações para este parâmetro. O farelo de trigo utilizado no preparo da farinha integral apresenta coloração escura e a presença do ferro, também de coloração escura, tornou-se imperceptível (Alam et al., 2009). Quando a avaliação da cor da farinha integral foi realizada ao longo do tempo para cada amostra, verificou-se que as farinhas apresentaram mesmo comportamento para o parâmetro L^* . Em relação à coordenada a^* , não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$). Para a coordenada b^* , as amostras controle, SF e Fe R apresentaram o mesmo comportamento ao longo do tempo. A amostra fortificada com FF somente apresentou alteração de cor no tempo T5, já as farinhas com SF micro e FF micro apresentaram diminuição da coloração amarela nos tempos T3 e T2, respectivamente, alterações nos demais tempos não foram verificadas.

Para o índice de peróxido, verificou-se que os diferentes compostos de ferro utilizados na fortificação da farinha refinada influenciaram de forma negativa este parâmetro, quando comparadas ao controle. O mesmo foi verificado para as farinhas integrais. Quando a avaliação do IP foi realizada nas amostras de farinha de trigo refinada, ao longo do tempo, o controle apresentou o maior valor de IP no tempo T4 (90 dias), enquanto que as amostras fortificadas com os diferentes compostos de ferro apresentaram os maiores valores para o IP em tempo inferior ao T4, ou seja, este parâmetro foi influenciado negativamente pelos compostos de ferro. Para a farinha integral, os valores de IP para as amostras controle e fortificadas com SF, FF e FF micro apresentaram comportamento semelhantes e os maiores valores foram verificados no T2. As amostras fortificadas com Fe R, NaFeEDTA e SF micro apresentaram os maiores valores de IP no tempo T3 (60 dias de estocagem). Existem estudos na literatura que associam que o processo de oxidação pode ser catalisado por uma variedade de pró-oxidantes como enzimas, exposição à luz e íons metálicos como o ferro (Ostdal et al., 2000).

Em relação ao hexanal, observou-se que as farinhas refinadas controle, FF e NaFeEDTA foram as que apresentaram os menores valores de área de hexanal e não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si. As demais amostras refinadas fortificadas (SF, Fe R, SF micro e FF micro), além de apresentarem resultados de áreas superiores, também diferiram significativamente ($p < 0,05$) em relação à amostra controle. Após 30 dias de estocagem (T2), as farinhas de trigo fortificadas com SF, SF micro e FF micro foram às amostras que apresentaram os maiores valores de área de hexanal e diferiram significativamente

das demais, inclusive da farinha controle. Este mesmo comportamento foi verificado nos tempos T3, T4 e T5, para as amostras fortificadas com SF, SF micro e FF micro em relação ao controle. Ao avaliar o processo de oxidação das farinhas ao longo do tempo, as amostras de farinha de trigo refinada controle e fortificadas com FF, Fe R e NaFeEDTA apresentaram comportamento semelhantes em relação a área de hexanal. Já a amostra fortificada com SF apresentou aumento de área já nos primeiros 30 dias de estocagem, após este período os valores obtidos não apresentaram diferença significativa e novo aumento ocorreu no tempo T5. As amostras fortificadas com SF micro e FF micro também obtiveram comportamentos semelhantes, onde apresentaram ligeiro aumento nos valores de hexanal até o tempo T4, porém sem diferença significativa e no tempo T5 ocorreu aumento no valor de hexanal.

Para as farinhas integrais, foi observado que os compostos de ferro influenciaram de forma negativa o parâmetro de hexanal. Ao avaliar este parâmetro ao longo do tempo, verificou-se que a amostra controle apresentou os maiores valores de hexanal nos tempos T3 e T4, o mesmo comportamento foi verificado para a farinha fortificada com FF. Já a amostra com SF apresentou o maior valor de hexanal após 30 dias de estocagem (T2) e a fortificada com FF micro o maior valor foi verificado com 120 de estocagem (T5). As demais amostras (Fe R, NaFeEDTA e SF micro) apresentaram os maiores valores de hexanal em 90 dias de estocagem (T4). Portanto, verifica-se que os diferentes compostos de ferro utilizados na fortificação influenciaram negativamente a estabilidade das amostras de farinha de trigo integral.

CONCLUSÃO GERAL

Os diferentes compostos de ferro utilizados na fortificação tanto da farinha de trigo refinada quanto da integral para a elaboração de pães tipo francês alteraram as características reológicas da massa e a qualidade dos pães, quando comparadas à amostra controle, porém estes parâmetros não inviabilizaram a elaboração dos pães.

O teor de ferro e as frações, solúvel e dialisável, nas amostras de pães tipo francês foram determinados e embora o pão fortificado com FF tenha apresentado maior teor de solubilidade o composto NaFeEDTA mostrou ser a forma de ferro mais eficiente. Foi verificada influência positiva na absorção do Zn estimado no ensaio de diálise e o Ca não foi afetado. Para os pães integrais, novamente o NaFeEDTA mostrou ser o composto mais eficiente para a fortificação de farinha de trigo integral, por resultar em maiores porcentagens de Fe solúvel e dialisado, e permitiu que o Zn naturalmente presente na farinha integral esteja mais disponível para a absorção. Os compostos, SF, FF e SF microencapsulado, influenciaram positivamente a bioacessibilidade do Ca nesse produto. Não foram detectadas as frações de *mi*oinositol fosfato (fitatos) nos pães integrais controle e fortificados com os diferentes compostos de ferro.

A fortificação da farinha de trigo, refinada e integral, com os diferentes compostos de ferro promoveu alterações nos parâmetros de qualidade e/ou estabilidade da matriz durante a estocagem. Para o parâmetro de acidez foi observado um aumento ao longo do período avaliado para todas as amostras de farinha refinada e os compostos SF, FF e NaFeEDTA apresentaram os maiores valores de acidez logo no início do experimento. Já para a farinha integral foi verificado que todas as amostras apresentaram aumento no valor de acidez após 30 dias de estocagem (T2), porém as amostras fortificadas com FF e NaFeEDTA foram as que apresentaram os maiores valores de acidez durante o período avaliado.

Em relação à avaliação da cor, observou-se que os parâmetros L^* e b^* foram influenciados pelos compostos de ferro, principalmente pela forma SF. Para as farinhas integrais, observou-se que os parâmetros L^* , a^* e b^* não apresentaram diferença significativa entre as amostras, nos respectivos tempos. Quanto à avaliação da cor ao longo do tempo, os parâmetros L^* e b^* foram influenciados pelo tempo de armazenamento de 120 dias.

Os parâmetros IP e hexanal foram afetados pelos compostos de ferro utilizados na fortificação das farinhas refinadas sendo que o composto SF apresentou o maior valor de IP, logo no segundo mês de análise, já os compostos SF, SF micro e FF micro apresentaram os maiores valores de hexanal. Na farinha integral, os parâmetros IP e hexanal foram afetados pelos compostos de ferro e o SF e FFm apresentaram os maiores valores de IP. Já as farinhas integrais fortificadas com os compostos SF e SFmicro foram as amostras que apresentaram os maiores valores de hexanal.

Os compostos de Fe que promoveram as menores alterações nas propriedades de qualidade e/ou estabilidade das farinhas avaliadas durante a estocagem foram o Fe R e o NaFeEDTA. Estes compostos, portanto, causam poucas alterações no produto e de forma similar a amostra controle, em ambas farinhas, refinada e integral, durante 120 dias de estocagem.

Portanto, os diferentes compostos de ferro utilizados na fortificação de farinha de trigo tanto refinada quanto integral influenciaram de maneira diferenciada a estabilidade do produto durante a estocagem de 120 dias. Concluiu-se então que de acordo com o composto de ferro utilizado no processo de fortificação de farinhas (refinada e integral) a bioacessibilidade do mineral será diferente, e isso indica que os impactos da obrigatoriedade da fortificação de farinhas têm relação direta com o composto de ferro empregado. Além disso, pode afetar a absorção de zinco naturalmente presente nas farinhas e pães. Durante a estocagem das farinhas (fortificadas e controle) observou-se que o ferro mostrou um efeito pró-oxidante na estabilidade do produto.

REFERÊNCIAS

- AACC. (2010). *Approved Methods of Analysis* (11 ed.). St. Paul, MN, U.S.A: AACC International.
- ABIP. (2012). Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria. Desempenho do setor de panificação e confeitaria brasileiro 2012. In).
- Afridi, H. I., Kazi, T. G., Kazi, N., Kandhro, G. A., Baig, J. A., Shah, A. Q., Khan, S., Kolachi, N. F., Wadhwa, S. K., & Shah, F. (2011). Evaluation of status of calcium, magnesium, potassium, and sodium levels in biological samples in children of different age groups with normal vision and night blindness. *Clinical laboratory*, 57(7-8), 559-574.
- Akhtar, S., Anjum, F. M., & Anjum, M. A. (2011). Micronutrient fortification of wheat flour: Recent development and strategies. *Food Research International*, 44(3), 652-659.
- Akhtar, S., Anjum, F. M., Rehman, S.-U., & Sheikh, M. A. (2009). Effect of mineral fortification on rheological properties of whole wheat flour. *Journal of Texture Studies*, 40(1), 51-65.
- Akhter, S., Saeed, A., Irfan, M., & Malik, K. A. (2012). In vitro dephytinization and bioavailability of essential minerals in several wheat varieties. *Journal of Cereal Science*, 56(3), 741-746.
- Alam, S., Ullah Shah, H., & Riaz, A. (2009). Comparative studies on storage stability of ferrous iron in whole wheat flour and flat bread (naan). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58(1), 54-62.
- Almeida, E. L., & Chang, Y. K. (2012). Effect of the addition of enzymes on the quality of frozen pre-baked French bread substituted with whole wheat flour. *LWT - Food Science and Technology*, 49(1), 64-72.
- Altunkaya, A., Hedegaard, R. V., Brimer, L., Gokmen, V., & Skibsted, L. H. (2013). Antioxidant capacity versus chemical safety of wheat bread enriched with pomegranate peel powder. *Food & function*, 4(5), 722-727.
- Antunes, M. F. R. (2010). Interação competitiva do zinco e do ferro após administração oral e venosa de zinco em crianças eutróficas. . In, (pp. 66). Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- AOAC. (2000). Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. In). Gaithersburg: AOAC International.

- AOAC. (2006). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. In). Gaithersburg, Maryland.
- Araújo, J. M. A. (2004). *Química de Alimentos: Teoria e Prática*. Visçosa, MG. Brasil: UFV.
- Argyri, K., Birba, A., Miller, D. D., Komaitis, M., & Kapsokefalou, M. (2009). Predicting relative concentrations of bioavailable iron in foods using in vitro digestion: New developments. *Food Chemistry*, 113(2), 602-607.
- Assunção, M. C. F., Santos, I. S., Barros, A. J. D., Gigante, D. P., & Victora, C. G. (2007). Efeito da fortificação de farinhas com ferro sobre anemia em pré-escolares, Pelotas, RS. *Revista de Saúde Pública*, 41, 539-548.
- Bauer, J. L., Harbaum-Piayda, B., Stöckmann, H., & Schwarz, K. (2013). Antioxidant activities of corn fiber and wheat bran and derived extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 132-138.
- Beard, J. L. (2001). Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *The Journal of nutrition*, 131(2s-2), 568S-579S; discussion 580S.
- Benito, P., & Miller, D. (1998). Iron absorption and bioavailability: An updated review. *Nutrition Research*, 18(3), 581-603.
- Bodroza-Solarov, M., Filipcev, B., Kevresan, Ž., Mandic, A., & Simurina, O. (2008). Quality of bread supplemented with popped amaranthus cruentus grain. *Journal of Food Process Engineering*, 31(5), 602-618.
- Brasil. (2002). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC 344/2002. In, (pp. www.anvisa.org.br).
- Brasil. (2005a). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RDC 269/2005. In): www.anvisa.org.br.
- Brasil. (2005b). Regulamento técnico de identidade e qualidade da farinha de trigo. IN 8/2005. In P. e. A.-M. Ministério da Agricultura (Ed.), (pp. 3). Brasília, DF: Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- Brune, M., Rossander-Hulten, L., Hallberg, L., Gleerup, A., & Sandberg, A. S. (1992). Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. *The Journal of nutrition*, 122(3), 442-449.
- Buri, R. C., von Reding, W., & Gavin, M. H. (2004). Description and Characterisation of Wheat Aleurone. *Cereal Foods World*, 49(5), 8.

- Cámara, F., Amaro, M. A., Barberá, R., & Clemente, G. (2005a). Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods. *Food Chemistry*, *92*(3), 481-489.
- Cámara, F., Amaro, M. A., Barberá, R., & Lagarda, M. J. (2005b). Speciation of bioaccessible (heme, ferrous and ferric) iron from school menus. *European Food Research and Technology*, *221*(6), 768-773.
- Carbonaro, M., Grant, G., Mattera, M., Aguzzi, A., & Pusztai, A. (2001). Investigation of the mechanisms affecting Cu and Fe bioavailability from legumes. *Biological Trace Element Research*, *84*(1), 181-196.
- Casé, F., Deliza, R., & Rosenthal, A. (2005). Produção de 'leite' de soja enriquecido com cálcio. *Food Science and Technology (Campinas)*, *25*, 86-91.
- Chung, H.-J. (2009). Influence of Purple Sweet Potato Powder Addition on the Quality Characteristics and Oxidative Stability of Cookies. *Journal of Food Science and Nutrition*, *14*(1), 60-65.
- Cocato, M. L., Ré, M. I., Trindade Neto, M. A., Chiebao, H. P., & Colli, C. (2007). Avaliação por métodos in vitro e in vivo da biodisponibilidade de sulfato ferroso microencapsulado. *Revista de Nutrição*, *20*, 239-247.
- Cozzolino, S. M. F. (2012). *Biodisponibilidade de nutrientes: Manole*.
- Cramer, A.-C. J., Mattinson, D. S., Fellman, J. K., & Baik, B.-K. (2005). Analysis of Volatile Compounds from Various Types of Barley Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(19), 7526-7531.
- De Carli, L., Rosso, N. D., Schnitzler, E., & Carneiro, P. I. B. (2006). Estudo da estabilidade do complexo ácido fítico e o íon Ni(II). *Food Science and Technology (Campinas)*, *26*, 19-26.
- Eagling, T., Wawer, A. A., Shewry, P. R., Zhao, F. J., & Fairweather-Tait, S. J. (2014). 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 and food chemistry*, *62*(42), 10320-10325.
- Esteller, M. S., & Lannes, S. C. d. S. (2005). Parâmetros complementares para fixação de identidade e qualidade de produtos panificados. *Food Science and Technology (Campinas)*, *25*, 802-806.
- Fennema, S. D. K. L. P. O. R. (2009). *Química de Alimentos de Fennema: Artmed Editora*.

- Fernandez-Garcia, E., Carvajal-Lerida, I., & Perez-Galvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition research*, 29(11), 751-760.
- Fernández, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Fernández-López, J. A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59(3), 345-353.
- Ferrari, C. K. B. (1998). Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. *Revista de Nutrição*, 11, 3-14.
- Fonseca Filho, A. A., Araújo, W. M. C., Falcioroli, D. M. C., Pilla, N., & Marques, A. O. (2009). Avaliação da qualidade tecnológica de pães enriquecidos com farelo de trigo. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 8(1).
- Frontela, C., Ros, G., & Martínez, C. (2011). Phytic acid content and "in vitro" iron, calcium and zinc bioavailability in bakery products: The effect of processing. *Journal of Cereal Science*, 54(1), 173-179.
- Gautam, S., Platel, K., & Srinivasan, K. (2011). Influence of combinations of promoter and inhibitor on the bioaccessibility of iron and zinc from food grains. *International journal of food sciences and nutrition*, 62(8), 826-834.
- Giannetti, V., Boccacci Mariani, M., Mannino, P., & Testani, E. (2014). Furosine and flavour compounds in durum wheat pasta produced under different manufacturing conditions: Multivariate chemometric characterization. *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), 15-20.
- Glahn, R. P., Wien, E. M., Van Campen, D. R., & Miller, D. D. (1996). Caco-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels in vivo studies: use of a novel in vitro method for rapid estimation of iron bioavailability. *The Journal of nutrition*, 126(1), 332-339.
- Gotelli, C. A., Gotelli, M. J., Boccio, J. R., Zubillaga, M. B., Caro, R. A., Garcia del Rio, H., & Weill, R. (1996). Bioavailability of microencapsulated ferrous sulfate in fluid milk studies in human beings. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*, 46(4), 239-245.
- Gupta, S., Shimray, C. A., & Venkateswara Rao, G. (2012). Influence of organic acids on rheological and bread-making characteristics of fortified wheat flour. *International journal of food sciences and nutrition*, 63(4), 411-420.

- Gutkoski, L. C., Durigon, A., Mazzutti, S., Silva, A. C. T. d., & Elias, M. C. (2008). Efeito do período de maturação de grãos nas propriedades físicas e reológicas de trigo. *Food Science and Technology (Campinas)*, 28, 888-894.
- Haro-Vicente, J. F., Martínez-Graciá, C., & Ros, G. (2006). Optimisation of in vitro measurement of available iron from different fortificants in citric fruit juices. *Food Chemistry*, 98(4), 639-648.
- Hemalatha, S., Platel, K., & Srinivasan, K. (2007). Zinc and iron contents and their bioaccessibility in cereals and pulses consumed in India. *Food Chemistry*, 102(4), 1328-1336.
- Hemery, Y. M., Anson, N. M., Havenaar, R., Haenen, G. R. M. M., Noort, M. W. J., & Rouau, X. (2010). Dry-fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolic acids in breads made from processed bran fractions. *Food Research International*, 43(5), 1429-1438.
- Hettiarachchi, M., Hilmers, D. C., Liyanage, C., & Abrams, S. A. (2004). Na₂EDTA enhances the absorption of iron and zinc from fortified rice flour in Sri Lankan children. *The Journal of nutrition*, 134(11), 3031-3036.
- Hidalgo, A., Fongaro, L., & Brandolini, A. (2014). Wheat flour granulometry determines colour perception. *Food Research International*, 64, 363-370.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1-12.
- Hurrell, R. (2002). Fortification: Overcoming Technical and Practical Barriers. *The Journal of Nutrition*, 132(4), 806S-812S.
- Hurrell, R., Lynch, S., Bothwell, T., Cori, H., Glahn, R., Hertrampf, E., Kratky, Z., Miller, D., Rodenstein, M., Streekstra, H., Teucher, B., Turner, E., Yeung, C. K., & Zimmermann, M. B. (2004). Enhancing the absorption of fortification iron. A SUSTAIN Task Force report. *International journal for vitamin and nutrition research*, 74(6), 387-401.
- Hurrell, R., Ranum, P., de Pee, S., Biebinger, R., Hulthen, L., Johnson, Q., & Lynch, S. (2010). Revised recommendations for iron fortification of wheat flour and an evaluation of the expected impact of current national wheat flour fortification programs. *Food and nutrition bulletin*, 31(1 Suppl), S7-21.
- IBGE. (POF 2008-2009). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares. In).

- Jensen, S., Oestdal, H., Clausen, M. R., Andersen, M. L., & Skibsted, L. H. (2011). Oxidative stability of whole wheat bread during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 44(3), 637-642.
- Kapsokoufalou, M., Alexandropoulou, I., Komaitis, M., & Politis, I. (2005). In vitro evaluation of iron solubility and dialyzability of various iron fortificants and of iron-fortified milk products targeted for infants and toddlers. *International journal of food sciences and nutrition*, 56(4), 293-302.
- Kapsokoufalou, M., & Miller, D. D. (1991). Effects of Meat and Selected Food Components on the Valence of Nonheme Iron during In Vitro Digestion. *Journal of Food Science*, 56(2), 352-355.
- Kaseleht, K., Leitner, E., & Paalme, T. (2011). Determining aroma-active compounds in Kama flour using SPME-GC/MS and GC-olfactometry. *Flavour and Fragrance Journal*, 26(2), 122-128.
- Khouzam, R. B., Pohl, P., & Lobinski, R. (2011). Bioaccessibility of essential elements from white cheese, bread, fruit and vegetables. *Talanta*, 86, 425-428.
- Kiskini, A., Argiri, K., Kalogeropoulos, M., Komaitis, M., Kostaropoulos, A., Mandala, I., & Kapsokoufalou, M. (2007). Sensory characteristics and iron dialyzability of gluten-free bread fortified with iron. *Food Chemistry*, 102(1), 309-316.
- Kiskini, A., Kapsokoufalou, M., Yanniotis, S., & Mandala, I. (2010). Effect of different iron compounds on wheat and gluten-free breads. *Journal of the science of food and agriculture*, 90(7), 1136-1145.
- Lieu, P. T., Heiskala, M., Peterson, P. A., & Yang, Y. (2001). The roles of iron in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 22(1-2), 1-87.
- Lysionek, A. E., Zubillaga, M., Salgueiro, J., Caro, R., Ettlin, E., & Boccio, J. (2001). Bioavailability studies of a new iron source by means of the prophylactic-preventive method in rats. *Biological trace element research*, 84(1-3), 123-128.
- Lysionek, A. E., Zubillaga, M. B., Salgueiro, M. a. J., Piñeiro, A., Caro, R. A., Weill, R., & Boccio, J. R. (2002). Bioavailability of microencapsulated ferrous sulfate in powdered milk produced from fortified fluid milk: a prophylactic study in rats. *Nutrition*, 18(3), 279-281.

- Mahler, G. J., Shuler, M. L., & Glahn, R. P. (2009). Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. *The Journal of nutritional biochemistry*, 20(7), 494-502.
- Mendes, F. Q., Gomes, J. C., Barbosa, T. S., Sartori, M. A., & OLIVEIRA, M. G. A. (2008). Formulação de leite em pó enriquecido com ferro. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 26(1).
- Menteş, Ö., Bakkalbaşı, E., & Ercan, R. (2008). Effect of the Use of Ground Flaxseed on Quality and Chemical Composition of Bread *Food Science and Technology International* 14, 8.
- Miller, D. D., Schricker, B. R., Rasmussen, R. R., & Van Campen, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34(10), 2248-2256.
- Mimura, E. C., Bregano, J. W., Dichi, J. B., Gregorio, E. P., & Dichi, I. (2008). Comparison of ferrous sulfate and ferrous glycinate chelate for the treatment of iron deficiency anemia in gastrectomized patients. *Nutrition*, 24(7-8), 663-668.
- Miranda, M. Z. d., & El-Dash, A. (2002). Farinha integral de trigo germinado: 3. Características nutricionais e estabilidade ao armazenamento. *Food Science and Technology (Campinas)*, 22, 216-223.
- Moretti, D., Biebinger, R., Bruins, M. J., Hoeft, B., & Kraemer, K. (2014). Bioavailability of iron, zinc, folic acid, and vitamin A from fortified maize. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1312, 54-65.
- Morita, N., Maeda, T., Miyazaki, M., Yamamori, M., Miura, H., & Ohtsuka, I. (2002). Dough and Baking Properties of High-Amylose and Waxy Wheat Flours. *Cereal Chemistry Journal*, 79(4), 491-495.
- Mousia, Z., Edherly, S., Pandiella, S. S., & Webb, C. (2004). Effect of wheat pearling on flour quality. *Food Research International*, 37(5), 449-459.
- Muresan, V., Muste, S., Racolta, E., Semeniuc, C. A., Man, S., Birou, A., & Chircu, C. (2010). Determination of Peroxide Value in Sunflower Halva using a Spectrophotometric Method. 67(2).
- Nabeshima, E. H., Ormenese, R. d. C. S. C., Montenegro, F. M., Toda, E., & Sadahira, M. S. (2005). Propriedades tecnológicas e sensoriais de pães

- fortificados com ferro. *Food Science and Technology (Campinas)*, 25, 506-511.
- Nadadur, S. S., Srirama, K., & Mudipalli, A. (2008). Iron transport & homeostasis mechanisms: their role in health & disease. *The Indian journal of medical research*, 128(4), 533-544.
- NEPA. (2011). TACO. Tabela brasileira de composição de alimentos. In, (pp. 161): Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação - NEPA - UNICAMP.
- Nielsen, M. M., & Hansen, Å. (2008). Stability of Vitamin E in Wheat Flour and Whole Wheat Flour During Storage. *Cereal Chemistry*, 85(6), 716-720.
- Nogueira, A. d. C. (2015). Utilização de massa ácida desidratada para redução de sódio em pão tipo francês. In, (pp. 189). Campinas, SP.
- Nogueira, A. d. C., & Steel, C. J. (2016). Process Parameters and Technological Quality of French Rolls Produced with Dry Sourdough to Reduce Sodium. *Cereal Chemistry Journal*, 93(2), 138-144.
- Oliveira, N. M. A. L., Maciel, J. F., Lima, A. d. S., Salvino, É. M., Maciel, C. E. P., Oliveira, D. P. M. N. d., & Farias, L. R. G. d. (2011). Características físico-químicas e sensoriais de pão de forma enriquecido com concentrado proteico de soro de leite e carbonato de cálcio. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 70, 16-22.
- Oppenheimer, S. J. (2001). Iron and Its Relation to Immunity and Infectious Disease. *The Journal of Nutrition*, 131(2), 616S-635S.
- Ortolan, F., Hecktheuer, L. H., & Miranda, M. Z. (2008). Efeito do armazenamento à baixa temperatura (-4 C) na cor e no teor de acidez da farinha de trigo. *Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria-UFSM, Santa Maria-RS*.
- Ostdal, H., Andersen, H. J., & Nielsen, J. H. (2000). Antioxidative activity of urate in bovine milk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(11), 5588-5592.
- Park, Y. J., Park, J., Park, K. H., Oh, B. C., & Auh, J. H. (2011). Supplementation of alkaline phytase (Ds11) in whole-wheat bread reduces phytate content and improves mineral solubility. *Journal of food science*, 76(6), C791-794.
- Perales, S., Barbera, R., Lagarda, M. J., & Farre, R. (2006). Fortification of milk with calcium: effect on calcium bioavailability and interactions with iron and zinc. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(13), 4901-4906.

- Pereira, T. C., & Hessel, G. (2009). Deficiência de zinco em crianças e adolescentes com doenças hepáticas crônicas. *Revista Paulista de Pediatria*, 27(3), 7.
- Pizzinatto, A. (1997). Qualidade da farinha de trigo: conceito, fatores determinantes e parâmetros de avaliação e controle. 72.
- Pomeranz, Y. (1974). Biochemical, functional and nutritive changes during storage. Storage of cereal grains and their products. In Chistensen, C. M. ed.): Saint Paul: AACC.
- Pomeranz, Y. (1988). *Composition and functionality of wheat flour components. Wheat: chemistry and technology*. (Vol. v. II). St. Paul: American Association of Cereal Chemists.
- Pomeranz, Y., Shogren, M. D., Finney, K. F., & Bechtel, D. B. (1977). Fiber in Breadmaking - Effects on Functional Properties. *American Association of Cereal Chemists, Inc*, 54, 17.
- Queiroz, S. S., & Torres, M. A. A. (2000). Anemia ferropriva na infância. *Jornal de Pediatria*, 76(supl. 3), 7.
- Queji, M. F. D. S., M.H.; Trindade, J.L.F. (2006). Propriedades reológicas da massa de farinha de trigo adicionada de alfa-amilase. In, vol. 12 (pp. 9): UEPG. Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias.
- Rebellato, A. P., Pacheco, B. C., Prado, J. P., & Lima Pallone, J. A. (2015). Iron in fortified biscuits: A simple method for its quantification, bioaccessibility study and physicochemical quality. *Food Research International*, 77, 385-391.
- Rehman. (2006). Storage effects on nutritional quality of commonly consumed cereals. *Food Chemistry*, 95(1), 53-57.
- Rehman, Anjum, S. A., & Anjum, F. M. (2006). Storage stability of ferrous iron in whole wheat flour naan production. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30(3), 323-334.
- Ries, E. F. (2010). Estudo da produção, caracterização e aplicação de nova fitase de *Saccharomyces cerevisiae*. . In Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) ed., (pp. 130). Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- Rizk, S. W., & Clydesdale, F. M. (1985). Effects of Baking and Boiling on the Ability of Selected Organic Acids to Solubilize Iron from a Corn-Soy-Milk Food Blend Fortified with Exogenous Iron Sources. *Journal of Food Science*, 50(4), 1088-1091.

- Rutz, D. (2012). Efeitos da temperatura e do tempo de armazenamento do trigo sobre parâmetros de avaliação da qualidade dos grãos e das farinhas. In, (pp. 98). Pelotas, RS, Brasil: Universidade Federal de Pelotas.
- Sahuquillo, A., Barbera, R., & Farre, R. (2003). Bioaccessibility of calcium, iron and zinc from three legume samples. *Nahrung*, 47(6), 438-441.
- Sandberg, A. S., Carlsson, N. G., & Svanberg, U. (1989). Effects of Inositol Tri-, Tetra-, Penta-, and Hexaphosphates on In Vitro Estimation of Iron Availability. *Journal of Food Science*, 54(1), 159-161.
- Sanz-Penella, J. M., Laparra, J. M., Sanz, Y., & Haros, M. (2012). Assessment of iron bioavailability in whole wheat bread by addition of phytase-producing bifidobacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(12), 3190-3195.
- Schiller, G. W. (1984). Bakery flour specifications. *Cereal Foods World*, 29(10), 5.
- Schmiele, M., Jaekel, L. Z., Patricio, S. M. C., Steel, C. J., & Chang, Y. K. (2012). Rheological properties of wheat flour and quality characteristics of pan bread as modified by partial additions of wheat bran or whole grain wheat flour. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2141-2150.
- Schons, P. F., Ries, E. F., Battestin, V., & Macedo, G. A. (2011). Effect of enzymatic treatment on tannins and phytate in sorghum (*Sorghum bicolor*) and its nutritional study in rats. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(6), 1253-1258.
- Schumann, K., Ettle, T., Szegner, B., Elsenhans, B., & Solomons, N. W. (2007). On risks and benefits of iron supplementation recommendations for iron intake revisited. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements*, 21(3), 147-168.
- Shittu, T. A., Dixon, A., Awonorin, S. O., Sanni, L. O., & Maziya-Dixon, B. (2008). Bread from composite cassava-wheat flour. II: Effect of cassava genotype and nitrogen fertilizer on bread quality. *Food Research International*, 41(6), 569-578.
- Shockravi, S., Almgren, A., Carlsson, N. G., & Sandberg, A. S. (2012). Dephytinisation of Sangak and Barbari bread made from different extraction rate flours increases iron and zinc bioaccessibility in Caco-2 cells. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(11), 2252-2258.
- Silva, Borges, M. F. M., & Ferreira, M. A. (1999). Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, 22(1), 94-103.

- Silva, & Silva, M. A. A. P. (1999). Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. *Revista de Nutrição*, 12, 21-32.
- Sollars, W. F., & Rubenthaler, G. L. (1975). Flour fractions affecting farinograph absorption [Water-holding properties of wheat flours]. *Cereal Chemistry (USA)*.
- Stojceska, V., & Butler, F. (2008). Digitization of farinogram plots and estimation of mixing stability. *Journal of Cereal Science*, 48(3), 729-733.
- Su-Chuen, N., Alfred, A., Janice, C., & Martin, O. (2007). Characterization of lipid oxidation products in quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Food Chemistry*, 101(1), 185-192.
- Sudha, M. L., & Leelavathi, K. (2008). Influence of micronutrients on rheological characteristics and bread-making quality of flour. *International journal of food sciences and nutrition*, 59(2), 105-115.
- Valdés, S. T. (2010). O efeito de genótipos de feijão e das formas usuais de preparo sobre a atividade antioxidante e a composição nutricional. In, (pp. 101). Florianópolis: Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Valdés, S. T., Coelho, C. M. M., Michelluti, D. J., & Tramonte, V. L. C. G. (2011). Association of genotype and preparation methods on the antioxidant activity, and antinutrients in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2104-2111.
- Vellozo, E. P., & Fisberg, M. (2010). A contribuição dos alimentos fortificados na prevenção da anemia ferropriva. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 32, 140-147.
- Vitali, D., Radić, M., Cetina-Čižmek, B., & Vedrinar Dragujević, I. (2011). Caco-2 cell uptake of Ca, Mg and Fe from biscuits as affected by enrichment with pseudocereal/inulin mixtures. *Acta Alimentaria*, 40(4), 480-489.
- WHO. (2006). Guidelines on food fortification with micronutrientes. In). Geneva: World Health Organization.
- Wintergerst, E. S., Maggini, S., & Hornig, D. H. (2007). Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Annals of nutrition & metabolism*, 51(4), 301-323.
- Yeung, C. K., Miller, D. D., Cheng, Z., & Glahn, R. E. (2005). Bioavailability of Elemental Iron Powders in Bread Assessed with an In vitro Digestion/Caco-2 Cell Culture Model. *Journal of Food Science*, 70(3), S199-S203.

Zhu, L., Glahn, R. P., Nelson, D., & Miller, D. D. (2009). Comparing soluble ferric pyrophosphate to common iron salts and chelates as sources of bioavailable iron in a Caco-2 cell culture model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(11), 5014-5019.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela 1. Valores de acidez titulável em farinha de trigo refinada e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante 120 dias de armazenamento.

FT refinada	Acidez titulável (mL de solução de NaOH 0,1 mol/L/100 g de FT)				
	T1	T2	T3	T4	T5
Controle	1,08 ± 0,02 c,C	1,48 ± 0,07 c,A,B	1,55 ± 0,02 b,A	1,39 ± 0,03 b,c,B	1,17 ± 0,03 b,C
SF	1,22 ± 0,04 a,D	1,97 ± 0,14 a,A	1,65 ± 0,02 a,B	1,41 ± 0,01 b,c,C	1,30 ± 0,05a,b,C,D
FF	1,16 ± 0,00 a,b,E	1,95 ± 0,05 a,A	1,65 ± 0,02 a,B	1,45 ± 0,01 a,b,C	1,31 ± 0,06 a,b,D
Fe R	1,11 ± 0,02 b,c,D	1,48 ± 0,02 c,B	1,70 ± 0,03 a,A	1,41 ± 0,01 b,c,B,C	1,32 ± 0,06 a,C
NaFeEDTA	1,15 ± 0,02 b,C	1,77 ± 0,04 b,A	1,34 ± 0,02 c,B	1,42 ± 0,02 a,b,c,B	1,34 ± 0,06 a,B
SF micro	1,13 ± 0,01 b,c,D	1,56 ± 0,02 c,A	1,33 ± 0,03 c,C	1,49 ± 0,03 a,B	1,28 ± 0,03 a,b,C
FF micro	1,14 ± 0,01 b,c,C	1,60 ± 0,01 b,c,A	1,65 ± 0,02 a,A	1,37 ± 0,05 c,B	1,39 ± 0,04 a,B

Média ± desvio padrão. FT: farinha de trigo; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF micro: fumarato ferroso microencapsulado. T1: início; T2: 30dias; T3: 60 dias; T4: 90 dias; T5: 120 dias. Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tempos ($p < 0,05$).

APÊNDICE B

Tabela 2. Valores dos parâmetros de cor: luminosidade L* e das coordenadas a* e b* em farinha de trigo refinada e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante 120 dias de armazenamento.

FT refinada	T1	T2	T3	T4	T5
	PARÂMETRO L*				
Controle	94,45 ± 0,10 a,b,C	94,46 ± 0,01 a,C	95,89 ± 0,02 a,A	95,23 ± 0,01 a,B	95,28 ± 0,03 a,b,c,B
SF	94,38 ± 0,02 b,D	94,27 ± 0,05 b,D	95,62 ± 0,04 c,A	94,98 ± 0,05 c,C	95,10 ± 0,06 d,B
FF	94,45 ± 0,10 a,b,D	94,39 ± 0,03 a,D	95,81 ± 0,05 a,b,A	95,18 ± 0,04 a,b,C	95,36 ± 0,03 a,B
FeR	94,52 ± 0,05 a,b,C	94,41 ± 0,06 a,C	95,81 ± 0,02 a,b,A	95,19 ± 0,03 a,b,B	95,29 ± 0,06 a,b,B
NaFeEDTA	94,51 ± 0,02 a,b,D	94,44 ± 0,05 a,D	95,75 ± 0,06 b,A	95,20 ± 0,04 a,b,C	95,32 ± 0,05 a,b,B
SF micro	94,57 ± 0,02 a,D	94,48 ± 0,01 a,E	95,76 ± 0,02 b,A	95,16 ± 0,03 a,b,C	95,23 ± 0,02 b,c,B
FF micro	94,53 ± 0,09 a,b,C	94,44 ± 0,04 a,C	95,75 ± 0,03 b,A	95,13 ± 0,02 b,B	95,17 ± 0,05 c,B
FT refinada	COORDENADA a*				
Controle	0,74 ± 0,08 a,A	0,83 ± 0,04 a,A	0,81 ± 0,04 a,A	0,74 ± 0,02 a,A	0,79 ± 0,06 a,A
SF	0,77 ± 0,06 a,A	0,82 ± 0,06 a,A	0,86 ± 0,05 a,A	0,79 ± 0,04 a,A	0,76 ± 0,03 a,A
FF	0,74 ± 0,08 a,A	0,79 ± 0,05 a,A	0,82 ± 0,02 a,A	0,75 ± 0,04 a,A	0,78 ± 0,04 a,A
FeR	0,78 ± 0,08 a,A	0,74 ± 0,04 a,A	0,79 ± 0,03 a,A	0,75 ± 0,03 a,A	0,78 ± 0,03 a,A
NaFeEDTA	0,78 ± 0,03 a,A	0,77 ± 0,06 a,A	0,84 ± 0,05 a,A	0,76 ± 0,02 a,A	0,77 ± 0,04 a,A
SF micro	0,77 ± 0,06 a,A	0,79 ± 0,05 a,A	0,82 ± 0,07 a,A	0,77 ± 0,05 a,A	0,83 ± 0,04 a,A
FF micro	0,78 ± 0,07 a,A	0,77 ± 0,03 a,A	0,8 ± 0,01 a,A	0,80 ± 0,03 a,A	0,80 ± 0,01 a,A
FT refinada	COORDENADA b*				
Controle	10,89 ± 0,09 a,A	10,11 ± 0,64 a,A	10,66 ± 0,08 a,A	10,29 ± 0,21 a,A	10,08 ± 0,14 a,A
SF	10,76 ± 0,06 a,A	10,41 ± 0,07 a,A,B	10,27 ± 0,08 b,B,C	9,95 ± 0,14 a,C,D	9,73 ± 0,27 a,D
FF	10,89 ± 0,09 a,A	10,54 ± 0,06 a,B	10,50 ± 0,07 a,b,B	10,22 ± 0,10 a,C	9,92 ± 0,15 a,D
FeR	10,77 ± 0,10 a,A	10,62 ± 0,14 a,A,B	10,53 ± 0,03 a,A,B,C	10,26 ± 0,25 a,B,C	10,17 ± 0,14 a,C
NaFeEDTA	10,74 ± 0,14 a,A	10,65 ± 0,15 a,A	10,50 ± 0,08 a,b,A,B	10,36 ± 0,23 a,A,B	9,99 ± 0,42 a,B
SF micro	10,74 ± 0,02 a,A	10,46 ± 0,13 a,A,B	10,48 ± 0,06 a,b,A,B	10,20 ± 0,11 a,B,C	10,01 ± 0,17 a,C
FF micro	10,70 ± 0,05 a,A	10,59 ± 0,03 a,A	10,53 ± 0,14 a,A	10,2 ± 0,16 a,B	10,23 ± 0,09 a,B

Média ± desvio padrão. FT: farinha de trigo; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilendiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF micro: fumarato ferroso microencapsulado. T1: início; T2: 30dias; T3: 60 dias; T4: 90 dias; T5: 120 dias. Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05). Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tempos (p<0,05).

APÊNDICE C.

Tabela 3. Índice de peróxido em farinha de trigo refinada e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante 120 dias de armazenamento.

FT refinada	Índice de peróxido (microequivalente de peróxido de hidrogênio/ kg de amostra)				
	T1	T2	T3	T4	T5
Controle	6,20 ± 0,60 d,C	10,80 ± 1,60 b,B	10,20 ± 0,70 b,B	12,50 ± 0,60 a,A	9,30 ± 0,60 b,B
SF	6,90 ± 0,40 d,C	14,70 ± 1,00 a,A	11,50 ± 0,30 a,B	11,60 ± 0,20 b,B	12,40 ± 0,40 a,B
FF	14,10 ± 1,50 a,A	5,60 ± 0,40 c,D	10,10 ± 0,50 b,C	12,00 ± 0,30 a,b,B	12,40 ± 0,40 a,B
Fe R	5,50 ± 0,40 d,C	11,70 ± 1,30 b,A,B	11,20 ± 0,50 a,b,B	12,60 ± 0,30 a,A	12,40 ± 0,40 a,A
NaFeEDTA	8,20 ± 0,50 c,C	11,10 ± 0,50 b,B	12,00 ± 0,90 a,A,B	12,70 ± 0,50 a,A	12,80 ± 0,40 a,A
SF micro	14,70 ± 1,50 b,A	12,20 ± 1,40 b,B	11,60 ± 0,50 a,B	11,50 ± 0,50 b,B	12,60 ± 0,40 a,B
FF micro	11,40 ± 0,80 a,A,B	11,80 ± 1,60 b,A,B	10,30 ± 0,70 b,B	11,50 ± 0,70 b,A,B	12,20 ± 1,30 a,A

Média ± desvio padrão. FT: farinha de trigo; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF micro: fumarato ferroso microencapsulado. T1: início; T2: 30dias; T3: 60 dias; T4: 90 dias; T5: 120 dias. Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tempos ($p < 0,05$).

APÊNDICE D

Tabela 4. Área de hexanal em farinha de trigo refinada e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante 120 dias de armazenamento.

FT Refinada	Área hexanal*				
	T1	T2	T3	T4	T5
Controle	4,41 ± 0,16 d,C	10,29 ± 0,36 e,C	42,31 ± 2,11 d,B	46,13 ± 2,25 c,d,B	55,89 ± 3,99 c,d,A
SF	339,95 ± 5,73 a,E	782,67 ± 12,38 a,A	675,38 ± 18,89 a,B	572,47 ± 12,50 a,C	464,81 ± 24,60 a,D
FF	7,42 ± 0,29 c,d,D	28,73 ± 1,28 d,C	59,12 ± 2,27 d,B	74,02 ± 2,46 c,A	66,03 ± 7,37 c,A,B
Fe R	8,22 ± 0,53 c,d,D	23,18 ± 1,01 d,e,C	58,38 ± 2,25 d,B	66,31 ± 4,33 c,A	69,38 ± 4,22 c,A
NaFeEDTA	6,28 ± 0,13 d,D	10,71 ± 0,36 e,C	36,42 ± 1,13 d,A	30,93 ± 0,81 d,B	36,92 ± 1,04 d,A
SF micro	215,04 ± 3,56 b,B	219,18 ± 9,11 b,A,B	252,38 ± 11,03 b,A	214,58 ± 25,22 b,B	176,85 ± 2,46 b,C
FF micro	13,53 ± 0,87 c,D	87,32 ± 4,36 c,C	174,45 ± 10,58 c,B	208,29 ± 5,32 b,A	185,29 ± 7,16 b,B

Média ± desvio padrão. Área de hexanal* x 10⁴, FT: farinha de trigo; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF micro: fumarato ferroso microencapsulado. T1: início; T2: 30dias; T3: 60 dias; T4: 90 dias; T5: 120 dias. Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05). Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tempos (p<0,05).

APÊNDICE E

Tabela 1. Valores de acidez titulável em farinha de trigo integral e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante 120 dias de armazenamento.

FT integral	Acidez álcool solúvel (mL/100 g amostra)				
	T1	T2	T3	T4	T5
Controle	1,15 ± 0,03 b,D	2,13 ± 0,01 b,A	1,46 ± 0,02 b,c,B	1,23 ± 0,03 c,C	1,42 ± 0,01 b,c,B
SF	1,18 ± 0,03 b,E	1,79 ± 0,02 c,A	1,48 ± 0,02 b,c,C	1,35 ± 0,04 b,D	1,63 ± 0,06 a,B
FF	1,15 ± 0,01 b,E	2,17 ± 0,02 a,b,A	1,50 ± 0,04 b,B	1,26 ± 0,02 b,c,D	1,40 ± 0,03 b,c,C
Fe R	1,17 ± 0,02 b,D	2,13 ± 0,02 b,A	1,43 ± 0,04 b,c,d,B,C	1,53 ± 0,07 a,B	1,38 ± 0,04 b,c,C
NaFeEDTA	1,25 ± 0,01 a,D	2,21 ± 0,04 a,A	1,84 ± 0,02 a,B	1,57 ± 0,02 a,C	1,47 ± 0,07 b,C
SF micro	1,17 ± 0,00 b,E	1,61 ± 0,01 d,A	1,41 ± 0,04 c,d,B	1,24 ± 0,02 c,D	1,34 ± 0,01 c,C
FF micro	1,19 ± 0,02 a,b,C	1,63 ± 0,03 d,A	1,35 ± 0,02 d,B	1,21 ± 0,03 c,C	1,41 ± 0,04 b,c,B

Média ± desvio padrão. FT Integral: farinha de trigo; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF micro: fumarato ferroso microencapsulado. T1: início; T2: 30dias; T3: 60 dias; T4: 90 dias; T5: 120 dias. Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tempos ($p < 0,05$).

APÊNDICE F

Tabela 2. Valores dos parâmetros de cor: luminosidade L* e das coordenadas a* e b* em farinha de trigo integral e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante 120 dias de armazenamento.

FT integral	T1	T2	T3	T4	T5
	PARÂMETRO L*				
Controle	93,06 ± 0,14 C	93,10 ± 0,03 C	94,45 ± 0,05 A	93,86 ± 0,07 B	93,99 ± 0,27 B
SF	93,14 ± 0,04 C	92,90 ± 0,15 C	94,36 ± 0,22 A	93,68 ± 0,22 B	94,03 ± 0,10 A,B
FF	93,05 ± 0,21 C,D	92,99 ± 0,15 D	94,39 ± 0,19 A	93,61 ± 0,32 B,C	94,04 ± 0,21 A,B
FeR	93,33 ± 0,32 C,D	93,04 ± 0,22 D	94,72 ± 0,09 A	93,82 ± 0,12 B,C	93,99 ± 0,20 B
NaFeEDTA	93,11 ± 0,18 C	93,16 ± 0,20 C	94,54 ± 0,14 A	93,76 ± 0,04 B	94,02 ± 0,14 B
SF micro	93,15 ± 0,40 D	93,31 ± 0,15 C,D	94,48 ± 0,09 A	93,69 ± 0,09 B,C	93,92 ± 0,07 B
FF micro	93,56 ± 0,03 B	93,17 ± 0,13 C	94,39 ± 0,25 A	93,81 ± 0,07 B	93,90 ± 0,14 B
FT integral	COORDENADA a*				
Controle	0,92 ± 0,07 A	0,84 ± 0,06 A	0,87 ± 0,03 A	0,82 ± 0,03 A	0,89 ± 0,04 A
SF	0,94 ± 0,07 A	0,92 ± 0,06 A	0,92 ± 0,04 A	0,82 ± 0,05 A	0,82 ± 0,04 A
FF	0,96 ± 0,06 A	0,93 ± 0,06 A	0,93 ± 0,08 A	0,89 ± 0,06 A	0,84 ± 0,06 A
FeR	0,83 ± 0,10 A	0,89 ± 0,06 A	0,84 ± 0,05 A	0,85 ± 0,07 A	0,88 ± 0,02 A
NaFeEDTA	0,93 ± 0,10 A	0,91 ± 0,03 A	0,89 ± 0,05 A	0,88 ± 0,04 A	0,84 ± 0,03 A
SF micro	0,93 ± 0,05 A	0,84 ± 0,03 A	0,92 ± 0,07 A	0,90 ± 0,07 A	0,86 ± 0,03 A
FF micro	0,88 ± 0,03 A	0,85 ± 0,04 A	0,88 ± 0,04 A	0,87 ± 0,05 A	0,84 ± 0,02 A
FT integral	COORDENADA b*				
Controle	10,25 ± 0,24 A	10,06 ± 0,10 A,B	9,95 ± 0,07 A,B	9,74 ± 0,20 B	9,70 ± 0,22 B
SF	10,28 ± 0,24 A	9,97 ± 0,22 A,B	9,75 ± 0,07 A,B,C	9,43 ± 0,24 B,C	9,18 ± 0,35 C
FF	10,27 ± 0,21 A	10,03 ± 0,11 A,B	9,87 ± 0,36 A,B	9,73 ± 0,14 A,B	9,59 ± 0,29 B
FeR	10,29 ± 0,12 A	10,19 ± 0,12 A,B	9,94 ± 0,24 A,B,C	9,83 ± 0,06 B,C	9,67 ± 0,11 C
NaFeEDTA	10,19 ± 0,05 A	9,75 ± 0,40 A	9,99 ± 0,20 A	9,84 ± 0,12 A	9,54 ± 0,40 A
SF micro	10,33 ± 0,14 A	10,16 ± 0,18 A,B	9,88 ± 0,12 B,C	9,54 ± 0,10 C,D	9,52 ± 0,06 D
FF micro	10,29 ± 0,11 A	9,89 ± 0,08 B	9,82 ± 0,06 B,C	9,63 ± 0,23 B,C	9,48 ± 0,09 C

Média ± desvio padrão. FT integral: farinha de trigo; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF micro: fumarato ferroso microencapsulado. T1: início; T2: 30dias; T3: 60 dias; T4: 90 dias; T5: 120 dias. Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tempos ($p < 0,05$).

APÊNDICE G

Tabela 3. Índice de peróxido em farinha de trigo integral e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante 120 dias de armazenamento.

FT Integral	Índice de peróxido (microequivalente de peróxido de hidrogênio/ kg de amostra)				
	T1	T2	T3	T4	T5
Controle	9,90 ± 0,50 b,C	14,80 ± 0,70 a,b,c,A	14,00 ± 0,80 b,A	11,10 ± 0,40 b,c,B	11,40 ± 0,60 c,B
SF	7,20 ± 0,80 c,C	15,7 ± 0,50 a,b,A	15,40 ± 0,70 a,A	11,90 ± 0,50 a,b,B	12,80 ± 0,70 a,b,B
FF	8,8 ± 1,00 b,c,C	13,7 ± 0,60 b,c,A	14,10 ± 1,00 b,A	12,40 ± 0,60 a,B	13,40 ± 0,20 a,A,B
FeR	12,00 ± 1,50 a,B,C	13,00 ± 1,10 c,A,B	13,70 ± 0,60 b,A	11,00 ± 0,60 b,c,C	12,50 ± 0,60 a,b,A,B,C
NaFeEDTA	9,60 ± 0,70 b,C	9,10 ± 1,30 d,C	14,30 ± 0,80 a,b,A	12,40 ± 0,90 a,B	12,50 ± 0,80 b,c,B
SF micro	4,30 ± 0,40 d,D	6,40 ± 0,50 e,C	14,20 ± 0,40 a,b,A	11,00 ± 0,70 b,c,B	11,80 ± 0,50 b,c,B
FF micro	9,6 ± 1,30 b,C	16,50 ± 2,20 a,A	14,00 ± 0,50 b,B	10,00 ± 0,70 c,C	12,50 ± 0,70 a,b,B

Média ± desvio padrão. FT Integral: farinha de trigo; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF micro: fumarato ferroso microencapsulado. T1: início; T2: 30dias; T3: 60 dias; T4: 90 dias; T5: 120 dias. Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tempos ($p < 0,05$).

APÊNDICE H

Tabela 4. Área de hexanal em farinha de trigo integral e fortificada com diferentes compostos de ferro, durante 120 dias de armazenamento.

FT Integral	Área Hexanal*				
	T1	T2	T3	T4	T5
Controle	4,86 ± 0,14 c,D	15,62 ± 1,69 d,e,C	47,23 ± 1,89 d,A	46,79 ± 1,03 e,A	39,48 ± 0,47 c,B
SF	122,71 ± 5,08 b,D	320,49 ± 4,27 a,A	239,23 ± 8,40 a,B	179,16 ± 6,55 b,C	112,59 ± 5,61 b,D
FF	6,08 ± 0,65 c,D	23,38 ± 1,46 d,C	59,85 ± 1,02 c,A	61,15 ± 1,15 d,A	43,66 ± 2,31 c,B
Fe R	5,60 ± 0,38 c,D	22,32 ± 0,45 d,e,C	42,17 ± 1,39 d,e,B	50,46 ± 1,82 e,A	44,28 ± 2,20 c,B
NaFeEDTA	6,50 ± 1,51 c,E	14,58 ± 0,91 e,D	31,25 ± 1,10 e,C	52,55 ± 2,97 d,e,A	47,79 ± 1,54 c,B
SF micro	130,56 ± 4,40 a,D	150,40 ± 5,59 b,C	176,37 ± 5,01 b,B	211,66 ± 1,16 a,A	181,00 ± 5,46 a,B
FF micro	7,40 ± 0,78 c,E	31,31 ± 0,58 c,D	67,01 ± 3,16 c,C	97,08 ± 4,54 c,B	116,56 ± 1,74 b,A

Média ± desvio padrão. *Área de hexanal x 10⁴. FT Integral: farinha de trigo; SF: sulfato ferroso; FF: fumarato ferroso; Fe R: ferro reduzido; NaFeEDTA: sódio ferro etilenodiaminotetracético; SF micro: sulfato ferroso microencapsulado; FF micro: fumarato ferroso microencapsulado. T1: início; T2: 30dias; T3: 60 dias; T4: 90 dias; T5: 120 dias. Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05). Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tempos (p<0,05).