



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARIA ELISA CAETANO SILVA ABREU

**COMPLEXOS FERRO-PEPTÍDEOS DE SORO DE LEITE: OBTENÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO EFEITO PRÓ-OXIDANTE DO FERRO E DE
SUA BIODISPONIBILIDADE POR MODELO DE CULTURA DE CÉLULAS CACO-2**

***WHEY PEPTIDE-IRON COMPLEXES: OBTAINING, CHARACTERIZATION AND
EVALUATION OF IRON PRO-OXIDANT EFFECT AND IRON BIOAVAILABILITY
USING CACO-2 CELL CULTURE MODEL***

CAMPINAS
2017

MARIA ELISA CAETANO SILVA ABREU

**COMPLEXOS FERRO-PEPTÍDEOS DE SORO DE LEITE: OBTENÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO EFEITO PRÓ-OXIDANTE DO FERRO E DE
SUA BIODISPONIBILIDADE POR MODELO DE CULTURA DE CÉLULAS CACO-2**

***WHEY PEPTIDE-IRON COMPLEXES: OBTAINING, CHARACTERIZATION AND
EVALUATION OF IRON PRO-OXIDANT EFFECT AND IRON BIOAVAILABILITY
USING CACO-2 CELL CULTURE MODEL***

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 Alimentos e Nutrição, na Área de Nutrição Experimental e aplicada à Tecnologia 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 and Nutrition, in the area of Experimental Nutrition and applied to Food Technology.

Orientadora: Profa. Dra. Flavia Maria Netto
Coorientadora: Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MARIA ELISA
CAETANO SILVA ABREU, ORIENTADA PELA PROFA.
DRA. FLAVIA MARIA NETTO

CAMPINAS
2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/10356-7; FAPESP, 2015/02254-5; CAPES

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

Si38c Silva Abreu, Maria Elisa Caetano, 1988-
Complexos ferro-peptídeos de soro de leite : obtenção, caracterização e avaliação do efeito pró-oxidante do ferro e de sua biodisponibilidade por modelo de cultura de células Caco-2 / Maria Elisa Caetano Silva Abreu. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Flavia Maria Netto.
Coorientador: Maria Teresa Bertoldo Pacheco.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Fortificação de alimentos. 2. Deficiência de ferro. 3. GC-MS. 4. Estabilidade oxidativa. 5. Espectroscopia infravermelho. 6. Digestão in vitro. I. Netto, Flavia Maria. II. Pacheco, Maria Teresa Bertoldo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Whey peptide-iron complexes : obtaining, characterization and evaluation of iron pro-oxidant effect and iron bioavailability using Caco-2 cell culture model

Palavras-chave em inglês:

Food fortification

Iron deficiency

GC-MS

Oxidative stability

Infrared spectroscopy

In vitro digestion

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutora em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Flavia Maria Netto [Orientador]

Amparo de la Asunción Alegría Torán

Ana Paula Badan Ribeiro

Marco Vinícius Chaud

Solange Guidolin Canniatti Brazaca

Data de defesa: 26-06-2017

Programa de Pós-Graduação: Alimentos e Nutrição

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Flavia Maria Netto - Membro titular
Orientadora

Profa. Dra. Amparo de la Asunción Alegría Torán - Membro titular
Facultat de Farmàcia/Universitat de València

Profa. Dra. Ana Paula Badan Ribeiro - Membro titular
Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP

Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud - Membro titular
Departamento de Ciências Farmacêuticas/UNISO

Profa. Dra. Solange Guidolin Canniatti Brazaca - Membro titular
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP

Prof. Dr. Guilherme Miranda Tavares - Membro suplente
Faculdade de Engenharia de Alimentos /UNICAMP

Profa. Dra. Regina Célia Galvão Frem - Membro suplente
Instituto de Química de Araraquara/UNESP

Profa. Dra. Solange Cadore - Membro suplente
Instituto de Química/UNICAMP

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no
processo de vida acadêmica do aluno.

*"Para ser grande, sê inteiro.
Nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim, em cada lago, a lua toda brilha,
Porque alta vive"*

*Ricardo Reis
(heterônimo de Fernando Pessoa)*

À minha família, minha base e fortaleza.

*Meu amor **Bruno**, meus pais **Silvia e Luiz**, minha
irmã **Maria Clara** e meu irmão, para sempre em
nossos corações, **Luiz Fernando**.*

*Obrigada por acreditarem em mim! Obrigada por
serem amparo nos dias mais cinza e sorriso nos
dias mais coloridos!*

*A vocês, dedico este trabalho e minha eterna
gratidão!*

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado (Processo nº 2013/10356-7) e da bolsa de estágio de pesquisa no exterior – BEPE (Processo nº 2015/02254-5).

À minha orientadora, Profa. Dra. Flavia Maria Netto, pela atenção, dedicação e competência que me orientaram na busca de respostas para tantas perguntas ao longo desse trabalho e me auxiliaram a chegar onde cheguei. Obrigada por tudo!

À minha coorientadora, Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco, que esteve presente desde o início da descoberta da minha paixão pela pesquisa. Obrigada pelo apoio, orientação e amizade!

Aos membros da Comissão Examinadora, por terem colocado sua experiência a serviço desse trabalho, engrandecendo nosso resultado final. Muito obrigada!

Ao meu marido, Bruno, meu namorado, amigo, companheiro e entusiasta! Obrigada pelo amor sem medida, que me empurra para frente, que me faz querer ser mais. Obrigada por me apoiar em todas as minhas escolhas e vivê-las comigo (mesmo quando isso custe trabalhar à distância para estar comigo na Espanha)! Obrigada por acreditar em mim até quando eu duvido. Com você, meus dias têm cores que eu nem podia imaginar!

Aos meus pais, Sílvia e Luiz, meu porto-seguro, meu grande exemplo! Obrigada por me ensinarem o sentido da palavra entusiasmo, me mostrando como é necessário ter Deus dentro de si para seguir em frente, sem desistir, e contagiar outras pessoas ao longo do caminho. Obrigada por me ensinarem a ter coragem e assumir minhas escolhas, ainda que cada uma delas fosse também uma renúncia. Obrigada por não desistirem e, assim, ensinarem da maneira mais linda o *carpe diem*: vivendo-o! Obrigada por, no meio da tempestade, ainda conseguirem ser meu esteio!

Ao meu irmão, a quem eu tanto amei e sempre vou amar, Luiz Fernando. O que você deixou de mais bonito foi sua forma intensa de viver o hoje, o agora, sem pensar no amanhã, sua forma inteira de amar, sua capacidade fantástica de fazer e preservar amigos. Lufe, aprendi muito com você! O que você foi, ainda é. Dentro de nós. Obrigada, meu irmão! De onde estiver, espero que sinta orgulho dessa baixinha e sinta meu abraço, com os pés fora do chão!

À minha irmã-amiga, amiga-irmã, Maria Clara. Obrigada pela amizade tão pura e sincera, pelo olhar interessado e preciso de engenheira, pelos conselhos de quem ama e quer ver feliz. Obrigada por querer sempre minha felicidade e, de repente, ser parte dela, nas mínimas coisas! Cá, obrigada por ser um pedacinho tão importante de mim! Agradeço também ao meu

cunhado PC, tão querido e sempre disposto a ajudar! Obrigada por ser parte essencial do que faz meus dias mais felizes!

A toda minha família, por tudo o que representam para mim. Aos meus sogros, Cely e Carmélio, pelo carinho e presença, mesmo que fisicamente distante, à Tia Vaide, Vó Áurea, meus padrinhos, meus tios e primos (sejam Caetano, Silva ou Moreira Abreu), obrigada pela presença constante, torcida e todo amor!

A todos aqueles que me auxiliaram na realização das mais diversas análises, disponibilizando seus laboratórios, dedicando seu tempo e paciência:

À Professora Regina Frem e seus alunos (Laboratório de Compostos Organometálicos, Instituto de Química, UNESP - Araraquara), pelo auxílio na realização das análises de infravermelho e análise térmica. Especialmente à Regina, obrigada pela amizade e carinho! Obrigada por acreditar no nosso trabalho e me incentivar, sempre!

Ao Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (Laboratório Nacional de Biociências – LNBio/CNPEM, Campinas/SP), pelo suporte nas análises de fluorescência.

À Professora Ana Paula Badan (Laboratório de Óleos e Gorduras, DTA/FEA), pelos conselhos e apoio nas análises de Rancimat e índice de peróxido.

À Professora Roseani Cunha (Laboratório de Engenharia de Processos, DEA/FEA), pela disponibilidade em oferecer o laboratório, e à Vanessa Silva e Andresa Gomes, pela paciência e disponibilidade em me ajudar no preparo das emulsões, quantas vezes fossem necessárias, sempre com um sorriso no rosto.

À Professora Marise Pollonio e sua aluna Camila Pagliarini (Laboratório de Carnes e Derivados, DTA/FEA), pelo auxílio com a análise de TBARS.

À Professora Juliana Pallone, Ana Paula Rebellato e Eduardo Orlando (Laboratório de Análise de Alimentos II, DCA/FEA), por me auxiliarem na determinação de ferro.

À Professora Neura Bragagnolo (Laboratório de Química de Alimentos II, DCA/FEA), por possibilitar a análise das minhas emulsões por GC-MS, e à Professora Lilian Mariutti, pela disponibilidade e atenção em me ensinar sobre GC-MS.

À empresa Albion, pela gentileza na doação do bisglicinato ferroso (Ferrochel®).

Aos Professores Amparo Alegría e Antonio Cilla, ao grupo Bionutest e ao Laboratório de Bromatología, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Valência. Obrigada por terem feito sentir-me em casa desde o primeiro dia. Agradeço também ao Professor Rafael Boluda e Guadalupe (Laboratório de Edafología), pelo apoio nas determinações de ferro.

Aos amigos de Valência, que conheci no Laboratório de Bromatologia: Abi, Andrea, Emilio, Gabi, Islam, Juana, Kamila, Laura, Lorena, María, Sonia, Toni e Virgínia, e também aos que a vivência fora da Universidade me trouxe: Adriane, Dulce, Emanuel, Eva, Flor, Francisco, Gabriela (Plok), Lorena, Pablo, Rosa, Sara. Obrigada por terem tornado uma das etapas dessa caminhada muito mais leve e colorida! Especialmente ao Gabi, pela enorme dedicação, generosidade e paciência em compartilhar seu conhecimento sobre células, e à Plok, por ter se tornado mais do que colega de faculdade, por ter sido uma companheira incrível em todos os momentos!

Ao meu querido LBN, pelo espírito de equipe e amizade ímpar que construímos! Minhas amigas Beth, Eliana, Fabi, Fer, Fran, Ju, Nat e Tássia, obrigada pelos conselhos, abraços, risadas, pitacos nas análises, ombro pra chorar, incentivo, gargalhadas, comilanças. Esses longos anos seriam menos coloridos sem vocês! Obrigada por deixarem a marca LBN gravada no meu coração! Especialmente à Fer, meu modelinho de doutora que defendeu antes de mim e tirou todas as minhas dúvidas sobre boneco, tese, defesa, videoconferência, concursos etc., obrigada por tudo!

À Jana, minha amiga que o mestrado me deu e ninguém tira mais da minha vida. Obrigada por ser tão companheira!

À minha querida amiga Paula Okuro, pelos conselhos de emulsão e de como encarar a vida.

Aos meus amigos “De sempre”, pela presença constante em minha vida, pelo interesse na minha felicidade, pelo apoio e torcida pelo meu sucesso. Especialmente à Carol e Simone, pelos conselhos carinhosos e preocupados de quem já trilhou essa estrada, e à Débora, meus 2/3, que sempre me motiva e acredita em mim. Seu incentivo me joga pra frente!

Ao COTUCA, especialmente à turma TA 03, por ser parte essencial da minha vida. Lugar onde eu descobri minha paixão pelo mundo dos alimentos e onde fiz amigos pra uma vida toda! Agradeço especialmente às minhas amigas Aline, Bá, Bruna, Fer, Gi, Grush, Jô, Mayla e Nath, pela amizade incomparável, e ao Professor Pedro (que agora é ESALQ!) pela presença, incentivo e exemplo.

À ESALQ, por ter possibilitado que eu me tornasse Cientista dos Alimentos, profissão da qual tenho tanto orgulho, apesar das dificuldades que enfrentamos. Agradeço de coração às minhas amigas da República Bombanulã (Lícia Mimo, Lilian Suingue e Marília Kõxas) pela amizade linda, que rompeu as barreiras do morar junto, do estar longe e da correria do dia-a-dia e que, agora, é presença constante nas nossas vidas!

À Universidade de Campinas e à Faculdade de Engenharia de Alimentos, especialmente ao Departamento de Alimentos e Nutrição, por possibilitarem a realização de um sonho, com todo o suporte necessário para a minha formação como Doutora.

Com certeza, tive ajuda de MUITA gente! Profissional, pessoal, acadêmica, técnica, emocional... todo tipo de ajuda! Eu louvo a Deus por ter encontrado cada um de vocês! Muito obrigada de coração!

Acima de tudo, agradeço a Deus! Pela minha vida e por todas as vidas que cruzaram o meu caminho. Pela força que me deu a cada dia, por me mostrar que é para seguir sem desistir, por possibilitar que eu terminasse essa fase com a certeza de que me fortalecerá para outras que virão.

RESUMO

A fortificação de alimentos com ferro tem sido um desafio, pois, na forma de sal, como é comumente empregado, o mineral apresenta baixa biodisponibilidade e promove alterações sensoriais e oxidação lipídica. O presente trabalho objetivou sintetizar e caracterizar complexos peptídeo-Fe, utilizando FeCl_2 e FeSO_4 como precursores de ferro, e estudar possíveis efeitos da complexação sobre o mineral em sua biodisponibilidade *in vitro* e efeito pró-oxidante. Para sintetizar os complexos, foram usados como ligantes isolado proteico de soro de leite (IPS), IPS hidrolisado com pancreatina e suas frações obtidas por ultrafiltração com membrana de corte molecular de 5 kDa. Os espectros de fluorescência dos ligantes mostraram redução significativa na intensidade de emissão de fluorescência com aumento da concentração de ferro. Possivelmente, a mudança de conformação do ligante durante o processo de coordenação do ferro levou à alteração do microambiente de resíduos de triptofano (Trp). A coordenação do ferro pelos ligantes, com ambas as fontes de ferro, ocorreu principalmente por ligação bidentada com grupos carboxílicos, evidenciada por bandas referentes aos modos vibracionais estiramento assimétrico e simétrico da ligação COO-Fe em espectro infravermelho (IR). A fonte de ferro influenciou a estrutura do complexo, possivelmente pela presença dos contra-íons cloreto e sulfato, os quais exercem um importante papel na conformação do ligante e, conseqüentemente, do complexo formado. A coordenação do ferro por todos os ligantes favoreceu a formação de complexos estáveis sob digestão gastrointestinal *in vitro*, resultando em bioacessibilidade > 85% em todos os casos. No entanto, os complexos sintetizados com peptídeos de baixa massa molecular ($\text{MM} < 5$ kDa) e FeCl_2 resultaram em maior síntese de ferritina em células Caco-2 em relação ao sulfato ferroso. Esse fato sugere que a via de captação do ferro em sua forma complexada está relacionada não só à capacidade do complexo em proteger o ferro durante a passagem pelo trato gastrointestinal e transportá-lo até as proximidades dos enterócitos, mas também à via de absorção convencional do ligante. A fonte de ferro influenciou sua biodisponibilidade *in vitro*, possivelmente devido à diferença de estrutura entre os complexos, evidenciando a importância da escolha da fonte de ferro. Além do aspecto da biodisponibilidade *in vitro*, a complexação do ferro resultou em redução de seu efeito pró-oxidante, evidenciada pelo decréscimo da formação de produtos primários e secundários da oxidação lipídica em emulsão óleo-em-água, em relação à forma livre do mineral. Emulsões contendo complexos peptídeo-Fe apresentaram formação de peróxidos e hexanal cerca de 60-80% e 85-100% inferior ao observado para emulsões contendo ferro na forma de sal, respectivamente. A adição dos complexos às emulsões resultou em menor oxidação lipídica possivelmente devido à ação antioxidante dos peptídeos e também à sua capacidade de manter o ferro coordenado e, portanto, menos reativo. Os complexos peptídeo-Fe apresentam-se, portanto, como alternativa promissora para fortificação de alimentos ao invés do sulfato ferroso, um dos sais mais utilizados nessa prática. A aplicação do complexo peptídeo-Fe apresenta potencial de aumento da absorção de ferro e redução de seu efeito pró-oxidante. Assim, pode favorecer a redução de alterações sensoriais indesejáveis nos produtos, diminuir os efeitos colaterais associados ao ferro livre, bem como os danos oxidativos nas membranas celulares no organismo.

Palavras-chave: fortificação de alimentos; deficiência de ferro; complexação de ferro; peptídeos do soro de leite; espectroscopia de infravermelho; digestão *in vitro*; estabilidade oxidativa; GC-MS.

ABSTRACT

Food fortification with iron has been challenging, since in salt form, as commonly applied, iron shows low bioavailability and promotes undesirable sensory changes and lipid oxidation. The present work aimed to synthesize and characterize peptide-iron complexes using FeCl_2 or FeSO_4 as iron precursor compounds, and to study possible effects of complexation, concerning *in vitro* iron bioavailability and its pro-oxidant effect. To synthesize the complexes, whey protein isolate (WPI), WPI hydrolyzed with pancreatin and its fractions obtained by ultrafiltration using a 5 kDa cut off membrane, were used as ligands. The fluorescence spectra of ligands showed dramatic decrease in fluorescence intensity as iron concentration increased. Possibly, ligand conformation changes during the process of iron coordination led to changes in tryptophan (Trp) microenvironment. Iron coordination by the ligands, for both iron sources, occurred mainly through bidentate coordination mode with carboxyl groups, evidenced by infrared (IR) bands assigned to the vibrational modes asymmetric and symmetric stretching of COO-Fe bond. The iron source influenced the complex structure, possibly due to the counterions chloride and sulfate, which exert a crucial role in the conformation of the ligand and, consequently, the formed complex. Iron coordination by all the ligands favored the formation of complexes stable under gastrointestinal *in vitro* digestion, leading to bioaccessibility > 85% in all cases. Nevertheless, the complexes synthesized with low-molecular-mass peptides ($\text{MM} < 5$ kDa) and FeCl_2 led to higher ferritin synthesis in Caco-2 cells than ferrous sulfate. This fact suggests that the pathway of iron uptake in its complexed form is related not only to the capacity to protect iron during gastrointestinal tract and to take it near to the enterocyte, but also to the normal ligand pathway. The iron source influenced the *in vitro* bioavailability, possibly due to the differences in complexes structures, evidencing the great importance of the iron source choice. Besides the *in vitro* bioavailability aspect, iron complexation led to decrease in its pro-oxidant effect, evidenced by the reduction of primary and secondary lipid oxidation products formation in oil-in-water emulsions, in relation to the mineral free form. Emulsions containing peptide-iron complexes showed peroxide and hexanal formation around 60-80% and 85-100% lower than the emulsions containing iron in salt form, respectively. The addition of peptide-iron complexes to the emulsions resulted in much lower lipid oxidation possibly due to the antioxidant activity of the peptides and their capacity to keep iron coordinated and therefore less reactive. The peptide-iron complex is therefore a promising alternative for food fortification instead of ferrous sulfate, one of the most widely used salts for this practice. The use of this complex shows potential to increase iron absorption and to decrease its pro-oxidant effect. Thus, it can favor the reduction of undesirable sensory changes in food products, diminish the side effects related to free iron, as well as the oxidative damages in the cell membranes in the organism.

Keywords: food fortification; iron deficiency; iron complexation; whey peptides; infrared spectroscopy; *in vitro* digestion; oxidative stability; GC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Via de absorção do ferro pelos enterócitos	26
Figura 2.	Etapas do processo de peroxidação lipídica	44
Artigo 1	Synthesis of whey peptide-iron complexes: influence of using different iron precursor compounds	
Figure 1.	(A) Chromatographic profile (RP-HPLC) and (B) electrophoretic profile (SDS-PAGE Tricine) of ligands	54
Figure 2.	Fluorescence emission spectra of ligands H - hydrolysate; F – filtrate (fraction < 5 kDa); R – retentate (fraction > 5 kDa); WPI – whey protein isolate (5 mg protein/mL) without iron addition (dashed lines) and with addition of C - FeCl ₂ or S - FeSO ₄ (full lines) in different iron:protein ratios ..	55
Figure 3.	Iron solubility (%) after complexes synthesis (pH 7.0) under ratio protein:Fe (w/w) of 40:1 or 5:1 with FeCl ₂ (C) or FeSO ₄ (S)	57
Figure 4.	IR spectra of H - hydrolysate and its complexes (H-Fe); F - filtrate (fraction < 5 kDa) and its complexes (F-Fe); R - retentate (fraction > 5 kDa) and its complexes (R-Fe); and WPI – whey protein isolate and its complexes (WPI-Fe) synthesized from FeCl ₂ (-Fe C) or FeSO ₄ (-Fe S)	60
Figure 5.	TG and DTA curves of filtrate (fraction < 5 kDa) (F) and respective complexes synthesized with FeCl ₂ (F-Fe C) or FeSO ₄ (F-Fe S)	63
Artigo 2	Evaluation of <i>in vitro</i> iron bioavailability in free form and as whey peptide-iron complexes	
Figure 1.	(A) Iron solubility in free form (FeCl ₂ or FeSO ₄) and complexed with hydrolysate (H-Fe), filtrate (F-Fe), retentate (R-Fe) or WPI (WPI-Fe) as a function of pH; S: Complexes with FeSO ₄ ; C: Complexes with FeCl ₂ ; Bis-Fe: ferrous bisglycinate. (B) Protein solubility in peptide-iron complexes as a function of pH.....	78
Figure 2.	Iron bioaccessibility (%)* in free and complexed forms. *Soluble iron after <i>in vitro</i> gastrointestinal digestion and centrifugation (3200g/60 min, 4 °C)	79
Figure 3.	Iron bioavailability (ng ferritin/mg cell protein) in free and complexed forms	80
Artigo 3	The effect of peptide-iron complexation in decreasing the lipid oxidation catalyzed by iron	
Figure 1.	Peroxide value (PV) of canola oil O/W emulsion containing 1mM Fe in free and complexed forms	97
Figure 2.	Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) of canola oil O/W emulsion containing 1mM Fe in free and complexed forms	99
Figure 3.	Total Ion Chromatograms (TIC) (<i>m/z</i> 35–350) of volatile compounds obtained by HS–SPME–GC–MS, of canola oil O/W emulsion.	102
Figure 4.	Hexanal (area under the GC-MS chromatographic peak; SIM MODE – <i>m/z</i> 44) of canola oil O/W emulsion containing 1mM Fe in free and complexed forms	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características de compostos de ferro comumente utilizados para fortificação de alimentos: solubilidade, biodisponibilidade e custo	30
Artigo 1	Synthesis of whey peptide-iron complexes: influence of using different iron precursor compounds	
Table 1.	Main absorption bands in the infrared and assignments of the corresponding vibrational modes of free ligands (H - hydrolysate; F - filtrate; R – retentate, and WPI - whey protein isolate) and their respective iron complexes, obtained from FeCl ₂ (-Fe C) or FeSO ₄ (-Fe S)	58
Table 2.	Initial and final temperatures (°C), partial mass losses (%), and DTA peaks (°C) of filtrate (F) and the corresponding peptide-iron complexes, F-Fe C and F-Fe S	64
Artigo 3	The effect of peptide-iron complexation in decreasing the lipid oxidation catalyzed by iron	
Table 1.	Target fragments (<i>m/z</i>) used to identify and quantify the volatile lipid oxidation products (VLOPs) by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) gas chromatography coupled with a mass spectrometer detector (GC-MS)	95
Table 2.	Volatile lipid oxidation products (area under the GC-MS chromatographic peak; SIM MODE) identified in canola oil O/W emulsion containing 1mM Fe in free and complexed forms	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	<i>Atomic Absorption Spectrophotometry</i>
Asp	Ácido aspártico
Bis-Fe	<i>Ferrous bisglycinate</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (Albumina de soro bovino)
DH	<i>Degree of hydrolysis</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMEM FeF	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium depleted of iron</i>
DMT-1	<i>Divalent metal transporter</i>
DTA	<i>Differential thermal analysis</i>
E/S	<i>Enzyme:substrate ratio (w/w)</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
F	Fração filtrado (MM < 5 kDa) do hidrolisado (H) ultrafiltrado
F + C	Fração filtrado (MM < 5 kDa) + FeCl ₂
F + S	Fração filtrado (MM < 5 kDa) + FeSO ₄
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
F-Fe C	Complexo fração filtrado (MM < 5kDa) e FeCl ₂
F-Fe S	Complexo fração filtrado (MM < 5kDa) e FeSO ₄
GC-MS	<i>Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry</i>
Glu	Ácido glutâmico
H	Hidrolisado proteico de soro de leite obtido por hidrólise enzimática com pancreatina
H-Fe C	Complexo hidrolisado e FeCl ₂
H-Fe S	Complexo hidrolisado e FeSO ₄
HS-SPME	<i>Headspace–solid-phase microextraction</i>
IR	<i>Infrared spectroscopy</i> (Espectroscopia de absorção vibracional no infravermelho)
m/z	Relação massa/carga
MDA	<i>Malonaldehyde</i> (Malonaldeído)
MM	<i>Molecular mass</i> (Massa molecular)
MTT	<i>3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,3-diphenyl tetrazolium bromide</i>
n-3	Ácido graxo ômega 3
n-6	Ácido graxo ômega 6
n-9	Ácido graxo ômega 9
O/W	<i>Oil-in-water</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde

PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
Phe	<i>Phenylalanine</i> (Fenilalanina)
PV	<i>Peroxide value</i>
R	Fração retentado (MM > 5 kDa) do hidrolizado ultrafiltrado
R-Fe C	Complexo fração retentado (MM > 5kDa) e FeCl ₂
R-Fe S	Complexo fração retentado (MM > 5kDa) e FeSO ₄
ROS	<i>Reactive oxygen specie</i>
RP-HPLC	<i>Reversed phase high performance liquid chromatography</i>
RT	<i>Retention time</i>
RSD	<i>Relative standard deviation</i>
SDS-PAGE	<i>Tricine–sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SPME-GC-MS	<i>Solid-phase micro-extraction - Gas chromatography coupled with mass spectrometry</i>
TBA	<i>Thiobarbituric acid</i> (Ácido tiobarbitúrico)
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrtico)
TEER	<i>Transepithelial electrical resistance</i>
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
TG	<i>Thermogravimetry analysis</i>
Trp	<i>Tryptophan</i> (Triptofano)
Tyr	<i>Tyrosine</i> (Tirosina)
VLOP	<i>Volatile lipid oxidation product</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WPI	<i>Whey protein isolate</i> (Isolado proteico de soro de leite)
WPI-Fe C	Complexo WPI e FeCl ₂
WPI-Fe S	Complexo WPI e FeSO ₄
α-La	Alfa-lactoalbumina
β-Lg	Beta-lactoglobulina

SUMÁRIO

1. Introdução	20
2. Revisão bibliográfica.....	24
2.1. Ferro e absorção	24
2.2. Deficiência de ferro e fortificação.....	27
2.3. Complexação do ferro	32
2.4. Peptídeos ligantes de ferro	33
2.5. Proteínas do soro de leite	35
2.6. Caracterização da interação peptídeo-Fe	36
2.6.1. Espectroscopia de Fluorescência	36
2.6.2. Espectroscopia de Infravermelho.....	37
2.6.3. Análise térmica	38
2.7. Biodisponibilidade do ferro e células Caco-2	39
2.8. Efeito pró-oxidante do ferro e oxidação lipídica	43
2.8.1. Avaliação da oxidação lipídica	46
Artigo 1. Synthesis of whey peptide-iron complexes: influence of using different iron precursor compounds.....	48
1. Introduction.....	49
2. Material and Methods	50
2.1. Material.....	50
2.2. Preparation of hydrolysate and its fractions	50
2.3. Characterization of the ligands	50
2.3.1. Chromatography	50
2.3.2. Electrophoresis.....	51
2.4. Intrinsic fluorescence spectroscopy	51
2.5. Synthesis of peptide-iron complexes	51
2.6. Determination of iron content.....	52
2.7. Characterization of the complexes.....	52
2.7.1. Infrared spectroscopy	52
2.7.2. Thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis (DTA)	53
2.8. Statistical analysis	53
3. Results and Discussion	53
3.1. Characterization of the ligands	53
3.2. Intrinsic fluorescence spectroscopy	54
3.3. Synthesis of peptide-iron complexes	56
3.4. Characterization of the complexes: Infrared spectroscopy and thermal analysis....	57

3.4.1.	Iron coordination by the ligands	59
3.4.2.	Influence of the iron precursor compounds	61
4.	Conclusion.....	65
	References	66
Artigo 2. Evaluation of in vitro iron bioavailability in free form and as whey peptide-iron complexes		69
1.	Introduction.....	70
2.	Material and methods	71
2.1.	Reagents	71
2.2.	Preparation of ligands: Hydrolysate and its fractions.....	72
2.3.	Synthesis of whey peptide-iron complexes	72
2.4.	Determination of iron	72
2.5.	Evaluation of iron solubility and in vitro absorption in free and complexed forms ...	73
2.5.1.	Iron solubility at different pH levels	73
2.5.2.	<i>In vitro</i> gastrointestinal digestion and iron bioaccessibility.....	74
2.5.3.	Iron bioavailability	74
2.6.	Statistical analysis	76
3.	Results	76
3.1.	Synthesis of whey peptide-iron complexes	76
3.2.	Iron solubility at different pH levels	77
3.3.	Iron bioaccessibility.....	78
3.4.	Cell viability by MTT assay	79
3.5.	Iron bioavailability	80
4.	Discussion	81
5.	Conclusions	83
	References	84
Artigo 3. The effect of peptide-iron complexation in decreasing the lipid oxidation catalyzed by iron.....		88
1.	Introduction.....	89
2.	Material and Methods	90
2.1.	Material.....	90
2.2.	Synthesis of peptide-iron complexes	91
2.3.	Iron analysis	91
2.4.	Oil-in-water emulsion preparation	92
2.5.	Primary products of lipid oxidation: peroxide value (PV)	92
2.6.	Secondary products of lipid oxidation.....	93
2.6.1.	TBARS	93
2.6.2.	Volatile lipid oxidation products (VLOPS) by SPME-GC-MS.....	94

2.7. Statistical analysis	95
3. Results	96
3.1. Primary products of lipid oxidation	96
3.2. Secondary products of lipid oxidation.....	98
3.2.1. TBARS	98
3.2.2. Volatile lipid oxidation products (VLOPs) by SPME-GC-MS.....	100
4. Discussion	104
5. Conclusion.....	107
References	108
3. Discussão geral	113
4. Conclusão	118
5. Referências	120
ANEXO.....	138

1. Introdução

A anemia ferropriva, cuja principal causa é a deficiência de ferro, constitui um dos principais problemas nutricionais no mundo. Apresenta consequências negativas do ponto de vista de saúde e também impactos no desenvolvimento econômico e social em muitos países (WHO, 2015). De acordo com a estimativa de 2011, feita pela Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 800 milhões de crianças e mulheres, principais grupos vulneráveis, são afetadas pela anemia. Nesse mesmo ano, a maior prevalência de anemia foi em crianças, aproximadamente 42% (WHO, 2015). A deficiência de ferro tem importantes consequências para a saúde humana e o desenvolvimento infantil: mulheres anêmicas e seus filhos apresentam alto risco de morte durante o período pré-natal; o desenvolvimento físico e mental de crianças é atrasado ou comprometido; e a capacidade de trabalho físico e produtividade de trabalhadores manuais podem ser reduzidas (Haas e Brownlie, 2001; Ren *et al.*, 2011).

Sendo o ferro cofator de várias enzimas, muitos órgãos ou sistemas apresentam alterações funcionais e estruturais quando o organismo não recebe suficiente aporte do nutriente. O ferro, como micronutriente essencial, está envolvido na formação dos glóbulos vermelhos, transporte de O₂ e CO₂, transferência de elétrons, reações de oxirredução e produção de energia celular. Além disso, contribui na proteção ao sistema imunológico, formação de purinas, remoção de lipídios do sangue, produção de anticorpos, síntese de DNA e divisão celular (Lieu *et al.*, 2001). A deficiência severa de ferro pode provocar alterações na estrutura e funções de tecido epitelial, em especial da boca, língua e estômago. Ocasionalmente, ainda, redução da resposta imunológica, visto que o ferro é essencial para o desenvolvimento e integridade do tecido linfóide; podem ainda ocorrer alterações de termorregulação devido à redução significativa de hormônios tireoideanos, dentre outras alterações (Cook e Reusser, 1983; Dallman, 1989).

Desse modo, surge a necessidade de reduzir a prevalência dessa deficiência. A OMS sugere a fortificação de alimentos como estratégia, a qual tem sido adotada em muitos países para alcançar as metas de controle de deficiências de micronutrientes, como o ferro (WHO, 2015). Atualmente, aproximadamente 68 países realizam fortificação obrigatória de farinhas (Quintaes *et al.*, 2017). A Legislação Brasileira, pela Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, tornou obrigatória a fortificação de farinhas de trigo e milho com ferro (4,2 mg/100g) e ácido fólico (150 mcg/100g). A Legislação permite a utilização de sulfato ferroso desidratado, fumarato ferroso, ferro reduzido, ferro eletrolítico, etileno diamino tetracético de sódio e ferro (NaFeEDTA), bisglicinato ferroso e outros compostos de biodisponibilidade não inferior à dos compostos permitidos (Brasil, 2007).

A fortificação de um produto amplamente consumido por toda a população, como a farinha, pode contribuir para a redução da prevalência da anemia. No entanto, se considerarmos um público específico, que de fato necessite aumentar a ingestão e a absorção de ferro, essa estratégia demanda maiores esforços. Isso porque problemas recorrentes associados a essa prática podem comprometer a eficácia da fortificação, sendo o principal deles a reduzida biodisponibilidade do ferro (Sugiarto *et al.*, 2009).

O ferro nos alimentos pode ser encontrado em duas formas: ferro heme e não heme. O ferro não heme, ou ferro inorgânico, por não ser estável como o ferro heme, é fortemente influenciado por outros componentes da dieta (Anderson e Frazer, 2005), apresentando taxa de absorção inferior a 10% (Martínez-Navarrete *et al.*, 2002). Considerando que o ferro usado na fortificação é muitas vezes empregado em sua forma inorgânica, produtos fortificados podem, portanto, apresentar os mesmos problemas de baixa biodisponibilidade. Desse modo, nos últimos anos, tem-se buscado alternativas de ferro mais biodisponível para fortificação de alimentos.

Por outro lado, além da biodisponibilidade, outro fator de extrema importância influencia a escolha do composto a ser usado. Um dos maiores desafios nessa escolha é a relação biodisponibilidade *versus* estabilidade. Isso porque, na maioria das vezes, quanto mais biodisponível, mais reativo é o composto. Os compostos de ferro solúveis em meio aquoso, os quais são mais biodisponíveis, geralmente promovem o desenvolvimento de cor e odor indesejáveis no alimento, além de poder ocasionar rancidez em produtos lipídicos. Compostos insolúveis, por outro lado, não causam alterações sensoriais, mas podem ser tão pouco absorvidos a ponto de não apresentarem qualquer efeito nutricional (Hurrell, 2002).

O sulfato ferroso tem sido utilizado para controle da anemia há muitos anos, porém, devido ao fato de ser altamente reativo, promove alterações de cor e sabor nos produtos em que é empregado, podendo ocasionar sua rejeição. Do ponto de vista biológico, a reatividade do ferro pode catalisar a peroxidação de lipídeos de membranas biológicas, inativação de enzimas e danos à estrutura do DNA (Uchida *et al.*, 2006; Schümann *et al.*, 2007), além de promover efeitos colaterais no sistema gastrointestinal, como azia, dor abdominal, náusea e diarreia (Mimura *et al.*, 2008). Esses fatores associados levam à diminuição da eficácia do tratamento. Para a fortificação de alimentos, é crucial que o ferro adicionado não cause alterações sensoriais indesejadas no alimento, bem como efeitos colaterais no organismo, além de ser bem absorvido. Desse modo, a eficácia da fortificação com esse mineral continua sendo um desafio.

Uma alternativa para reduzir os problemas associados à fortificação de alimentos com ferro é a complexação do mineral, uma vez que micronutrientes organicamente ligados,

incluindo o ferro, podem apresentar biodisponibilidade superior, sendo melhor absorvidos no trato digestório de humanos e de outros animais superiores (Davis *et al.*, 2008). No entanto, enquanto alguns compostos podem contribuir para manter o ferro em uma forma solúvel e absorvível, outros podem se ligar ao ferro fortemente e impedir sua absorção (Anderson e Frazer, 2005). Sendo assim, a formação de complexos com o ferro pode influenciar positiva ou negativamente sua absorção, dependendo das características do complexo formado (Kratzer e Vohra, 1986).

Outro aspecto da complexação é como eles são formados. Complexos podem ser formados durante a digestão ou podem já estar presentes no composto de fortificação. A interação do ferro com outros componentes da dieta pode formar complexos, os quais podem aumentar ou diminuir sua absorção. Existem estudos que abordam a complexação do ferro por peptídeos durante o processo de digestão (Etcheverry *et al.*, 2004; Argyri *et al.*, 2007; Argyri *et al.*, 2009; Ou *et al.*, 2010). Por outro lado, a complexação do ferro previamente à ingestão tem o objetivo de proteger o ferro ao longo do trato gastrointestinal e aumentar sua absorção.

Existem compostos de ferro utilizados para fortificação em sua forma complexada, como EDTA de sódio e ferro (NaFeEDTA), pirofosfato férrico ou bisglicinato ferroso. Entretanto, estudos têm apontado complexos peptídeo-Fe como uma alternativa promissora (Kim *et al.*, 2007; Sugiarto *et al.*, 2009; Ueno *et al.*, 2014; Caetano-Silva *et al.*, 2015), com potencial aumento de absorção do mineral. A formação do complexo peptídeo-Fe dá-se pelo compartilhamento de elétrons entre o metal e o ligante (Kratzer e Vohra, 1986), estabelecendo uma ligação covalente coordenada, na qual o metal é o receptor de elétrons (Dewayne Ashmead, 2001). A especificidade de formação desses complexos é determinada pelo arranjo espacial dos grupos funcionais dos aminoácidos na sequência dos peptídeos. As interações podem ser aumentadas ou diminuídas modificando-se os resíduos de aminoácidos presentes na sequência peptídica (Carlton Jr e Schug, 2011).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para investigar a formação de complexos peptídeo-Fe. O processo de complexação promove alterações de conformação do ligante devido à interação com os íons de metal e podem modificar a emissão de fluorescência de resíduos aromáticos, bem como o espectro de infravermelho dos ligantes (Zhou *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; O'loughlin *et al.*, 2015). Assim, essas técnicas são importantes ferramentas para avaliação da estrutura de complexos peptídeo-Fe.

As proteínas de soro de leite são uma fonte de grande interesse para obtenção de peptídeos quelantes de ferro (Kim *et al.*, 2007; Sugiarto *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2012). Essas proteínas apresentam elevado valor biológico, elevada digestibilidade e rápida absorção pelo

organismo (Sgarbieri, 2004). Em trabalho anterior (Caetano-Silva *et al.*, 2015), sequenciamos peptídeos com capacidade quelante de ferro presentes em frações de hidrolisado proteico de soro de leite, obtidas sob as mesmas condições utilizadas no presente trabalho. Dentre os 34 fragmentos identificados, 28 deles foram provenientes de 3 regiões da proteína β -lactoglobulina. Esses fragmentos foram previamente identificados como extremamente resistentes à digestão gastrointestinal (Picariello *et al.*, 2010), o que sugere que podem exercer importante papel na absorção do ferro. Embora ainda não esteja claro o mecanismo pelo qual o ferro na forma complexada é absorvido, sabe-se que é extremamente insolúvel em pH fisiológico e fortemente influenciado pela presença de inibidores na dieta, o que pode restringir sua absorção (Puig *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2009). O ferro necessita, portanto, ser protegido. Complexos formados com esses peptídeos resistentes podem potencialmente proteger o metal ao longo do trato gastrointestinal, favorecendo sua solubilidade e inibindo sua reatividade.

A literatura apresenta diversas evidências de que a complexação do ferro com peptídeos pode ser uma alternativa para a fortificação, utilizando-se diferentes matérias-primas (Kim *et al.*, 2007; Lee e Song, 2009; Huang *et al.*, 2011; Torres-Fuentes *et al.*, 2011; Eckert *et al.*, 2014). No entanto, ainda são escassos na literatura dados sobre a biodisponibilidade do ferro na forma de complexos peptídeo-Fe, bem como sobre a reatividade do metal na forma complexada. Além disso, embora diferentes precursores de ferro venham sendo utilizados na síntese dos complexos, não encontramos estudos que evidenciem o efeito desses precursores na formação dos complexos, embora seja bem conhecido o papel de diferentes íons na estrutura e interações de peptídeos e proteínas (Zhang e Cremer, 2006). A diferença de estrutura poderia levar a uma diferença na atividade biológica desses complexos.

Com base nas premissas apresentadas, o presente trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização de complexos peptídeo-Fe com diferentes precursores de ferro e o estudo da hipótese dos dois principais efeitos da complexação: aumento da biodisponibilidade *in vitro* do ferro e redução de seu efeito pró-oxidante, em comparação à sua forma livre.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Ferro e absorção

O ferro é um micronutriente essencial, componente intrínseco da mioglobina, hemoglobina, citocromos e diversas enzimas (Luo e Xie, 2012). Atua como regulador, ativador e controlador de várias reações enzimáticas (Ren *et al.*, 2011). Entre suas funções, têm destaque a formação dos glóbulos vermelhos, transporte de O₂ e CO₂, transferência de elétrons, reações de oxirredução e produção de energia celular. Além dessas funções, o ferro contribui na proteção ao sistema imunológico, formação de purinas, remoção de lipídios do sangue, produção de anticorpos, síntese de DNA e divisão celular (Lieu *et al.*, 2001).

Os níveis de ferro no organismo de mulheres e homens correspondem a aproximadamente 35 e 45 mg/kg de massa corporal, respectivamente (Lieu *et al.*, 2001). Desse total, 60 a 70% estão presentes na hemoglobina; 10% na mioglobina, citocromo e enzimas que contêm ferro; e os 20 a 30% restantes estão presentes na forma de reserva como ferritina e hemossiderina (Conrad *et al.*, 1999). Quanto ao local, 30% estão no fígado, 30% na medula óssea e o restante no baço e músculos (Fomon, 1993). A absorção de ferro corresponde a aproximadamente 1 mg/dia em homens e 2 mg/dia em mulheres. Mulheres apresentam maior requisição de ferro a fim de repor sua perda em período menstrual e fornecer ferro suficiente para o desenvolvimento do feto durante a gravidez (Anderson e Frazer, 2005).

O ferro nos alimentos poder ser encontrado em duas formas: ferro heme e não heme. O ferro heme é derivado principalmente da hemoglobina e mioglobina, sendo assim encontrado em dietas ricas em produtos cárneos. Ele é eficientemente absorvido no intestino delgado e relativamente inalterado por outros componentes da dieta devido à sua maior estabilidade (Anderson e Frazer, 2005). Aproximadamente 30-70% do ferro encontrado na carne é ferro heme, cuja taxa de absorção é 15-35% (Monsen, 1988). A quebra da hemoglobina e mioglobina libera o ferro na forma heme, correspondendo a 1/3 do total de ferro oriundo da dieta (Grotto, 2008). Já o ferro não heme ou ferro inorgânico é encontrado em quase todos os alimentos, mas principalmente em alimentos de origem vegetal. O ferro não heme, por não ser estável como o ferro heme, é fortemente influenciado por componentes da dieta (Anderson e Frazer, 2005), apresentando taxa de absorção inferior a 10% (Martínez-Navarrete *et al.*, 2002). Alguns compostos podem contribuir para manter o ferro solúvel e absorvível, enquanto outros podem se ligar ao ferro fortemente e impedir sua absorção (Anderson e Frazer, 2005).

A rota de absorção de ferro tem sido exaustivamente estudada, sendo um processo altamente regulado e que responde às necessidades do organismo (Anderson e Frazer, 2005). Embora pequenas quantidades de ferro sejam perdidas por esfoliação da pele, bile e urina, diferentemente da maioria dos micronutrientes essenciais, não existe um mecanismo de excreção do ferro (Gulec *et al.*, 2014). Devido principalmente a essa limitação, a regulação da absorção desse mineral tem um papel fundamental na manutenção de sua homeostase (Zoller *et al.*, 2001), a fim de permitir a absorção exata para suprir as necessidades de ferro. A eficiência desse processo depende das reservas orgânicas e da taxa efetiva da eritropoiese (formação de glóbulos vermelhos), além de fatores exógenos, havendo aumento da absorção na deficiência e diminuição na sobrecarga. O nível ótimo de armazenamento de ferro é de cerca de 1g. Quando os níveis estão abaixo desse valor, a absorção de ferro é estimulada (Finch, 1994).

A mucosa duodenal é o primeiro lugar de absorção do ferro em mamíferos (Benito e Miller, 1998; Krishnamurthy *et al.*, 2007), na qual o enterócito exerce um papel primordial (Trinder *et al.*, 2002). As células do epitélio intestinal possuem um lado apical, que fica em contato com o lúmen intestinal e componentes da dieta, e um lado basolateral, em contato com o sangue (Fuqua *et al.*, 2012). A Figura 1 ilustra a via de absorção do ferro heme e não heme pelos enterócitos. O primeiro passo da absorção de ferro inorgânico proveniente da dieta é o transporte do ferro do lúmen intestinal para o interior dos enterócitos e esse transporte envolve uma proteína de membrana chamada transportador de metal divalente (DMT-1) (Gunshin *et al.*, 1997; Anderson e Frazer, 2005). Essa proteína parece ser específica para metais divalentes. Desse modo, outros metais que competem pelo mesmo mecanismo de absorção, como o cálcio, podem diminuir a absorção de ferro (Cozzolino, 1997; Guo *et al.*, 2014).

Proteínas reguladoras do ferro dentro do citoplasma do enterócito são capazes de regular a expressão de DMT-1 (Anderson e Frazer, 2005), a qual será regulada para mais em humanos com deficiência de ferro e para menos em humanos com sobrecarga de ferro (Zoller *et al.*, 2001). Uma enzima com atividade ferro redutase chamada citocromo b duodenal (Dcytb) foi identificada próxima à membrana do enterócito e presume-se que sua função seja reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} , permitindo sua absorção (Mckie *et al.*, 2001).

Uma vez dentro do enterócito, uma das vias do ferro é ser armazenado na forma de ferritina. A molécula de ferritina consiste de uma proteína de massa molecular (MM) de 480 kDa, a qual possui 24 subunidades de MM de cerca de 19 kDa. Cada molécula de ferritina pode estocar até 4300 átomos de ferro (Fomon, 1993). A ferritina é a principal proteína intracelular de armazenamento de ferro em todos os tecidos de mamíferos. Por armazenar o

ferro em uma forma não catalítica mas biologicamente acessível, protege as células contra danos oxidativos (Mackenzie *et al.*, 2008).

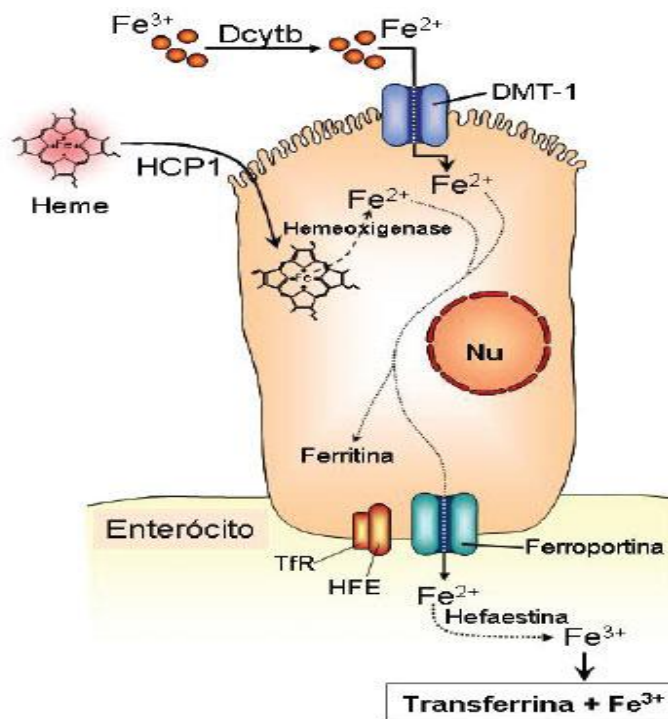


Figura 1. Via de absorção do ferro pelos enterócitos. Dcytb: ferroredutase; DMT-1: transportador de metal divalente-1; HCP-1: proteína transportadora do heme-1; Nu: núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; TfR: receptor da transferrina. Fonte: Grotto (2008), p. 391.

Devido às diferenças químicas, os mecanismos de absorção de ferro heme e não heme na superfície apical do enterócito são distintos. O ferro heme parece ser transportado pela membrana da borda em escova via uma proteína específica (provavelmente HCP 1) (Anderson e Frazer, 2005). Em seguida, o grupo heme é separado do ferro pela hemoxygenase 1 e o ferro liberado entra na mesma via do ferro não heme (Raffin *et al.*, 1974). Quando existe a necessidade imediata do ferro absorvido, outra via possível é ser transportado para fora da célula via ferroportina. A ferroportina é uma proteína encontrada na membrana basolateral de enterócitos, responsável pela passagem do ferro dos enterócitos para a circulação (Anderson e Vulpe, 2009). Essa proteína transporta o ferro em sua forma ferrosa. A ferroxidase de membrana, hefaestina, é então responsável pela conversão do ferro de sua forma Fe^{2+} para Fe^{3+} , a fim de permitir sua ligação com a transferrina (Grotto, 2008; Fuqua *et al.*, 2012), principal proteína extracelular de ligação ao ferro. Essa proteína é responsável pelo transporte do ferro até os tecidos nos quais o micronutriente é necessário (Frazer e Anderson, 2014).

O transporte de ferro pode ser reprimido por um peptídeo produzido pelo fígado, denominado hepcidina, o qual funciona como um bloqueador da captação de ferro pelos enterócitos e inibidor da liberação de ferro armazenado (Gulec *et al.*, 2014). Estímulos associados ao aumento de absorção de ferro, como eritropoiese, baixos níveis de armazenamento de ferro e gravidez, reduzem a expressão desse peptídeo. Do mesmo modo, sua expressão é aumentada em situações nas quais a absorção de ferro é reduzida (Nicolas *et al.*, 2002). Frazer *et al.* (2002) demonstraram que a expressão desse peptídeo é inversamente proporcional à expressão dos transportadores DMT-1 e ferroportina.

2.2. Deficiência de ferro e fortificação

Sendo o ferro componente essencial de várias enzimas, muitos órgãos ou sistemas apresentam alterações funcionais e estruturais quando o organismo não recebe suficiente aporte do nutriente. A deficiência desse mineral é definida como o estado no qual o indivíduo não possui ferro suficiente para manter normais as funções fisiológicas dos tecidos, tais como sangue, cérebro e músculos (WHO, 2007). Em adultos, pode levar à diminuição da resistência, e em crianças, ao comprometimento cognitivo (Guo *et al.*, 2014). No caso de deficiência severa, podem ocorrer alterações na estrutura e funções de tecido epitelial, em especial da boca, língua e estômago, redução da resposta imunológica, alterações de termorregulação, dentre outras alterações (Cook e Reusser, 1983; Dallman, 1989).

A deficiência desse mineral resulta em diversas alterações metabólicas, sendo um dos principais problemas nutricionais no mundo. A deficiência de ferro é a principal causa de anemia, a qual apresenta graves consequências na área da saúde, mas também um grande impacto no desenvolvimento social e econômico dos países (WHO, 2015). Embora sua prevalência seja maior em países em desenvolvimento, é também um grave problema de saúde em países desenvolvidos, especialmente para os grupos de risco, como idosos, pacientes pós-cirurgia bariátrica, crianças, mulheres grávidas e mulheres em idade fértil (Shankar *et al.*, 2010; Pavord *et al.*, 2012; Christides *et al.*, 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 800 milhões de crianças e mulheres são afetadas pela anemia no mundo todo. Em 2011, a maior prevalência de anemia foi em crianças, cerca de 42,6% (WHO, 2015).

A fortificação de alimentos é uma das estratégias sugeridas pela OMS para o controle de deficiência de micronutrientes, como o ferro (WHO, 2015). Essa estratégia tem sido empregada em regiões onde a prevalência da deficiência de ferro ainda é alta (Mazariegos *et al.*, 2004). Alimento fortificado é todo alimento adicionado de vitamina (s) e/ou mineral (is), com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo e/ou prevenir ou corrigir deficiência

(s) demonstrada (s) em um ou mais nutrientes na alimentação da população ou em grupos específicos da mesma, para fins de programas institucionais ou para fins comerciais. Para classificar um produto como fortificado, no Brasil, é necessário que a porção de 100 mL ou 100 g do produto pronto para consumo forneça, no mínimo, 15% ou 30% da ingestão diária recomendada (IDR) de referência, para líquidos ou sólidos, respectivamente (Brasil, 1998).

A fortificação de alimentos pode ser classificada em obrigatória, direcionada ou voluntária. Atualmente, aproximadamente 68 países realizam a fortificação obrigatória de farinhas (Quintaes *et al.*, 2017). No Brasil, a fortificação de farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico é obrigatória desde junho de 2004. A Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, estabelece as quantidades mínimas desses nutrientes que devem ser adicionadas às farinhas: 4,2 mg de ferro por 100 g de farinha e 150 mcg de ácido fólico por 100 g de farinha (Brasil, 2007). Para suplementação de farinhas com ferro, a Legislação Brasileira permite a utilização de sulfato ferroso desidratado, fumarato ferroso, ferro reduzido, ferro eletrolítico, etileno diamino tetracético de sódio e ferro (NaFeEDTA), bisglicinato ferroso e outros compostos de biodisponibilidade não inferior à dos compostos permitidos (Brasil, 2007). No Brasil, o ferro eletrolítico está entre os compostos mais utilizados para fortificação de farinhas (dos Santos *et al.*, 2015).

Enquanto a fortificação obrigatória, como estratégia para reduzir a prevalência de anemia, é feita em produtos consumidos por toda a população, a fortificação de alimentos direcionada tem como objetivo aumentar a ingestão e absorção de ferro por grupos específicos da população (Dary *et al.*, 2002). O Programa Nacional de Suplementação de Ferro, instituído pela Portaria nº 730 de 13 de maio de 2005, enquadra-se nessa categoria, sendo uma das estratégias da Política Nacional de Alimentação e Nutrição para o combate da deficiência de ferro no Brasil. O programa consiste na suplementação medicamentosa de sulfato ferroso para todas as crianças de 6 a 24 meses de idade, gestantes e mulheres até 3º mês pós-parto e/ou pós aborto. A fonte de ferro utilizada é o sulfato ferroso e a dosagem é de 1 mg/kg peso para crianças e 40 mg para gestantes e puérperas, administrado diariamente (Brasil, 2013).

A fortificação voluntária, por sua vez, consiste na ação da indústria de adicionar micronutrientes voluntariamente a produtos processados dirigidos a crianças com mais de três anos de idade e adultos (Dary *et al.*, 2002). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o nutriente adicionado deve estar presente em concentrações que não impliquem ingestão excessiva ou insignificante, considerando as quantidades derivadas de outros alimentos da dieta e as necessidades do consumidor a que se destina. Além disso, deve-se considerar a probabilidade de ocorrência de interações negativas com nutrientes ou outros componentes presentes no alimento. O nutriente adicionado deve ser seguro,

biodisponível e não deve alcançar níveis terapêuticos no alimento em que foi adicionado (Brasil, 1998). Independentemente do tipo de fortificação com ferro, essa prática pode resultar em inúmeros problemas associados, como oxidação lipídica, alterações sensoriais indesejáveis e baixa biodisponibilidade. Sua eficácia depende da resolução desses problemas, fazendo com que seja um desafio (Sugiarto *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2014).

Vários compostos estão disponíveis para utilização em fortificação de alimentos com ferro. A escolha do composto de ferro é geralmente baseada em boa solubilidade, ausência de precipitados e estabilidade de pH. Os sais de ferro apresentam diferença de solubilidade, sendo o cloreto ferroso dos mais solúveis, seguido do sulfato ferroso; fumarato ferroso é fracamente solúvel (Cayot *et al.*, 2013). Geralmente, quanto mais solúvel a forma de ferro, mais disponível é esse sal. No entanto, alguns sais são rapidamente oxidados logo após sua solubilização, como é o caso do cloreto ferroso, o que é facilmente observado pelo aparecimento da coloração laranja (Cayot *et al.*, 2013). A oxidação do ferro para seu estado férrico pode prejudicar sua absorção. Fatores que solubilizem o ferro e o mantenham em sua forma ferrosa no meio digestivo podem favorecer a captação do ferro pelas células intestinais, aumentando sua biodisponibilidade (Hurrell *et al.*, 2004).

O ferro é o micronutriente mais desafiador para ser incorporado em produtos, pois os compostos que apresentam maior biodisponibilidade tendem a ser os que interagem mais fortemente com componentes da dieta e, conseqüentemente, levam a alterações indesejáveis nos alimentos (WHO/FAO, 2006). Por exemplo, os compostos de ferro solúveis em água são mais biodisponíveis, mas geralmente promovem o desenvolvimento de cor e odor indesejáveis no alimento, além de poder ocasionar rancidez em produtos lipídicos. Compostos insolúveis, por outro lado, não causam alterações sensoriais, no entanto, podem ser tão pouco absorvidos a ponto de não apresentarem qualquer efeito nutricional (Hurrell, 2002; Wortley *et al.*, 2005). A Tabela 1 apresenta as principais características de compostos de ferro comumente utilizados para fortificação de alimentos, recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO/FAO, 2006). Para a maioria das matrizes, os compostos mais utilizados incluem sulfato ferroso ou fumarato ferroso. Pirofosfato férrico e ferro eletrolítico em pó têm sido utilizados, mas necessitam ser adicionados em quantidade 2 vezes superior ao sulfato ferroso. Bisglicinato ferroso, pirofosfato férrico micronizado e citrato de amônio férrico têm sido utilizados para fortificação de leite e produtos lácteos (García-Casal, 2014).

Tabela 1. Características de compostos de ferro comumente utilizados para fortificação de alimentos: solubilidade, biodisponibilidade e custo.

Composto	Conteúdo de ferro (%)	Biodisponibilidade relativa^a	Custo relativo^b (por mg de ferro)
<i>Solúveis em água</i>			
Sulfato ferroso heptahidratado	20	100	1,0
Sulfato ferroso anidro	33	100	1,0
Gluconato ferroso	12	89	6,7
Lactato ferroso	19	67	7,5
Bisglicinato ferroso	20	>100 ^c	17,6
Citrato de amônio férrico	17	51	4,4
EDTA de sódio e ferro (NaFeEDTA)	13	>100 ^c	16,7
<i>Fracamente solúveis em água, solúveis em ácido diluído</i>			
Fumarato ferroso	33	100	2,2
Succinato ferroso	33	92	9,7
Sacarato férrico	10	74	8,1
<i>Insolúveis em água, fracamente solúveis em ácido diluído</i>			
Ortofosfato férrico	29	25-32	4,0
Pirofosfato férrico	25	21-74	4,7
Ferro elementar			
reduzido	96	13-148 ^d	0,5
eletrolítico	97	75	0,8
carbonila	99	5-20	2,2
<i>Formas encapsuladas</i>			
Sulfato ferroso	16	100	10,8
Fumarato ferroso	16	100	17,4

^a Relativo ao sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄.7H₂O) em humanos adultos.

^b Relativo ao sulfato ferroso anidro. O custo por miligrama de ferro de sulfato ferroso anidro e hidratado é similar.

^c A absorção é 2-3 vezes superior se o conteúdo de fitato do alimento for alto.

^d Os valores altos são referentes a partículas de tamanho diminuto, as quais foram utilizadas apenas em estudos experimentais.

Fonte: adaptado de World Health Organization/Food and Agriculture Organization (WHO/FAO), 2006, p. 98.

O sulfato ferroso é um dos sais mais utilizados na fortificação de alimentos. Dentre os sais, apresenta maior biodisponibilidade, sendo utilizado como uma referência para ensaios experimentais (Quintaes *et al.*, 2017). Esse sal é largamente empregado na fortificação de farinhas (Hurrell *et al.*, 2010). Entretanto, seu uso está relacionado a efeitos

adversos como azia, dor abdominal, náusea e diarreia (Mimura *et al.*, 2008). Estudos relatam que esse sal pode promover a formação de radicais livres, os quais podem iniciar a peroxidação de lipídeos de membranas biológicas, inativação de enzimas e danos à estrutura do DNA (Uchida *et al.*, 2006; Schümann *et al.*, 2007). Além disso, esse sal pode ter efeito negativo nos produtos em que é adicionado, podendo causar alterações de cor, sabor metálico e precipitação em produtos como cereais infantis, bebidas de frutas, molho de peixe e infusões (Hurrell, 2002). A forma encapsulada do sulfato ferroso ou fumarato ferroso, na qual o ferro é fisicamente separado de outros componentes dietéticos, pode apresentar biodisponibilidade equivalente ao sal na forma livre e retardar ou prevenir alterações sensoriais. Esses compostos são geralmente utilizados em fórmulas e cereais infantis, predominantemente em países industrializados (WHO/FAO, 2006).

Um dos compostos utilizados para suplementação de ferro tem sido o bisglicinato ferroso, composto patenteado pela empresa Albion Laboratories (Clearfield, Utah, EUA) sob a marca Ferrochel®. A literatura mostra dados contraditórios quanto à biodisponibilidade desse composto: similar ao sulfato ferroso (Fox *et al.*, 1998; Yeung *et al.*, 2002; Wortley *et al.*, 2005) ou de 2 a 4,7 vezes superior a esse sal (Bovell-Benjamin *et al.*, 2000; Layrisse *et al.*, 2000), dependendo da matriz na qual foram estudados. É um suplemento de alto custo (Quintaes *et al.*, 2017) e pode promover alterações sensoriais indesejáveis, o que pode limitar sua aplicação (Hurrell, 2002).

O composto etileno diamino tetracético (EDTA) é um quelante hexadentado, capaz de se ligar a qualquer metal da tabela periódica. O complexo formado com átomos de ferro e sódio, EDTA de sódio e ferro (NaFeEDTA), é organolepticamente aceito e estável em cereais sob condições normais de armazenamento (Wortley *et al.*, 2005). Esse composto pode aumentar a biodisponibilidade do ferro em cereais matinais, possivelmente devido à habilidade do EDTA de manter o ferro complexado em condições gástricas de baixo pH. Uma vez no intestino, em condição de pH neutro, o ferro se dissocia da molécula de EDTA e entra nas células intestinais pelo seu mecanismo normal de absorção (Bothwell e Macphail, 2004) ou pode interagir com componentes que estiverem no lúmen (Wortley *et al.*, 2005), comprometendo sua absorção.

Para a fortificação de alimentos, é crucial minimizar alterações sensoriais indesejadas promovidas pelo ferro. De mesma importância, porém possivelmente mais desafiador, é a adição de uma forma de ferro biodisponível. Exceção à regra de quanto mais biodisponível, mais reativo, podem ser os complexos de ferro e ferro microencapsulado, nos quais o ferro é protegido por meios físicos ou químicos (Fairweather-Tait e Teucher, 2002). Assim, a complexação do ferro apresenta-se como uma alternativa para elevar sua biodisponibilidade, além de potencialmente prevenir seu efeito pró-oxidante. Ainda que a

biodisponibilidade de compostos complexados seja equivalente ao sulfato ferroso, por exemplo, sua principal vantagem consiste em potencialmente melhorar a qualidade organoléptica e reduzir o efeito inibidor de absorção exercido por alguns compostos, como os fenólicos (Wortley *et al.*, 2005).

2.3. Complexação do ferro

Micronutrientes organicamente ligados, incluindo o ferro, podem apresentar biodisponibilidade superior, sendo melhor absorvidos no trato digestório de humanos e de outros animais superiores (Davis *et al.*, 2008). Isso porque, sob certas condições, a ligação do mineral a um composto orgânico promove a formação de um complexo, o qual protege o micronutriente de interações químicas que ocorrem durante o processo digestivo (Gligic *et al.*, 2004). A formação de um complexo é resultado do compartilhamento de elétrons entre um metal e um ligante (Kratzer e Vohra, 1986). Ligantes podem ser considerados como bases de Lewis, as quais podem compartilhar um par de elétrons com metais, nesse caso tidos como ácidos de Lewis. Assim, o composto de coordenação é formado como resultado da interação de um ácido de Lewis com uma base de Lewis (Kratzer e Vohra, 1986).

A doação do par de elétrons, proveniente do mesmo átomo do ligante, ao íon de metal estabelece uma ligação covalente coordenada (Dewayne Ashmead, 2001). O ligante pode apresentar um ou mais sítios de coordenação disponíveis, garantindo que o metal seja parte de uma estrutura biologicamente estável devido às ligações coordenadas. Para que a reação de complexação ocorra, algumas condições devem ser satisfeitas: 1) o ligante deve conter grupos funcionais capazes de estabelecer ligações covalentes e coordenativas; 2) o complexo deve ser estericamente possível; 3) a reação de complexação deve ser energeticamente possível (Ashmead, 2001). Uma vez complexado, as características físico-químicas do metal se alteram. Os componentes do complexo compartilham propriedades entre si, porém, conservando propriedades exclusivas (Bell, 1977).

Tanto a forma di- quanto a trivalente do ferro possuem alta afinidade de ligação a proteínas e outros agentes complexantes, em pH ao redor do neutro. Diversos compostos podem formar complexos com o ferro, como carboidratos, fibras, fitatos, aminoácidos, peptídeos e proteínas. A interação metal-ligante pode impedir o metal de se ligar à água, resultando em menor formação de hidróxidos férricos com potencial aumento da solubilidade e biodisponibilidade do ferro (Zhu *et al.*, 2009), enquanto a sua estabilidade mantém a qualidade e aparência do alimento (Megías *et al.*, 2007). No entanto, enquanto alguns compostos podem contribuir para manter o ferro em uma forma solúvel e absorvível, outros podem se ligar ao ferro fortemente e impedir sua absorção (Anderson e Frazer, 2005).

Portanto, a formação de complexos pode influenciar positiva ou negativamente a absorção de ferro no organismo, devido às características dos complexos formados (Kratzer e Vohra, 1986), por isso a importância de estudá-las.

Em um complexo, a estrutura atômica, ligações covalentes ou iônicas, bem como ligações nas esferas de coordenação dos metais e dos ligantes e seus estados de oxidação, podem influenciar a biodisponibilidade do mineral (Cozzolino, 1997). O mecanismo pelo qual o agente de complexação melhora a utilização do mineral depende da capacidade do ligante sequestrar o mineral ou da sua maior habilidade em competir com outros ligantes no trato gastrointestinal (Kratzer e Vohra, 1986). Franzan (2006), em experimentos de reposição de hemoglobina em ratos, concluiu que, no complexo, a força de ligação deve ser suficientemente forte para impedir sua complexação com outros ligantes, tendo que ser, porém, suficientemente fraca para que possa ser mobilizado por carreadores presentes na parede dos enterócitos. Entretanto, ainda não está claro se o ferro na forma complexada é transportado através da membrana da mucosa intestinal pelo mecanismo DMT-1 e também se o ferro é liberado de seus ligantes antes ou durante o processo de absorção (South e Miller, 1998; Zhu *et al.*, 2006).

2.4. Peptídeos ligantes de ferro

O ferro pode interagir com diversos componentes da dieta durante a digestão e formar complexos, os quais podem aumentar ou diminuir a absorção do mineral. Alguns compostos, como o ácido fítico, podem formar complexos insolúveis com o mineral, comprometendo sua absorção (Lazarte *et al.*, 2015). Em contrapartida, peptídeos resultantes da hidrólise enzimática de proteínas são considerados ligantes ideais de ferro, pois apresentam a capacidade de formar complexos solúveis e que podem favorecer a absorção do mineral. A literatura apresenta diversos estudos que abordam a complexação do ferro por peptídeos durante o processo de digestão (Etcheverry *et al.*, 2004; Argyri *et al.*, 2007; Argyri *et al.*, 2009; Ou *et al.*, 2010).

Por outro lado, complexos peptídeo-Fe podem ser sintetizados antes da ingestão, com o objetivo de proteger o ferro ao longo do trato gastrointestinal e aumentar sua biodisponibilidade. Nos últimos anos, muitos autores têm estudado o tipo de ligante, a fonte de ferro e as condições de síntese dos complexos com esse enfoque (Sugiarto *et al.*, 2009; Torres-Fuentes *et al.*, 2011; De La Hoz *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Caetano-Silva *et al.*, 2015). A ligação dos peptídeos a íons metálicos é baseada na interação entre um grupo doador de elétrons presente na superfície do ligante (peptídeo) e um íon metálico (receptor de elétrons), que apresente um ou mais sítios de coordenação acessíveis,

assegurando que o metal se torne parte de uma estrutura biologicamente estável (Ueda *et al.*, 2003).

O pH exerce importante influência na capacidade de ligação dos peptídeos ao ferro (Lin *et al.*, 2000). A ligação de coordenação entre peptídeo e metal é favorecida quando grupos ionizáveis doadores de elétrons presentes nos resíduos de aminoácidos da biomolécula estão parcialmente desprotonados, ou seja, quando estão em condição na qual o valor de pH é superior ao do pKa dos grupos ionizáveis (Porath, 1990). Embora a formação de ligação covalente coordenada seja condição para a existência do complexo, outros tipos de interações podem interferir na estabilidade de complexos peptídeo-metal, como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (Faa e Crisponi, 1999; Eckert *et al.*, 2016).

A especificidade de formação desses complexos é determinada pelo arranjo espacial dos grupos funcionais dos aminoácidos na sequência dos peptídeos. As interações podem ser aumentadas ou diminuídas modificando-se os resíduos de aminoácidos na sequência peptídica (Carlton Jr e Schug, 2011). Estudos de complexos peptídeo-Fe mostram que o principal sítio de ligação corresponde, primariamente, aos grupos carboxílicos (Chaud *et al.*, 2002; Lee e Song, 2009; Huang *et al.*, 2011), embora o nitrogênio do grupo ϵ -amino da lisina, do grupo guanidina da arginina e do grupo imidazol da histidina possam também estar envolvidos na ligação (Reddy e Mahoney, 1995; Chaud *et al.*, 2002; Torres-Fuentes *et al.*, 2012). Resíduos de prolina, ainda que não participem diretamente da coordenação com o ferro, exercem um papel essencial ao promover o dobramento da molécula peptídica, favorecendo a conformação estrutural em anel com o íon de ferro (Eckert *et al.*, 2016). A capacidade dos peptídeos de coordenar o ferro depende ainda de outros fatores, como estrutura do peptídeo, efeitos estéricos e massa molecular (Carrasco-Castilla *et al.*, 2012).

Várias fontes de proteína têm sido utilizadas para obtenção de peptídeos com capacidade ligante de ferro. Peptídeos oriundos de hidrolisados proteicos de origem animal (leite, caseína, soro de leite, subprodutos de camarão, músculo de frango, músculo de anchova, plasma de sangue suíno, queijo) ou vegetal (espirulina, soja, grão de bico, cevada) mostraram capacidade de ligar o ferro (Seth e Mahoney, 2000; Vegarud *et al.*, 2000; Chaud *et al.*, 2002; Lund e Ardö, 2004; Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Lee e Song, 2009; Lv *et al.*, 2009; Ou *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2011; Torres-Fuentes *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Caetano-Silva *et al.*, 2015; O'loughlin *et al.*, 2015; Eckert *et al.*, 2016).

2.5. Proteínas do soro de leite

Dentre as fontes proteicas para obtenção de peptídeos com capacidade de ligação de ferro, se destacam as proteínas de soro de leite como uma fonte de grande interesse (Kim *et al.*, 2007; Sugiarto *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2012), pois apresentam elevado valor biológico, elevada digestibilidade e rápida absorção pelo organismo (Sgarbieri, 2004). Do ponto de vista da composição aminoacídica, as proteínas do soro atendem às recomendações para todas as idades, e quase todos os aminoácidos essenciais superam as recomendações da FAO (FAO/WHO, 1990), exceto os aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina.

As proteínas do soro de leite estão entre as proteínas funcionais mais empregadas em formulações alimentícias (Kazmierski e Corredig, 2003). Constituem um grupo bastante diversificado de proteínas com características estruturais bem diferentes (Wong *et al.*, 1996). As principais proteínas do soro do leite são β -lactoglobulina (β -Lg), α -lactoalbumina (α -La) e albumina de soro bovino (BSA) e suas concentrações no leite bovino são 3,2 g/L, 1,2 g/L e 0,4 g/L, respectivamente (Kazmierski e Corredig, 2003; Sgarbieri, 2005). As duas primeiras constituem 70 a 80% das proteínas totais do soro. Além delas e da BSA, são encontradas também lactoferrina, imunoglobulinas, protease-peptonas, transferrina e enzimas (Sgarbieri, 1996).

A β -Lg constitui cerca de 50% das proteínas do soro, sendo a principal proteína dessa fração. Possui MM igual a 18,36 kDa para a variante genética A e 18,28 kDa para a variante B, contendo 162 resíduos de aminoácidos, um grupo tiol (-SH) e duas pontes dissulfeto intramolecular (-S-S) (Sawyer *et al.*, 2002). A α -La, proteína monomérica globular, contém 123 resíduos de aminoácidos e MM de 14,2 kDa e representa aproximadamente 25% das proteínas do soro. Sua molécula de forma elipsoide apresenta quatro pontes dissulfeto. Sua propriedade mais característica é a forte tendência de formar associações em pH abaixo de seu ponto isoelétrico (Sgarbieri, 2005). A BSA, proteína globular solúvel em água, apresenta MM de 66,4 kDa e constitui cerca de 5% do total de proteínas do soro. Possui cerca de 580 resíduos de aminoácidos (Sgarbieri, 2005), presença de grupo sulfidril livre e 17 pontes dissulfeto (Morr e Ha, 1993).

As proteínas do soro apresentam ações fisiológicas *in vivo* (Sgarbieri, 2004), além de modularem uma variedade de funções, tais como a imunológica, atividade linfocitária, secreção de citocinas, produção de anticorpos e atividade fagocitária (Saint-Sauveur *et al.*, 2008). A hidrólise dessas proteínas pode modificar suas propriedades físicas, químicas e funcionais, sem prejudicar seu valor nutritivo, melhorando, particularmente, suas características de absorção intestinal (González-Tello *et al.*, 1994). Os peptídeos gerados, ao atingirem o intestino delgado, apresentam alta taxa de digestão e absorção, elevando

rapidamente a concentração aminoacídica do plasma e estimulando a síntese de proteínas nos tecidos (Boirie *et al.*, 1997). Além disso, hidrolisados proteicos de soro de leite têm sua funcionalidade destacada devido à bioatividade de seus peptídeos (Kim *et al.*, 2007), a qual tem sido amplamente estudada nos últimos anos (Zhou *et al.*, 2012). Dentre as bioatividades desses peptídeos, pode-se destacar atividade antihipertensiva (Gobbetti *et al.*, 2004), imunomodulatória (Mercier *et al.*, 2004), anticarcinogênica (Marshall, 2004) e carreadora de minerais (Kim e Lim, 2004).

Sugiarto *et al.* (2009), estudando a constante de ligação ao ferro de proteínas de duas diferentes fontes, concluíram que a proteína de soro de leite possui 8 sítios de ligação ao ferro. O processo de hidrólise resulta no aumento de sítios de ligação disponíveis, seja pelos grupos carboxílicos terminais, originados após a quebra de ligações peptídicas, seja pela exposição de sítios de ligação antes ocultos na estrutura da proteína.

2.6. Caracterização da interação peptídeo-Fe

2.6.1. Espectroscopia de Fluorescência

Muitas proteínas contêm resíduos de aminoácidos intrinsecamente fluorescentes, triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe), dentre os quais, o Trp é o mais útil no estudo de conformação de proteínas (Royer, 2006). O Trp apresenta maior rendimento quântico, isso é, capacidade de emitir mais fótons quando retorna ao seu estado fundamental após excitação a uma camada de maior energia (Kim e Kinsella, 1986). A fluorescência desses resíduos é sensível à polaridade do microambiente (Eftink, 2006), apresentando menor emissão e menor rendimento quântico em um meio mais polar (Agyare e Damodaran, 2010). A alteração de conformação de proteínas também modifica a intensidade de emissão de fluorescência de resíduos de Tyr e Phe; porém, o baixo rendimento quântico desses aminoácidos, assim como a ausência de sensibilidade ao ambiente, faz com que sejam Tyr e Phe menos úteis do que o Trp (Royer, 2006).

As propriedades fluorescentes de aminoácidos aromáticos em proteínas, especialmente o Trp, podem ser usadas para o estudo de interações entre proteínas e outros compostos (Mazerolles *et al.*, 2001), as quais podem acarretar a alteração ou extinção da emissão de fluorescência. Extinção de fluorescência se refere a qualquer processo que diminua a intensidade de emissão de fluorescência como resultado de uma variedade de interações moleculares, incluindo rearranjos moleculares, transferência de energia e formação de complexo no estado fundamental (Lakowicz, 2006; Royer, 2006).

O processo de complexação promove alterações de conformação do ligante devido à interação com íons do metal, resultando em alteração da emissão de fluorescência de resíduos aromáticos (Zhou *et al.*, 2012). Na avaliação de espectros de fluorescência de complexos Fe-hidrolisado de β -lactoglobulina, Zhou *et al.* (2012) observaram redução ou extinção de fluorescência endógena de aminoácidos aromáticos devido à ligação dos peptídeos ao ferro. A fluorescência se mostra uma importante ferramenta para o estudo da interação peptídeo-Fe, entretanto, a literatura ainda apresenta poucos resultados sobre as transformações conformacionais em decorrência dessa complexação.

2.6.2. Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de absorção vibracional no infravermelho (do inglês, *Infrared Spectroscopy*, IR), técnica que se baseia na absorção de radiação devido a vibrações entre átomos da molécula (Haris e Chapman, 1995), tem sido utilizada para obtenção de informações a respeito da estrutura conformacional de peptídeos e proteínas. Uma das maiores vantagens da utilização dessa técnica para o estudo de estrutura conformacional é que o espectro de peptídeos pode ser obtido em uma ampla faixa de ambientes (Haris e Chapman, 1995), tornando possível o acompanhamento de alterações na estrutura secundária dos peptídeos em decorrência da variação do meio (Waterhous e Johnson, 1994).

A região do espectro IR de 1800 a 800 cm^{-1} é de grande utilidade na análise de proteínas (Al-Jowder *et al.*, 1999), pois é a faixa de absorção das ligações que formam o grupo amida (C=O, N-H e C-N) (Van Der Ven *et al.*, 2002). Existem várias vibrações do modo Amida, mas a Amida I é a banda de absorção mais intensa em proteínas (Montalvo *et al.*, 2010) e utilizada para análise de estrutura de peptídeos. Esse modo vibracional se origina principalmente do estiramento da ligação C=O e sua absorção ocorre na região de 1600-1700 cm^{-1} (Haris e Chapman, 1995). A banda Amida III envolve a combinação dos movimentos de flexão da ligação N-H no plano e estiramento da ligação C-N, sendo sensível à conformação. A banda Amida A é atribuída ao estiramento da ligação N-H. Essa banda não é dependente da conformação da molécula, mas é muito sensível à força das ligações de hidrogênio: varia entre 3225 e 3285 cm^{-1} para ligações de hidrogênio entre 2,69 e 2,85 Å (Krimm e Bandekar, 1986). Ligações de hidrogênio podem estabilizar estruturas de proteínas e peptídeos e a espectroscopia vibracional é uma ferramenta que permite avaliar a influência dessas forças. De modo geral, ligações de hidrogênio reduzem a frequência de vibrações de estiramento, mas aumenta a frequência de vibrações de flexão (Colthup *et al.*, 1990).

A interação de íons metálicos com grupos funcionais do ligante pode ocasionar alterações nos espectros IR do ligante livre, como deslocamento e/ou mudança de intensidade

relativa de bandas referentes a determinados grupos funcionais, como carboxilatos e amidas (Zhou *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2014). Desse modo, qualquer alteração na molécula promovida pela complexação pode ser avaliada pelo deslocamento do máximo de absorção das bandas, quando comparados os espectros do material proteico sozinho e complexado ao ferro. A espectroscopia IR tem sido amplamente utilizada para avaliar alterações conformacionais em grupos funcionais de peptídeos como resultado de interações desses grupos com íons de metal após reação de complexação (Chaud *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; O'loughlin *et al.*, 2015).

Zhou *et al.* (2012) caracterizaram complexos peptídeo-Fe de hidrolisado de β -lactoglobulina pela técnica IR. Os autores observaram nos espectros dos complexos o alongamento da ligação em alguns sítios, como ligações amida, além do aparecimento de bandas que indicam a coordenação dos átomos C-O-Fe na formação do complexo. Wang *et al.* (2011) também observaram que a banda referente à ligação amida no espectro IR alterou-se significativamente após a complexação, contribuindo para a formação da ligação coordenada C-O-Fe. O'loughlin *et al.* (2015), analisando o espectro IR de peptídeos do soro de leite (MM < 1 kDa) com e sem FeSO₄ no meio de reação, observaram alterações de características estruturais devido à interação molecular entre sulfato ferroso e a fração do hidrolisado, relacionados tanto com a complexação peptídeo-Fe quanto com interações aminoácido-Fe. Wang *et al.* (2011) concluíram que os principais sítios de ligação em hidrolisado de caseína yak consiste de grupos carboxílicos e grupos amida.

2.6.3. Análise térmica

As técnicas termoanalíticas são interdisciplinares, sendo úteis em vários setores científicos e tecnológicos. Análise térmica é definida como um grupo de técnicas onde a propriedade física de uma substância é monitorada em função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura (Giolito e Ionashiro, 1988; Ionashiro *et al.*, 2005). As técnicas mais amplamente difundidas são a Termogravimetria (TG) e a Análise Térmica Diferencial (DTA), seguidas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Termomecânica (TMA) (Ionashiro *et al.*, 2005). No caso da análise termogravimétrica, a propriedade medida é a variação de massa da amostra em função do aumento de temperatura. Essa técnica pode ser usada para avaliação de processos de decomposição, desidratação, oxidação (Haines, 1995). As curvas de variação de massa em função da temperatura permitem o estudo da estabilidade térmica da amostra, sua composição, estabilidade dos compostos intermediários e composição de resíduo (Ionashiro

et al., 2005). Assim, a análise termogravimétrica é uma importante ferramenta para avaliar a estrutura de complexos metálicos e a resistência das ligações que o formam.

A DTA é uma técnica térmica de medição contínua das temperaturas da amostra e de um material de referência termicamente inerte à medida que ambos vão sendo aquecidos ou resfriados em um forno. Essas medições de temperatura são diferenciais, pois registra-se a diferença entre a temperatura da referência T_r , e a da amostra T_a , ou seja ($T_r - T_a = \Delta T$), em função da temperatura ou do tempo. A DTA permite acompanhar os efeitos da temperatura associados com alterações físicas ou químicas da amostra. Em geral, transições de fase, desidratações, reduções e certas reações de decomposição produzem efeitos endotérmicos, enquanto que cristalizações, oxidações, algumas reações de decomposição produzem efeitos exotérmicos (Ionashiro *et al.*, 2005).

2.7. Biodisponibilidade do ferro e células Caco-2

O ferro, apesar de abundante em vários alimentos, tem sua biodisponibilidade altamente restringida por sua extrema insolubilidade em pH fisiológico (Puig *et al.*, 2005) e fortemente influenciada pela presença de promotores e/ou inibidores provenientes da dieta (Zhu *et al.*, 2009). A redução da solubilidade do ferro pela condição alcalina do intestino é um dos principais fatores que contribuem para a baixa biodisponibilidade do ferro (Scheers e Sandberg, 2008), uma vez que o mineral necessita estar na forma solúvel para ser absorvido (Fidler *et al.*, 2004). Por ser uma pré-condição para sua absorção, o primeiro passo para avaliar a biodisponibilidade do ferro é representado pela sua bioacessibilidade, ou seja, sua solubilidade no trato intestinal (Cilla *et al.*, 2008).

Fisiologicamente, a bioacessibilidade pode ser definida como o mineral liberado da matriz durante a digestão gastrointestinal que se torna disponível para ser absorvido pelo intestino (De Lima *et al.*, 2014). Wang *et al.* (2011) afirmaram que complexo hidrolisado de caseína-Fe pode ser mais biodisponível do que o sulfato ferroso devido à maior solubilidade do ferro em condições alcalinas em relação ao sal. De fato, a solubilidade de complexos peptídeo-Fe pode afetar significativamente a bioacessibilidade do ferro para captação no lúmen (O'loughlin *et al.*, 2015), embora não implique em ferro efetivamente biodisponível.

A biodisponibilidade de um nutriente, por sua vez, pode ser definida como sua acessibilidade aos processos metabólicos e fisiológicos normais. A biodisponibilidade está relacionada ao efeito benéfico de um nutriente em níveis fisiológicos de ingestão, mas também pode afetar a natureza e a gravidade da toxicidade quando a ingestão for excessiva (Cozzolino, 2007). Desse modo, a fração biodisponível de um nutriente é a que foi

efetivamente absorvida e está disponível para uso nos processos metabólicos ou deposição em compostos de armazenamento (Argyri *et al.*, 2011).

Inicialmente, os estudos de biodisponibilidade consideravam a subtração da fração excretada da fração ingerida de determinado nutriente como fração biodisponível, porém a fração endógena do nutriente não era considerada, não sendo possível medir com precisão a quanto ela correspondia (Cozzolino, 1997). Nos últimos anos, outros métodos foram desenvolvidos para a avaliação da absorção desse mineral.

Métodos *in vivo* avaliam a biodisponibilidade de um determinado nutriente mediante a administração do mesmo a um organismo vivo. São métodos caros, longos e trabalhosos. Além disso, apresentam grande variabilidade, devido às diferenças entre indivíduos, como estado nutricional e metabólico. Dentre esses métodos, destaca-se a utilização de isótopos, os quais permitem a obtenção de dados confiáveis de biodisponibilidade de minerais, onde o elemento químico é marcado radioativamente e posteriormente analisado em diversos materiais biológicos. No entanto, isótopos radioativos podem apresentar problemas do ponto de vista ético, enquanto isótopos estáveis são mais caros (Wienk *et al.*, 1999). Modelos animais oferecem uma avaliação fisiológica, mas não predizem de forma confiável a absorção em humanos (Reddy e Cook, 1991; Wortley *et al.*, 2005), principalmente devido a diferenças no metabolismo animal e humano, o que faz com que, muitas vezes, os resultados não possam ser extrapolados. Reddy e Cook (1991) demonstraram que ratos são menos sensíveis do que humanos a fatores dietéticos que influenciam a absorção de ferro não heme.

Estudos *in vitro*, como bioacessibilidade, dialisabilidade e cultura de células, oferecem alternativas aos estudos *in vivo*, como uma maneira de obter uma melhor compreensão da absorção de compostos (Rocha *et al.*, 2012). Métodos *in vitro* são mais baratos, mais rápidos e mais simples (Becker, 1999), além de permitirem o controle das condições experimentais e evitarem possíveis efeitos devido a diferenças interindividuais. Esses métodos baseiam-se na simulação da digestão gastrointestinal, com adição de enzimas de modo sequencial, simulando as diferentes etapas do processo digestivo (Hur *et al.*, 2011). Métodos *in vitro* podem simular as condições físico-químicas da digestão gastrointestinal, como pH, temperatura, solubilidade, tempo de incubação, embora não seja possível reproduzir com exatidão as condições fisiológicas como tempo de trânsito no intestino, efeito da microflora intestinal e metabolismo hepático (Wienk *et al.*, 1999; Fairweather *et al.*, 2007; Fernández-García *et al.*, 2009).

A fração solúvel após esse processo é denominada fração bioacessível e representa a fração do nutriente que está disponível para ser absorvido. A presença de um

componente vivo pode estimar de modo mais exato a fração que será, de fato, captada pelas células. A camada de células epiteliais do intestino representa a barreira limitante para o transporte e absorção de compostos entre o lúmen e o interior do corpo. Assim, modelos de cultura de células *in vitro* permitem a avaliação de absorção e processos de transporte ativo e passivo através do epitélio intestinal (Lea, 2015). O uso de cultura de células Caco-2 tem provado ser um modelo útil para o estudo de biodisponibilidade do ferro em alimentos (Zhu *et al.*, 2009), apresentando boa correlação com estudos de absorção de fármacos e outros compostos após ingestão oral em seres humanos (Lea, 2015). Diversos autores referem-se ao termo biodisponibilidade *in vitro* em ensaios nos quais se mede a captação de ferro em cultura de células Caco-2 (Cilla *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009; Etcheverry *et al.* 2012; García-Nebot *et al.*, 2013; Lv *et al.*, 2014; Flores *et al.*, 2015; Rodriguez-Ramiro *et al.*, 2017).

As células Caco-2 são uma linhagem de células de adenocarcinoma humano, que sofrem diferenciação espontânea (Glahn *et al.*, 1996), com formação de monocamada polarizada e expressão de diversas características morfológicas e funcionais de enterócitos maduros (Rousset, 1986; Artursson, 1990; Glahn *et al.*, 1996; Gan e Thakker, 1997). Dentre elas, destaca-se a expressão da maioria dos receptores, transportadores e enzimas metabolizadoras de fármacos como a aminopeptidase, esterase e sulfatase encontradas no epitélio normal (Lea, 2015). Células Caco-2 apresentam propriedades de enterócitos maduros quando alcançam a confluência, definida pela organização das células em uma monocamada polarizada, uniões celulares estreitas e formação de domas e enzimas próprias da membrana da borda em escova (Pinto *et al.*, 1983).

Uma das vantagens do modelo é a rápida multiplicação celular (Balimane *et al.*, 2000). A diferenciação em enterócitos maduros ocorre em um determinado período de tempo, o qual pode variar em função das condições de cultura e de número de repiques, cuja faixa ótima está entre 28 e 65 (Briske-Anderson *et al.*, 1997). O tempo pós-semeadura geralmente varia entre 10 e 30 dias, dependendo da finalidade do experimento. As células Caco-2 podem ser cultivadas em suporte poroso de policarbonato, poliéster ou tereftalato de polietileno (Lea, 2015). A confiabilidade do estudo utilizando esse modelo depende da uniformidade e integridade da monocamada celular polarizada e confluenta. A integridade da monocamada pode ser verificada de diferentes formas, como pela medição da resistência elétrica transepitelial (*Transepithelial Electrical Resistance* - TEER) ou pela medição da passagem do corante fluorescente Lucifer Yellow (Lea, 2015).

Em comparação com o epitélio intestinal normal, o modelo de células Caco-2 apresenta algumas limitações. Por exemplo, o epitélio normal contém mais de um tipo de célula, não apenas os enterócitos. Além disso, uma série de parâmetros não celulares pode afetar a absorção de um determinado composto *in vivo*. Assim, embora as células Caco-2 em

geral sejam uma excelente ferramenta para estudar as propriedades de absorção de compostos no epitélio intestinal, é preciso ser cauteloso na extrapolação de dados para a situação *in vivo* (Lea, 2015).

Uma medida indireta de absorção de ferro que tem sido largamente empregada é a determinação da síntese de ferritina por células Caco-2 (Scheers e Sandberg, 2008; Zhu *et al.*, 2009; Pullakhandam *et al.*, 2011; García-Nebot *et al.*, 2013; Lv *et al.*, 2014; Flores *et al.*, 2015; Eckert *et al.*, 2016; Rodriguez-Ramiro *et al.*, 2017). Glahn *et al.* (1998) concluíram que a síntese de ferritina se correlaciona com a entrada de ferro em células Caco-2, uma vez que o ferro é armazenado na forma de complexo com essa proteína. A concentração de ferritina pode ser facilmente medida via imunoensaio, eliminando a necessidade de radiomarcagem do ferro para determinação de sua biodisponibilidade.

A combinação da digestão *in vitro* e captação de ferro pelas células Caco-2 oferece um sistema versátil para prever os efeitos da alimentação e/ou condições de digestão na absorção do ferro celular (Glahn *et al.*, 1996). Esse modelo mede a solubilidade do ferro em adição à medida de sua permeação por meio da monocamada de células Caco-2. Proporciona vantagens em relação à utilização da digestão *in vitro* de forma isolada, a qual mede apenas a solubilidade do ferro, não sendo uma medição completa de sua disponibilidade (Glahn *et al.*, 1998). Obviamente, estudos *in vitro* não substituem os resultados de estudos *in vivo*, mas podem funcionar como um preditivo bastante útil no estudo da absorção de compostos.

Zhu *et al.* (2009) avaliaram a biodisponibilidade *in vitro* do ferro, por digestão *in vitro* associada à cultura de células Caco-2, na forma de pirofosfato férrico solúvel (SFP), sais de ferro e compostos quelatos, utilizando a formação de ferritina como marcador da absorção de ferro. Os autores observaram maior biodisponibilidade *in vitro* na forma de SFP em comparação aos demais compostos estudados, e sugeriram que o Fe^{3+} do SFP seja reduzido a Fe^{2+} e dissociado do pirofosfato e citrato para ser absorvido em sua forma iônica, na borda em escova do intestino delgado. De acordo com Wortley *et al.* (2005), estudos comparativos entre absorção de ferro em humanos e em modelo de cultura de células Caco-2, com avaliação da síntese de ferritina, suportam a hipótese de que o modelo *in vitro* é um bom indicador do metabolismo de ferro em humanos.

Embora a literatura apresente evidências de que a complexação do ferro por peptídeos possa ser uma alternativa para fortificação de alimentos com ferro (Kim *et al.*, 2007; Megías *et al.*, 2007; Storcksdieck *et al.*, 2007; Lee e Song, 2009; Huang *et al.*, 2011; Torres-Fuentes *et al.*, 2011), raros estudos conduziram a avaliação da biodisponibilidade de complexos peptídeo-Fe (Wang *et al.*, 2014; Eckert *et al.*, 2016). Ainda faltam informações a

respeito do efeito da complexação peptídeo-Fe na absorção do mineral, especialmente no que tange o uso de diferentes fontes de ferro e a comparação com compostos comumente utilizados para fortificação.

2.8. Efeito pró-oxidante do ferro e oxidação lipídica

A natureza bivalente do ferro, capacidade de passar do estado ferroso (Fe^{2+}) para o estado férrico (Fe^{3+}), é uma das principais características responsáveis pela relevância biológica desse mineral (Mackenzie *et al.*, 2008). Entretanto, essa mesma propriedade está intrinsicamente relacionada à formação de radicais livres catalisada pelo ferro, podendo resultar em peroxidação de lipídeos de membranas e danos à estrutura do DNA (Mackenzie *et al.*, 2008).

A incorporação de ferro em sistemas complexos como produtos alimentícios induz vários problemas, como oxidação e precipitação, e, assim, biodisponibilidade reduzida (Hurrell *et al.*, 2004). A oxidação lipídica é a principal causa de deterioração em alimentos emulsionados, ocorrendo geralmente na interface óleo/água. Em produtos fortificados, a oxidação lipídica é fator chave na qualidade e vida de prateleira (Coupland e McClements, 1996).

A oxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação de radicais livres, espécies capazes de existência independente que contenham um ou mais elétrons desemparelhados (Halliwell, 1987), sobre lipídeos insaturados, gerando principalmente radicais alquila ($\text{L}\cdot$), alcóxila ($\text{LO}\cdot$) e peróxila ($\text{LOO}\cdot$) (Benzie, 1996). As reações de oxidação apresentam três etapas: iniciação, propagação e terminação (Figura 2). O período de iniciação ou indução é caracterizado pelo baixo consumo de oxigênio e produção de radicais livres, onde pouca mudança ocorre nos lipídeos. Nessa fase, o ácido graxo sofre ataque de uma espécie suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$). Posteriormente, ocorre a formação de um dieno conjugado (duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples) a partir de um rearranjo molecular (Halliwell e Gutteridge, 2007). Na fase seguinte, o consumo de oxigênio é aumentado e ocorre a formação de radicais peróxila ($\text{LOO}\cdot$), a partir da reação de um radical alquila ($\text{L}\cdot$) com oxigênio. A reação se propaga quando esse radical abstrai um átomo de hidrogênio de uma nova molécula de lipídeo insaturado, formando então um hidroperóxido (LOOH) e um novo radical ($\text{L}\cdot$), o qual dará continuidade à cascata de reações (Halliwell e Gutteridge, 2007).

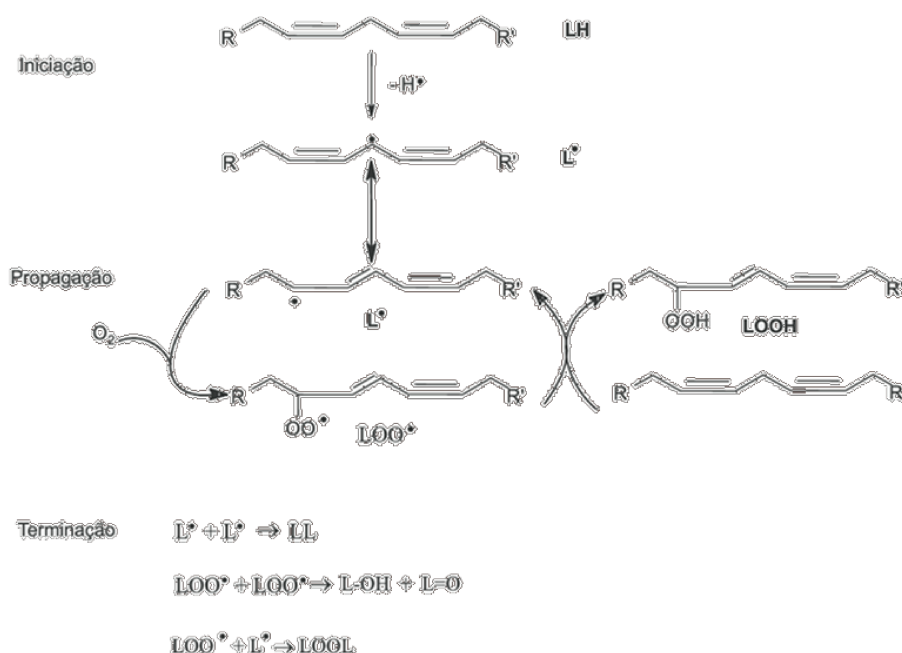


Figura 2. Etapas do processo de peroxidação lipídica.
Fonte: Lima e Abdalla (2001), p.294.

Os produtos primários, peróxidos e hidroperóxidos, são instáveis e podem ser degradados e originar novos compostos de baixa massa molecular, como aldeídos, cetonas e álcoois (Pratt *et al.*, 2011). Na última etapa da reação, ocorre a aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicais (Halliwell e Gutteridge, 2007). Um dos produtos que podem ser formados a partir da peroxidação lipídica é o malonaldeído (MDA), especialmente a partir da oxidação de ácidos graxos com mais de duas duplas ligações, como ácido linolênico ou araquidônico (Esterbauer *et al.*, 1991; Halliwell e Gutteridge, 2007)

Íons de ferro podem catalisar a oxidação de lipídeos na presença de oxigênio, dando início à sequência de reações via formação de $\text{OH}^\bullet$, ou atuar na decomposição de hidroperóxidos, através dos seguintes mecanismos (Cheng e Li, 2007; Halliwell e Gutteridge, 2007):



O ferro é um dos principais responsáveis pela decomposição de hidroperóxidos lipídicos em alimentos e em sistemas biológicos. Nos alimentos, esse processo resulta em desenvolvimento de odor e sabor indesejáveis. No organismo, o ferro pode catalisar a

oxidação lipídica de membranas de células intestinais (Guzun-Cojocar *et al.*, 2011), promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), relacionadas a doenças cardiovasculares e neurológicas (Torres-Fuentes *et al.*, 2012). O Fe^{2+} livre parece também ser responsável por danos causados à mucosa gastrointestinal (Slivka *et al.*, 1986) e pode intensificar distúrbios inflamatórios (Lih-Brody *et al.*, 1996).

Alguns processos de complexação podem impedir o potencial redox do ferro e, assim, impedi-lo de participar de reações catalíticas que produzam radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio (ROS), como por exemplo via Reação de Fenton (Eckert *et al.*, 2016). Assim, para a fortificação de alimentos com ferro, pesquisas têm se voltado para a utilização na forma complexada, a fim de minimizar seu impacto na oxidação lipídica (Sugiarto *et al.*, 2010; Ueno *et al.*, 2014), tanto no alimento quanto no organismo, possivelmente prevenindo os efeitos colaterais ocasionados pelo ferro livre.

Muitos estudos têm mostrado o potencial de proteínas de complexar o ferro, reduzindo a reatividade do metal e influenciando o processo de oxidação. Hegenauer *et al.* (1979) afirmaram que para suplementar leite com ferro, a adição do mineral deve ser feita após homogeneização, a fim de proteger a fração lipídica do leite, e em sua forma complexada, a qual promove menor extensão de oxidação lipídica. Hekmat e McMahon (1998) reportaram que a oxidação de lipídeos de leite fortificado com sulfato ferroso e sulfato ferroso amoniacal foi minimizada pela utilização de ferro complexado. Os autores sugerem que, uma vez ligado e impossibilitado de passar da espécie ferrosa para férrica, o ferro não agirá como catalisador das reações de oxidação lipídica.

Sugiarto *et al.* (2010), investigando a oxidação do ácido linoleico em emulsão contendo ferro livre e complexo proteína de leite-ferro, observaram que, para uma mesma concentração de ferro, a capacidade do metal catalisar oxidação lipídica foi reduzida significativamente quando complexos proteína-Fe foram adicionados à emulsão de ácido linoleico, sugerindo que a atividade pró-oxidante do ferro possa ser controlada pela complexação do ferro por proteínas. Ueno *et al.* (2014), estudando a formação de complexos BSA-Fe na presença de íons bicarbonato (pH 8,5), observaram capacidade antioxidante do complexo em prevenir oxidação de óleo de soja em emulsão, de modo semelhante ao observado pelos mesmos autores para complexos lactoferrina-Fe (Ueno *et al.*, 2012).

Independente da formação prévia de um complexo proteína-Fe, proteínas dispersas na fase contínua de emulsões óleo-em-água podem inibir a oxidação lipídica pelo mecanismo de eliminação de radicais livres ou complexação com metais pró-oxidantes dentro do sistema (Faraji *et al.*, 2004; Elias *et al.*, 2005; Guzun-Cojocar *et al.*, 2011). Essa atividade antioxidante pode ser aumentada pela hidrólise dessas proteínas. Elias *et al.* (2006)

observaram que hidrolisados de β -lactoglobulina são mais eficientes em inibir a oxidação lipídica em emulsões óleo-em-água do que uma concentração equivalente da proteína íntegra. De acordo com Díaz et al. (2003), caseinofosfopeptídeos podem se ligar ao ferro e inibir reações de oxidação em emulsões óleo-em-água, atuando assim como antioxidantes naturais. No entanto, faltam estudos que avaliem a influência de complexos peptídeo-Fe previamente formados no efeito pró-oxidante do ferro em sistemas emulsionados.

2.8.1. Avaliação da oxidação lipídica

A extensão da oxidação lipídica pode ser medida de diferentes formas. Independente da técnica utilizada, recomenda-se que tanto produtos primários quanto secundários sejam monitorados durante o processo de oxidação, uma vez que produtos primários são instáveis e podem converter-se em produtos secundários (Pratt *et al.*, 2011). Assim, a avaliação da formação de ambos ao longo do tempo pode dar uma melhor compreensão do processo.

A oxidação de ácidos graxos insaturados inicia-se por um mecanismo de radicais em cadeia e gera hidroperóxidos como produtos primários (Yamamoto *et al.*, 1987), os quais podem ser quantificados por diferentes técnicas. Essa medida é um indicador dos estágios iniciais da oxidação lipídica. No entanto, para avaliar se a concentração de hidroperóxido está em crescimento ou decaimento é necessário monitorar o índice de peróxido em função do tempo (Shahidi e Zhong, 2005). Os métodos analíticos para determinação de hidroperóxidos podem ser divididos em dois tipos: os que determinam a concentração total de hidroperóxidos e os que fornecem informações detalhadas sobre a estrutura e concentração de cada tipo específico de hidroperóxido, baseados em técnicas cromatográficas. O método mais comum utilizado para avaliação da extensão de oxidação em óleos e gorduras é a determinação do índice de peróxido (Dobarganes e Velasco, 2002), baseado na oxidação dos íons iodeto (I^-) pelos hidroperóxidos (ROOH) da amostra (Shahidi e Zhong, 2005). O iodo liberado é titulado com solução de tiosulfato e o índice de peróxido expresso como mEq de hidroperóxido por 1000 g de amostra (AOCS, 1997). As reações envolvidas são as seguintes:



Apesar de bastante utilizado, esse método apresenta algumas limitações, como baixa sensibilidade, necessidade de grande quantidade de lipídeos e dificuldade na determinação do ponto de viragem (Dobarganes e Velasco, 2002).

A partir da decomposição dos hidroperóxidos, uma série de produtos secundários pode ser formada, incluindo compostos voláteis, não voláteis e poliméricos. Existem várias técnicas para a avaliação desses compostos. Dentre elas, a determinação de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) é um dos ensaios mais comuns. Um dos principais produtos secundários da oxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados com três ou mais duplas ligações é o malonaldeído (MDA), dialdeído de 3 carbonos que reage com o composto ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um cromóforo rosa, que pode ser medido espectrofotometricamente (532-535 nm) (Mariutti e Bragagnolo, 2015). No entanto, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico incluem outras substâncias que reagem que não MDA, as quais formam adutos com o mesmo espectro UV/Vis que o padrão de MDA (Fernández *et al.*, 1997). Compostos como aminoácidos, açúcares, pigmentos de bile e outros produtos de oxidação lipídica também podem reagir com TBA, provocando a superestimação dos resultados de TBARS (Gutteridge, 1982). É possível realizar a extração de MDA, embora seja muito difícil devido à sua baixa massa molecular, alta polaridade, alta solubilidade em água e relativa instabilidade (Grotto *et al.*, 2009). De qualquer modo, tanto a determinação de MDA quanto TBARS têm sido realizadas em diferentes matrizes biológicas, como plasma, soro, saliva, tecidos (cérebro, fígado, pulmão, rim e coração) e urina para medir a extensão de estresse oxidativo (Mariutti e Bragagnolo, 2015).

Outra metodologia que pode ser utilizada para mensurar a formação de produtos secundários da oxidação lipídica é a identificação e quantificação de compostos voláteis. A técnica de microextração em fase sólida (do inglês, *Solid-phase micro-extraction*, SPME) vem sendo amplamente empregada para a extração desses compostos e posterior identificação e quantificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Essa técnica se baseia na adsorção dos analitos voláteis em uma fibra, após exposição da mesma ao *headspace* da amostra. A fibra de SPME é um bastão de sílica fundida de 100 mm de diâmetro, com 10 mm de uma extremidade recoberto com um filme fino de um polímero (e.g., polidimetilsiloxano = PDMS, poliacrilato = PA ou Carbowax = Cwx) ou de um sólido adsorvente (e.g., carvão ativo microparticulado = Carboxen) (Valente e Augusto, 2000). Posteriormente, os analitos são dessorvidos termicamente em um cromatógrafo a gás (Wardencki *et al.*, 2004).

Artigo 1. Synthesis of whey peptide-iron complexes: influence of using different iron precursor compounds

Artigo submetido ao periódico Food Research International.

Maria Elisa Caetano-Silva^a, Renata Carolina Alves^b, Guilherme Nunes Lucena^b, Regina Célia Galvão Frem^{b*}, Maria Teresa Bertoldo-Pacheco^c, Juliana Azevedo Lima-Pallone^a, Flavia Maria Netto^{a*}

^a*Faculty of Food Engineering, University of Campinas, UNICAMP. Monteiro Lobato 80, 13083-862 Campinas, SP, Brazil, e-mail: elisacaetano4@gmail.com; jpallone@fea.unicamp.br; fmnetto@unicamp.br*

^b*Institute of Chemistry, São Paulo State University, UNESP. Prof. Francisco Degni 55, PO Box 355, 14800-970 Araraquara, SP Brazil, e-mail: renata88_alves@hotmail.com; nuneslucena@mail.uft.edu.br; rcgfrem@iq.unesp.br*

^c*Center of Food Science and Quality, Institute of Food Technology, ITAL. Brasil Ave 2880, 13070-178 Campinas, SP, Brazil, e-mail: mtb@ital.sp.gov.br*

* *Corresponding authors. fmnetto@unicamp.br (F.M. Netto) and rcgfrem@gmail.com (R.C.G. Frem)*

ABSTRACT

Iron-binding peptides are an alternative to increasing bioavailability and to decreasing pro-oxidant effect of iron. This study aimed to synthesize and characterize peptide-iron complexes using FeCl₂ or FeSO₄ as iron precursor compounds. Whey protein isolate (WPI) and WPI hydrolyzed with pancreatin, followed or not by ultrafiltration (cut-off 5 kDa), were used as ligands. The fluorescence intensity of the ligands decreased dramatically as iron concentration increased, as a result of metal coordination with the iron-binding sites, which may have led to changes in Trp microenvironment. For both iron precursor compounds, the main iron-binding site was carboxylate groups, and the linkage occurred through bidentate coordination mode, evidenced by IR bands assigned to the two vibrational modes asymmetric and symmetric stretching of COO-Fe. However, the infrared spectroscopy and thermal analysis results showed that dynamics of interaction is different regarding the iron source. Thus, the iron source is of great importance because may lead to chemical differences and impact iron absorption and pro-oxidant effect of the mineral.

Keywords: iron-binding peptides; synthesis of coordination compounds; infrared spectroscopy; iron salts; whey protein hydrolysate; food fortification.

1. Introduction

Iron is an essential micronutrient, an intrinsic component of hemoglobin, myoglobin, and cytochromes (Luo & Xie, 2012). This mineral acts as a regulator, activator, and controller of several enzymatic reactions. Among its functions, it can be highlighted the formation of red blood cells, O₂ and CO₂ transport, electron transfer, redox reactions and cellular energy production (Lieu et al., 2001). Therefore, iron deficiency is responsible for several diseases and is one of the main nutritional problems in the world. Many efforts have been made to combat this deficiency, mainly regarding food fortification. However, it is still a challenge due to the questions associated such as low bioavailability, digestive problems like stomachache or diarrhea, and even changes in flavor and appearance of food products (Sugiarto et al., 2009).

Peptide-iron complexes can be a workaround to mitigate these problems. Under certain conditions, iron binding with an organic compound promotes the formation of complexes, which protects the micronutrient against the chemical reactions that occur during digestive process (Gligic et al., 2004). Iron-peptide binding is based on the interaction between an electron donator group at the ligand surface (peptide, in this case) and a Lewis acid (transition metal ion). The peptides present one or more accessible coordinating sites, ensuring that the metal atom becomes part of a biologically stable structure through coordinate covalent bonding. In this way, the complexed mineral is less prone to interactions with the chemical neighborhood (Miquel & Farré, 2007).

Ferrous or ferric salts, such as FeCl₂, FeCl₃, and FeSO₄, have been used to synthesize peptide-iron complexes and to study the iron-binding capacity of peptides (Chaud et al., 2002; Kim et al., 2007; Huang et al., 2011; Zhou et al., 2012; Ueno et al., 2014; Caetano-Silva et al., 2015; O'loughlin et al., 2015). Nevertheless, as far as we know, no effort has been made in studying the effect of iron sources on complexes formation, even though is widely known the role of different ions on peptides and protein structure and interactions (Zhang & Cremer, 2006).

In a previous study, we reported that the fractions of WPI hydrolysate with pancreatin showed the same iron-binding sites regardless of the molecular mass (MM). In the present work, we studied the ligand-metal complexation in peptide-iron complexes synthesized with two iron salts, FeCl₂ and FeSO₄, and different MM ligands. We aimed to understand better the differences resulting from the iron source, which may contribute to their future application to food fortification.

2. Material and Methods

2.1. Material

Whey Protein Isolate (WPI) was obtained from Glanbia Nutritionals (Kilkenny, Ireland). Pancreatin (4xUSP, from porcine pancreas, EC 232-468-9, P1750) was purchased from Sigma-Aldrich® (St.Louis, MO, USA). Iron precursors $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) and Sigma-Aldrich® (St.Louis, MO, USA), respectively. All other chemicals and reagents used were of analytical or chromatographic grade.

2.2. Preparation of hydrolysate and its fractions

The hydrolysate was obtained from enzymatic hydrolysis of WPI with the enzymatic system pancreatin, under previously defined conditions (Caetano-Silva et al., 2015). Briefly, WPI was diluted in deionized water (10% protein w/v) and the reaction occurred at pH 8.0, monitored using an Automatic Titrator — pH Stat (model DL 21 Grafix; Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Switzerland), with stirring and controlled temperature (40 °C). After 180 min, the enzyme was deactivated by heating (85 °C/15 min), and the reaction mixture was cooled in an ice bath.

The degree of hydrolysis (DH), calculated according to Adler-Nissen (1986), was 16.2%. The pH was adjusted to 6.0 with 1 mol/L HCl, and then a portion of the reaction mass was freeze-dried; this sample was named hydrolysate (H). A portion of H was fractionated in an Ultrafiltration System Pellicon® (Millipore, Bedford, MA, USA) with a cut-off membrane of 5 kDa (Cartridge Prep/Scale – TFF 6 ft²). The fraction of MM < 5 kDa was named filtrate (**F**) and the one with MM > 5 kDa, retentate (**R**).

2.3. Characterization of the ligands

2.3.1. Chromatography

Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was performed in an Agilent liquid chromatograph, Semi-Preparative and Analytical quaternary pump system, with Diode Array Detector (DAD) (Waldbronn, Germany), on a C₁₈ column Microsorb – MV™ (4.6 mm x 250 mm; 5 µm particle size) (Rainin, Woburn, MA, USA). Solvent composition was: solvent A – 0.04% de TFA in ultrapure water; solvent B – 0.03% TFA in

acetonitrile. The gradient elution conditions were solvent B from 0 to 70% in 40 min, 100% in 5 min, returning to 0% in more 5 min. Detection was at 214 nm, and the injection volume of 50 μ L of sample (3 mg protein/mL for **H**, **F**, and **R**, and 1 mg protein/mL for **WPI**).

2.3.2. Electrophoresis

The electrophoretic profiles were obtained using the SDS-PAGE Tricine system according to Schagger (2006), with separation gel containing 16% of acrylamide and 6 mol/L urea, and resolving and stacking gels containing 10% and 4% of acrylamide, respectively. Ligands were diluted (1% protein w/v) in reducing buffer (0.5 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol and 0.1% Coomassie Blue G250) and heated at 90 °C/5 min. Aliquots of 10 μ L of each sample were then loaded onto the gels. The peptides MM was estimated using a 3.5–26 kDa marker kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as standard.

2.4. Intrinsic fluorescence spectroscopy

Intrinsic fluorescence emission spectra of the ligands **H**, **F**, **R**, and **WPI**, with the addition of different amounts of iron from FeCl_2 or FeSO_4 (0 - 2 mmol Fe/L), were obtained using a Fluorimeter ISS K2 Multifrequency Phase (Champaign, IL, USA). The excitation wavelength was 280 nm, and emission wavelengths ranging from 290 to 500 nm were recorded. For that, ligands were diluted in ultrapure water (7.5 mg/mL), and solutions of iron salts were mixed to reach protein content of 5 mg/mL and iron:protein ratios ranging from 0 to 400 μ mol Fe/g protein. After 5 min of iron addition, the fluorescence emission spectra were obtained, as a plot of the fluorescence intensity *versus* wavelength (nm) (Lakowicz, 2006). Ten spectra were obtained for each ligand, with different iron:protein ratios. All spectra were corrected for blank emission.

In addition, the fluorescence emission spectra of solutions with the highest iron:protein ratio (400 μ mol Fe/ g protein) were obtained after 3 hours of reaction.

2.5. Synthesis of peptide-iron complexes

Hydrolysate (**H**) and its fractions **F** and **R** were used as ligands to synthesize the iron complexes. Complexes with **WPI** were also studied in order to compare the complexes synthesized with the whole protein. The iron precursors compounds were $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ or $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The reactions were carried out under the same conditions used in a previous work (Caetano-Silva et al., 2015), with protein:iron ratios 40:1 (w/w) and 5:1 (w/w), using 0.1% (w/v) of iron. Briefly, ligand solutions were adjusted to pH 7.0, to favor deprotonation of iron-

binding sites (Porath, 1990), and the iron salt was added. The pH of each reaction medium was monitored and adjusted every 15 min. After 1 h of reaction with stirring (25 ± 2 °C), the suspensions were centrifuged (5000g/20 min) and filtered through filter paper (Whatman nº 1). The iron content was determined (item 2.6) in the supernatants containing the complexes. The iron-binding capacity (%) was calculated as the iron solubility in supernatant respect to the initially added (Eq. 1).

$$\text{Iron – binding capacity (\%)} = \frac{\text{Fe supernatant}}{\text{Fe initial}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

The supernatants containing the complexes were freeze-dried and stored frozen (-18 °C). The iron complexes with **H**, **F**, **R**, and **WPI**, were named **H-Fe**, **F-Fe**, **R-Fe**, and **WPI-Fe**, respectively. The iron source was expressed with the letters **C** or **S** for FeCl_2 or FeSO_4 , respectively.

2.6. Determination of iron content

Iron content was determined by atomic absorption spectrophotometry (AAS) according to Boen et al. (2008), in a Perkin-Elmer Analyst 300 Spectrometer (USA) equipped with a deuterium lamp background corrector. All samples were subjected to acid digestion with concentrated nitric acid and hydrogen peroxide (2:1 v/v) at 110 °C/2 h, transferred quantitatively to volumetric flasks, and the volumes completed with ultrapure water. All experiments were carried out in triplicate. The iron content was measured using a hollow cathode lamp for iron (248.3 nm). The standard curve ranged from 0.2 to 2.6 mg Fe/L.

2.7. Characterization of the complexes

2.7.1. Infrared spectroscopy

Ligands and ligand-iron complexes (2 mg) were mixed with dry KBr and compressed in a compact disc. The vibrational spectra were recorded in a Perkin Elmer FT-IR Spectrometer 2000, in a spectral range from 4000 to 400 cm^{-1} , 16 scans, with a resolution of 2 cm^{-1} . Spectra were analyzed using the data analysis software Origin 6.0 (Microcal Software, Inc., One Roundhouse Plaza, Northampton, USA).

2.7.2. Thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis (DTA)

Thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis (DTA) curves were obtained using a TA Instruments model SDT2960 with a thermocouple system controlled by Thermal Solutions TA Instruments software. Samples **F**, **F-Fe C**, and **F-Fe S** (7 mg) were analyzed in α -alumina sample holders, under flow of dry synthetic air (100 mL min⁻¹), temperature from 30 to 1000 °C, and at heating rate of 10 °C min⁻¹ (97 min of analysis). The reference substance was pure α -alumina in DTA measurements (Netto *et al.*, 2007). The software Origin 6.0 (Microcal Software, Inc., One Roundhouse Plaza, Northampton, USA) was used to analyze the curves.

2.8. Statistical analysis

The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The statistical analysis was performed using the statistical package GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results and Discussion

3.1. Characterization of the ligands

The chromatographic (RP-HPLC) profile of **H** and its fractions **F** and **R** (Figure 1 A) showed the absence of α -lactalbumin (α -La) and β -lactoglobulin (β -Lg) peaks, observed in **WPI** profile, indicating the hydrolysis of these proteins to smaller and more hydrophilic fragments. The profiles of **H** and **F** (Figure 1 A) are similar, with the majority of the peptides eluted in the regions of high and medium hydrophilicity region (10 min < RT < 20 min; RT = retention time). On the other hand, the profile of **R** showed a lower number of peaks than the other ligands.

The electrophoretic (SDS-PAGE Tricine) profiles of ligands (Figure 1 B) evidenced differences of MM among them. No band was observed in the profile of **F** possibly due to the presence of peptides < 3 kDa, which may not have been stained as a result of their loss during fixing and/or coloring the gel (Schägger & Von Jagow, 1987; Claeys *et al.*, 2004). The profile of **H** showed the disappearance of α -La (14.2 kDa) and β -Lg (18.4 kDa), which are present in **WPI** profile.

Literature has reported the influence of MM on the iron-binding capacity of peptides, with discrepancy among studies. Iron-binding capacity is reported to be higher to peptides with MM 10-30 kDa (Lv et al., 2009) or to peptides with MM < 1 kDa (O'loughlin et al., 2015). The ligands showed differences in MM and hydrophilicity, which may lead to different capacity of free iron to access the iron-binding sites, possibly resulting in different complexes.

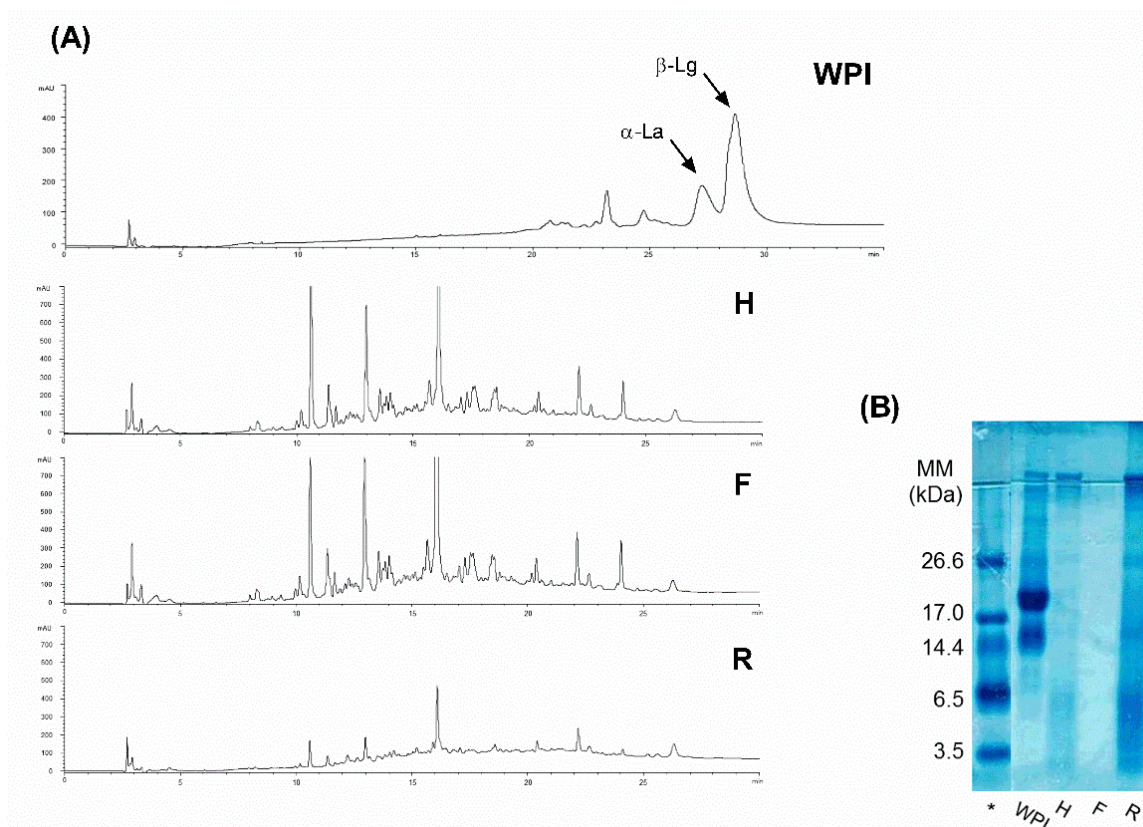


Figure 1. (A) Chromatographic profile (RP-HPLC) and (B) electrophoretic profile (SDS-PAGE Tricine) of ligands. **WPI** – whey protein isolate; **H** - Hydrolysate; **F** – Filtrate (fraction < 5 kDa); **R** - Retentate (fraction > 5 kDa). * Molecular mass standard

3.2. Intrinsic fluorescence spectroscopy

The fluorescence emission spectra of the ligands with no iron salt addition and after the interaction with the metal in different concentrations are shown in Figure 2. The $\lambda_{\max}$ of the ligands ranged from 310 to 350 nm, which is in accordance with Trp emission range (Adams et al., 2002). The fluorescence emission spectra of **H** and the fractions **F** and **R** showed higher intensity and a red shift of the $\lambda_{\max}$ as compared to **WPI** spectra (Figure 2), suggesting that structural changes affected Trp upon hydrolysis (Zhou et al., 2012). The fluorescence emission spectra of **H** and **F** showed differences respect to **R** spectra possibly due to differences in peptide profiles, as observed in chromatographic and electrophoretic profiles (Figure 1).

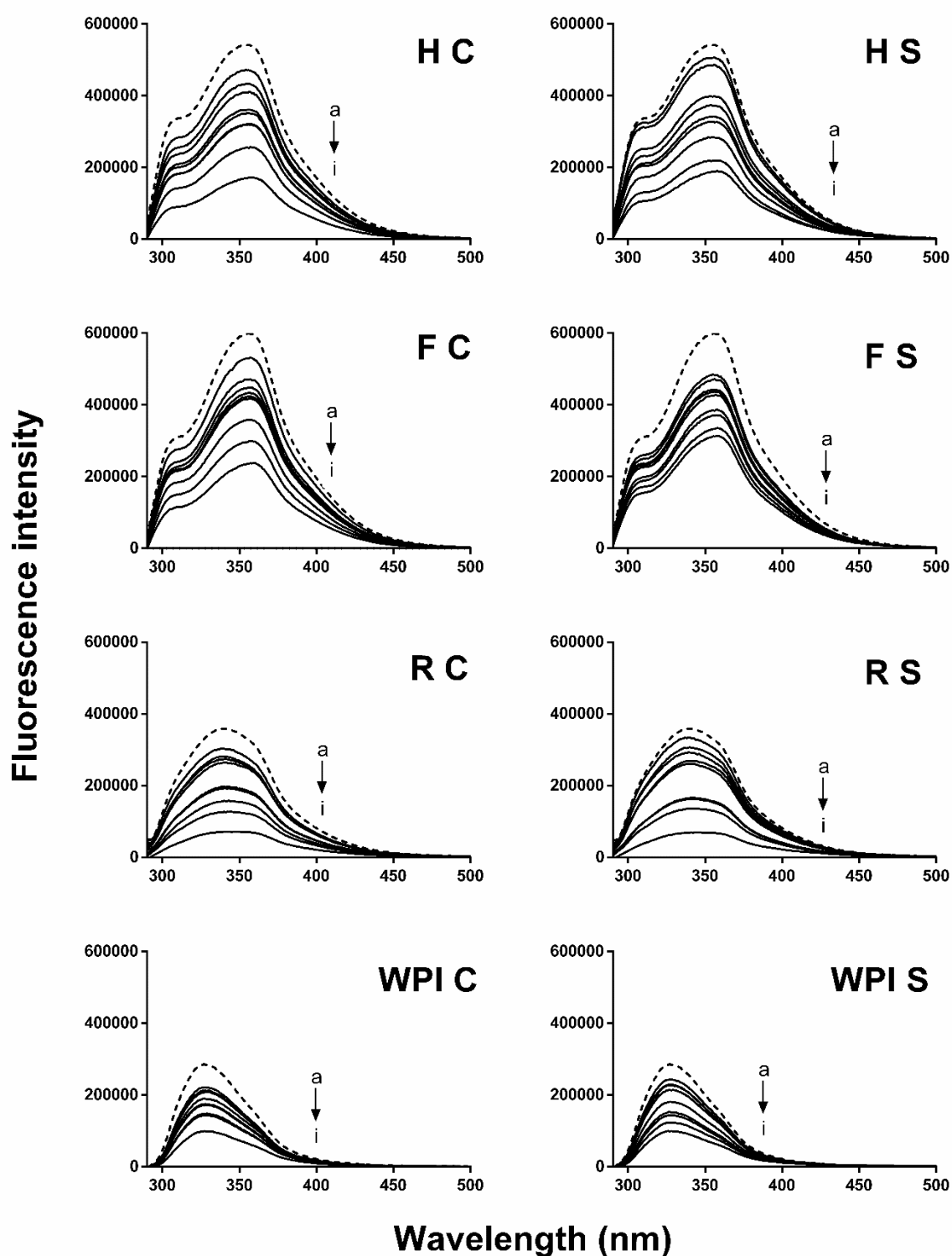


Figure 2. Fluorescence emission spectra of ligands **H** - hydrolysate; **F** – filtrate (fraction < 5 kDa); **R** – retentate (fraction > 5 kDa); **WPI** – whey protein isolate (5 mg protein/mL) without iron addition (dashed lines) and with addition of **C** - FeCl_2 or **S** - FeSO_4 (full lines) in different iron:protein ratios. **(a-i)** 10; 20; 30; 40; 60; 80; 100; 200; 400 $\mu\text{mol Fe/g protein}$. Excitation wavelength: 280 nm; emission wavelength: 290-500 nm.

The fluorescence intensity of all ligands decreased up to 70% with iron addition regardless of the iron source. For all ligands, the highest iron:protein ratio (400 $\mu\text{mol Fe/g}$ protein) led to the lowest fluorescence intensity although the intensity was not totally extinguished, as measured after 5 min of reaction. However, after 3 hours of reaction the spectra of samples with the same iron:protein ratio showed total fluorescence quenching. Changes in Trp environment took place after the measurement at 5 min of reaction, suggesting that a longer reaction time allows Trp residues exposition to a more polar environment (Agyare & Damodaran, 2010). Iron interaction with the iron-binding sites, especially carboxyl groups, may change Trp fluorescence depending on the impact of such interaction on the peptide/protein conformation (Lakowicz, 2006), which may result in transfer of Trp to the surface (Zhou et al., 2012).

Other factors such as ionic strength might affect the conformation of the ligands, interfering with their iron-binding capacity. The ionic strength of reaction mixture increases up to 300% from 10 to 400 $\mu\text{mol Fe/g}$ protein. At the same iron:protein ratio, the ionic strength of reaction mixture with FeSO_4 is approximately 30% higher than with FeCl_2 , which may affect ligand-ligand interactions, leading to different expositions of iron-binding sites. Furthermore, the counterions (SO_4^{2-} and Cl^-) have different positions in Hofmeister series, differing in their capacity to influence on protein stability and protein-protein interaction (Zhang & Cremer, 2006). The sulfate ion is larger than chloride and exerts an aggregation effect on proteins (salting out), whereas chloride ion shows more solubilizing effect than SO_4^{2-} (salting in). Thereby, the complexes could show differences regarding the conformation of peptides in their formation (*see below Infrared discussion*).

3.3. Synthesis of peptide-iron complexes

Figure 3 shows the iron-binding capacity expressed as iron solubility (%) at pH 7.0 after the complexes synthesis, for both protein:iron ratio 40:1 and 5:1. The low iron solubility observed in control samples with iron salts (**BFe**), 1.5% for FeCl_2 and 18.4% for FeSO_4 , is due to ferric hydroxide formation, which is insoluble at this pH. Synthesis reaction led to an increase in iron solubility, suggesting that all ligands showed iron-binding capacity regardless of their MM, which is in accordance with other authors (Wu et al., 2012; Guo et al., 2013; Lv et al., 2014).

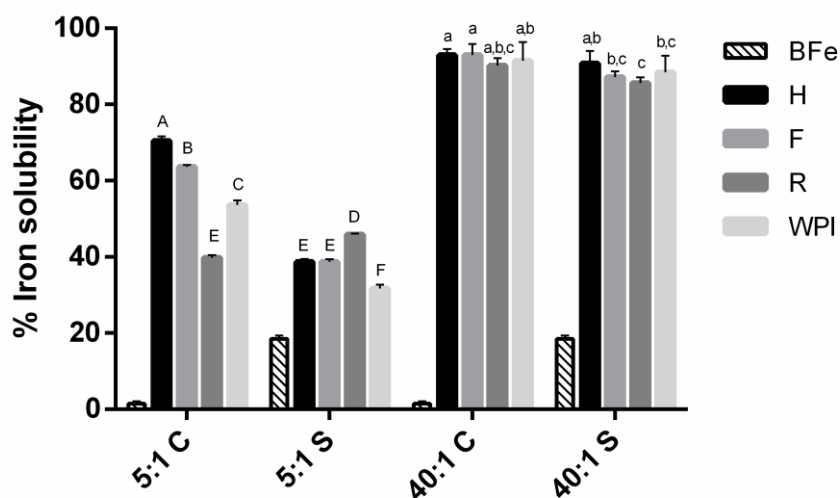


Figure 3. Iron solubility (%) after complexes synthesis (pH 7.0) under ratio protein:Fe (w/w) of 40:1 or 5:1 with FeCl_2 (**C**) or FeSO_4 (**S**). **BFe** - control assay with only iron salt; **H** - hydrolysate; **F** - filtrate (fraction < 5 kDa); **R** - retentate (fraction > 5 kDa); **WPI** - whey protein isolate. *samples with different letters are statistically different ($p < 0.05$); controls assays (**BFe C** e **BFe S**) are not included in the statistical analysis ANOVA and Tukey.

At ratio 40:1, complexes with FeCl_2 showed iron solubility similar to those with FeSO_4 , 84 to 93%, which is possibly due to a large number of available iron-binding sites. At ratio 5:1, synthesis with FeCl_2 led to iron solubility significantly higher than with FeSO_4 , and to greater differences among the ligands than with FeSO_4 (Figure 3). The low iron solubility at this ratio, ranged from 32% to 70%, is related to the low peptide concentration of the synthesis mixture in relation to iron concentration, and the consequent low availability of iron-binding sites. At this ratio, pH instability of the reaction medium was observed. The low protein concentration, not sufficient to act as buffering agent, allowed iron hydroxide formation and precipitation, hindering the iron-binding to the available sites.

3.4. Characterization of the complexes: Infrared spectroscopy and thermal analysis

Infrared (IR) spectroscopy is a technique based on radiation absorption due to the vibration between molecule atoms (Haris & Chapman, 1995), and it has been applied to obtain information concerning the chemical composition, in addition to the conformational structure of proteins and peptides.

The IR spectra of the complexes synthesized with protein:iron ratio of 40:1 were similar to the correspondent ligand spectra (data not shown), possibly because the high proportion of unbound peptides, which may have overlapped modifications induced by iron

binding. Thus no relevant information was obtained from the coordination chemistry point of view. Spectra of the complexes synthesized with protein:iron ratio of 5:1, in turn, enabled the evaluation through this spectroscopic technique. Table 1 shows the main absorption bands in the infrared spectra and the assignments of corresponding vibrational modes of the free ligands and the peptide-iron complexes.

Table 1. Main absorption bands in the infrared and assignments of the corresponding vibrational modes of free ligands (**H** - hydrolysate; **F** - filtrate; **R** – retentate, and **WPI** - whey protein isolate) and their respective iron complexes, obtained from FeCl_2 (-**Fe C**) or FeSO_4 (-**Fe S**).

IR bands (wavenumber, cm^{-1})				Assignment
H	F	R	WPI	
3437s, br	3427s, br	3432s, br	3411s, br	$\nu\text{O-H}$
3268vw	3268vw	-	3285s	Amide A ($\nu\text{N-H}$)
2967vw, 2927vw	2964vw, 2930vw	-	2960vw, 2927vw	$\nu\text{C}_{\text{aliphatic}}\text{-H}$
1632s	1632s	1632s	1632s	Amide I ($\nu\text{C=O}$)
1592s	1592s	1592s	1552w	Amide II
1385m, 1344w	1385m, 1344w	1385m, 1344w	1380m, 1344w	Amide III
1110w, 1039vw	1110w, 1039vw	1100vw, br	1110vw, br	$\nu\text{O-C}$
-	1077 vw	-	1085 vw	$\delta\text{C-H}$
-	989w	-	990w	$\nu\text{C-C-N}$
H-Fe C	F-Fe C	R-Fe C	WPI-Fe C	
3401s, br	3406s, br	3386s, br	3411s, br	$\nu\text{O-H}$
3268vw	3268vw	-	3272w	Amide A ($\nu\text{N-H}$)
3065w	3066w	-	3062w	$\nu\text{C}_{\text{aromatic}}\text{-H}$
2965, 2927vw	2964, 2932vw	-	2966, 2927vw	$\nu\text{C}_{\text{aliphatic}}\text{-H}$
1653s, br	1653s, br	1653s	1651s	Amide I + $\nu_{\text{as}}\text{COO-Fe}$
1540m	1540m	1539s	1532w	Amide II
1431s	1431s	1431s	-	$\nu_{\text{s}}\text{COO-Fe}$
1344vw	1344vw	1344vw	-	Amide III
1117vw	1117vw	1109vw	1114vw	$\nu\text{O-C-Fe}$
1073vw	1073vw	-	1070vw	$\delta\text{C-H}$
H-Fe S	F-Fe S	R-Fe S	WPI-Fe S	
3554sh, 3474sh, 3414s	3554sh, 3474sh, 3414s	3414s, br	3419s, br	$\nu\text{O-H} + \text{H-bonds}$
3248w	3248w	-	-	Amide A ($\nu\text{N-H}$)
2967, 2927vw	2966, 2928vw	-	2968, 2927vw	$\nu\text{C}_{\text{aliphatic}}\text{-H}$
1640s, 1621w	1640s, 1619w	1641s	1641s	Amide I + $\nu_{\text{as}}\text{COO-Fe}$
1556vw	1555vw	1543s	1542w	Amide II
1431vw	1431w	-	-	$\nu_{\text{s}}\text{COO-Fe}$
1385w	1385w	1385w	1380	Amide III
1146s	1150s	1149s	1144s	SO_4^{2-}
1114vw	1115vw	1122vw	1120vw	$\nu\text{O-C-Fe}$
993w	994vw	996w	-	$\nu\text{C-C-N}$
627m	624m	624w	619w	SO_4^{2-}

s= strong; br= broad; sh=shoulder; w= weak; vw=very weak; m=medium

Concerning the free ligands, some differences were observed in the vibrational spectrum of **WPI** in relation to the hydrolysate and its fractions. For instance, the Amide II band can be observed as a strong band at 1592 cm^{-1} in the spectra of peptide ligands (**H**, **F**, and **R**) and at 1552 cm^{-1} in the **WPI** spectrum (Table 1). Amide II band shows the breaking of peptide bonds during the hydrolysis process since this band is dependent on secondary conformations, and its position for intact protein and peptides is different (Prigogine & Rice, 2009).

Regardless of the iron precursor compound (FeCl_2 or FeSO_4) or the ligand, in general, the interactions of the divalent metallic ion and the ligands led to formation of orange species, characteristic color of iron(III) compounds. Both IR and TG/DTA techniques were used to characterize the peptide-iron complexes and allowed inference of some important aspects concerning the coordination of the metal and the influence of using different iron precursor compounds, which will be discussed in details.

3.4.1. Iron coordination by the ligands

The Amide I band, originated mainly from peptide $\text{C}=\text{O}$ stretching vibration mode, was observed at 1632 cm^{-1} (Mukherjee et al., 2007) in the free ligand spectra (Table 1). After complexation, it was split into two components in the spectra of both FeSO_4 and FeCl_2 complexes (Figure 4). The second component corresponds to the asymmetric stretching of $\text{Fe}-\text{COO}$ bond (near 1620 cm^{-1}), confirming the formation of iron complexes through the interaction with the carboxyl group, preferentially with the side chains of Asp or Glu residues.

At 1431 cm^{-1} , it was observed for the complexes with both iron sources the appearing of an important band associated with symmetric stretching vibration of the $\text{Fe}-\text{COO}$ bond. In addition, the shift of $\nu_s\text{C}-\text{O}$ bands from $1110\text{-}1039$ (**H** and **F**) to 1117 cm^{-1} in the complexes indicates the formation of $\text{Fe}-\text{O}-\text{C}$ bonds. However, for the complexes obtained with FeSO_4 , the real value cannot be observed from the IR spectra because of sulfate overlapping the band at the same region (sulfate vibrational mode, as a very intense band at $1146\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$). O'loughlin et al. (2015) have also observed a band at 1110 cm^{-1} which was assigned to sulfate group in a fraction of whey hydrolysate added with FeSO_4 . Thus, much information concerning metal-peptide interaction in FeSO_4 complexes could be hidden under this broadband. The sulfate group is an integrant part of the Fe complexes, either in the coordinated form - $[\text{Fe}(\text{pept})\text{SO}_4]$ - or as a counterion - $[\text{Fe}(\text{pept})]\text{SO}_4$.

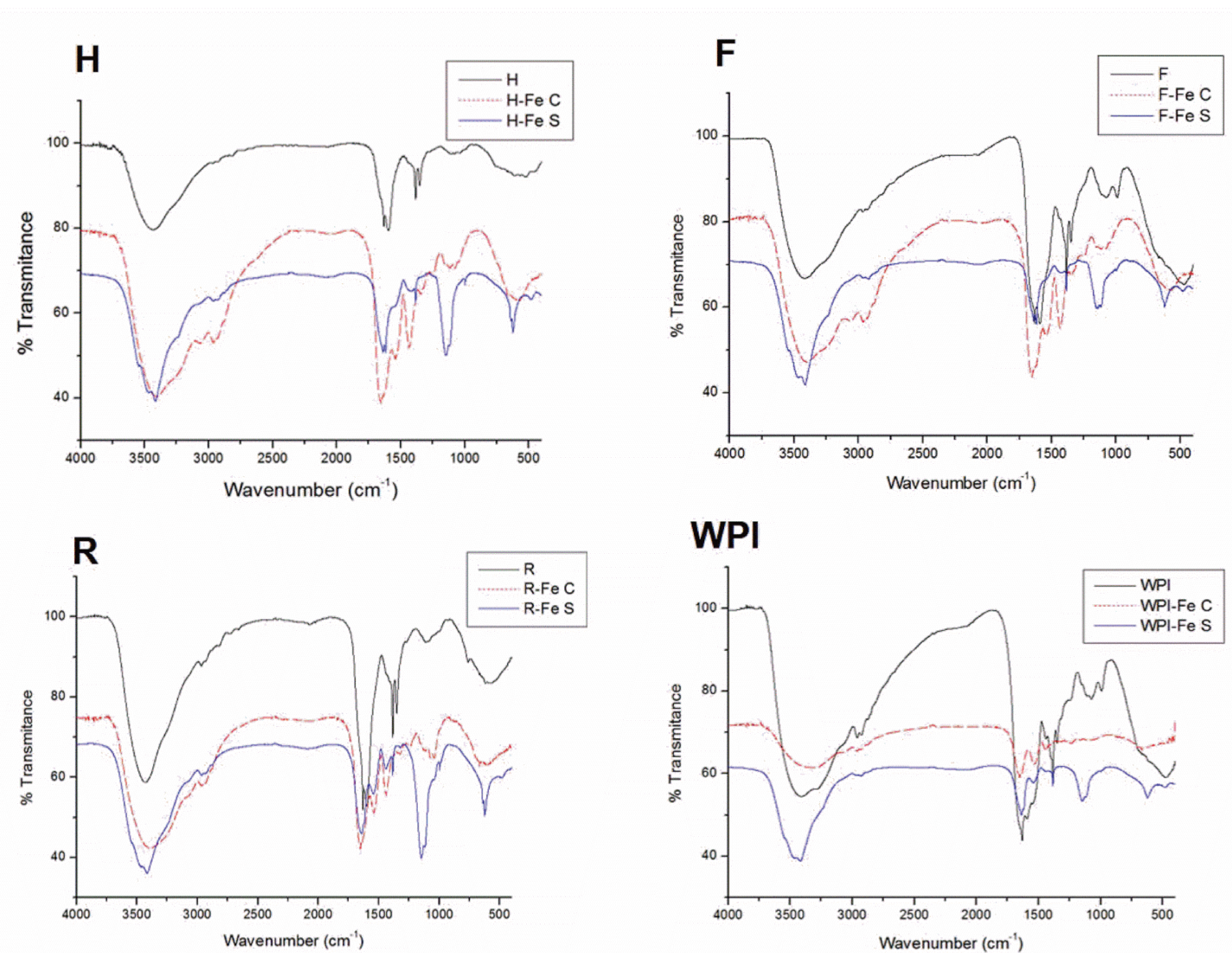


Figure 4. IR spectra of **H** - hydrolysate and its complexes (**H-Fe**); **F** - filtrate (fraction < 5 kDa) and its complexes (**F-Fe**); **R** - retentate (fraction > 5 kDa) and its complexes (**R-Fe**); and **WPI** – whey protein isolate and its complexes (**WPI-Fe**) synthesized from FeCl₂ (**-Fe C**) or FeSO₄ (**-Fe S**).

Despite the differences in MM profile of the ligands (Figure 1), it was possible to infer metal coordination with all ligands and their iron-binding sites seem to be the same. High MM peptides (ligand **R**) or the structure of the whole protein (**WPI**) did not impair the linkage with iron atoms. In fact, in a previous work (Caetano-Silva et al., 2015) we demonstrated that the iron-binding peptides are coincident in both types of fractions (**F** and **R**). The fragments, rich in the main iron-binding sites Asp (D) and Glu (E) residues (Chaud et al., 2002; Lv et al., 2009), were from the sequences ⁴²YVEELKPTPEGDLEIL⁵⁷ and ¹²⁴RTPEVDDEALEK¹³⁵ from β -Lg and ⁸²DDDLTDDI⁸⁹ from α -La. However, it was not possible to quantify the coordinate covalent bonds formed in those different complexes. It is worth highlighting that, besides the coordinate covalent bond, other interactions, such as Van der Waals forces, hydrophobic forces, and also hydrogen bonding, strongly influence in the peptide-Fe complex formation and even in its stability (Faa & Crisponi, 1999; Eckert et al., 2016) and thus may result in different complexes synthesized with different ligands.

3.4.2. Influence of the iron precursor compounds

Concerning the different iron precursor compounds, FeCl₂ or FeSO₄, the infrared spectroscopy also allowed identifying significant differences among the obtained complexes. The IR spectra of free ligands (**H**, **F**, **R**, and **WPI**) are illustrated in Figure 4 and showed two components of Amide III band, at 1385 cm⁻¹ (band of medium intensity) and 1344 cm⁻¹ (very weak band) (see also Table 1). This band involves a combination of peptide N-H in-plane bending and C-N stretching motions, and it is conformationally sensitive. IR spectra of complexes obtained from FeSO₄ showed the more important component of the Amide III band (1385 cm⁻¹), whereas in the IR spectra of peptide-Fe complexes formed from FeCl₂ only the second component (at 1344 cm⁻¹) can be observed, which can be tentatively assigned to the presence of hydrated α -helix (Berova et al., 2012). This result is in accordance with the presence of an intense and broad ν O-H band at 3401 cm⁻¹ in the spectra of FeCl₂ complexes, assigned to water molecule vibrations. These spectroscopic results suggest a strong local structural distortion in the FeCl₂ complexes as a result of coordination (Haris & Chapman, 1995; Ianoul et al., 2001).

The Amide A band, assigned to the stretching vibration of N-H bond, was observed in the spectra of FeCl₂ complexes in the same region as that of the free ligands (3268 cm⁻¹, Table 1), suggesting that iron was not coordinated by the amino groups in these compounds. The pH of reaction (7.0) was lower than the pK_a of NH₃⁺ group (~ 9.5), and thus the majority of amino groups was protonated during the synthesis. This fact possibly hindered the formation

of Fe-N bonds. The same occurred with the complexes with FeSO_4 , which is in accordance with Eckert et al. (2016), who also reported that Fe^{2+} did not bind to N-terminus of a heptapeptide from barley protein. However, in the FeSO_4 complexes the Amide A band showed a shift toward a lower wavenumber (from 3268 in free ligand to 3248 cm^{-1}), suggesting an increase in the hydrogen bond forces (Barth, 2007), since this band is very sensible to the strength of hydrogen bonds (Krimm & Bandekar, 1986). Analyzing the region associated to O-H stretching vibrational modes, besides the main band at 3414 cm^{-1} , very weak bands at 3554 and 3474 cm^{-1} , assigned to H-bonds, were observed in the spectra of FeSO_4 complexes but not in FeCl_2 complexes. Therefore, FeSO_4 complexes seem to present more hydrogen bonds than the FeCl_2 ones, as a result of ligand-ligand interactions. This finding can be explained by the greater effect exerted by sulfate anions toward protein aggregation, which is in strong concordance with the difference of position of these ions in the Hofmeister series, as was pointed out before.

Concerning the thermogravimetric (TG) and differential thermal analysis (DTA) curves, the complexes **F-Fe C** and **F-Fe S** showed different thermal behaviors (Figure 5), corroborating the IR results. The curve of the free ligand (**F**) showed the same global trend reported in the literature to the thermal behavior of proteins (Dandurand et al., 2014; Zhang et al., 2016). The first step took place in the temperature interval of 22 - 417 °C involving a mass loss of 57.4%, corresponding to the evaporation of surface water molecules (DTA endothermic peak at 83.5 °C) and the beginning of the thermal decomposition (Table 2). The high mass loss may be related to the very high hydrophilic behavior of whey peptides, which often absorb water even at room temperature. These processes were followed by the combustion in two additional steps. The rupture of peptide bonds is possibly associated with the DTA exothermic peak at 480.4 °C, followed by the slow decomposition (from 558 to 876 °C) of the formed carbonaceous material. Therefore virtually no solid residue remained at the end of the experiment.

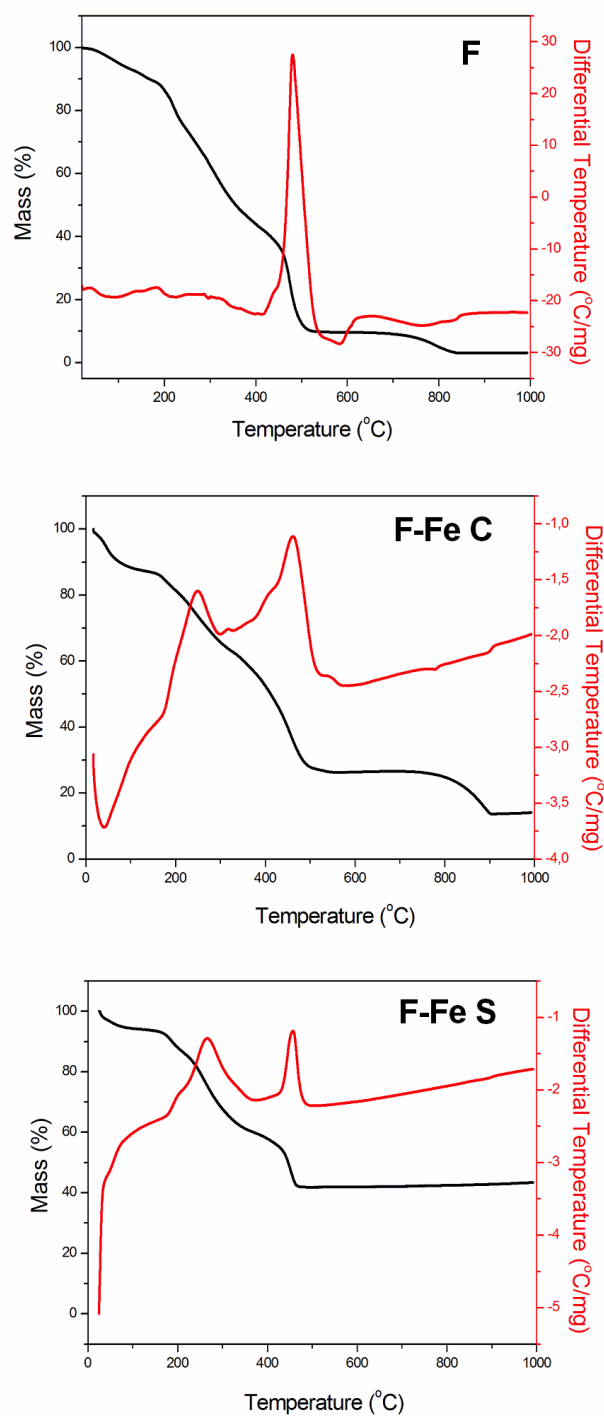


Figure 5. TG and DTA curves of filtrate (fraction < 5 kDa) (**F**) and respective complexes synthesized with FeCl_2 (**F-Fe C**) or FeSO_4 (**F-Fe S**)

Table 2. Initial and final temperatures (°C), partial mass losses (%), and DTA peaks (°C) of filtrate (**F**) and the corresponding peptide-iron complexes, **F-Fe C** and **F-Fe S**.

Compound	Step	ΔT (°C)	Δm (%)	DTA peaks (°C)		Assignments
				Endo	Exo	
F	1	22 - 417	57.4	83.5	183.4	water evaporation and combustion
	2	417-558	32.2	-	480.4	sample decomposition from rupture of polypeptide bonds, forming carbonaceous material
	3	558-876	7.0	-	-	decomposition of carbonaceous material
F-Fe C	1	17 - 118	12.4	40.4	-	water evaporation
	2	118 - 331	24.9	170.4	249.1	coordinated water liberation and rupture of peptide-Fe bonds
	3	331 - 577	35.7	-	461.9	rupture of polypeptide bonds and formation of Fe_2O_3
	4	761 - 906	13.3	-	-	decomposition of carbonaceous material
F-Fe S	1	25 - 156	6.6	42.6	-	water evaporation
	2	156 - 348	31.8	171.5	265.1	coordinated water liberation and rupture of peptide-Fe bonds
	3	348 - 476	19.3	-	456.6	rupture of polypeptide bonds and formation of Fe_2O_3

F: free ligand, filtrate (fraction < 5 kDa); **F-Fe C**: peptide-iron complex synthesized with filtrate (fraction < 5 kDa) and $FeCl_2$; **F-Fe S**: peptide-iron complex synthesized with filtrate (fraction < 5 kDa) and $FeSO_4$.

The peptide-Fe complex obtained from $FeCl_2$ (**F-Fe C**) decomposed in three steps, after the dehydration process that occurred between 17 to 118 °C (Figure 5). The water loss of this species (12.4%) was around 88% higher than the **F-Fe S** (see below), which is consistent with the IR spectroscopic studies that revealed the presence of hydrated α -helix in the complexes obtained from $FeCl_2$, as well as an intense and broad $\nu O-H$ band at 3401 cm^{-1} , assigned to water molecule vibrations (see Figure 4). The breaking of the peptide bonds occurred at 461.9 °C in this case, with formation of Fe_2O_3 , and it was preceded by a step in which metal-peptide bonds were broken (the corresponding DTA exothermic peak was observed at 249.1 °C) (Table 2). Finally, the carbonaceous material slowly decomposed from 761 to 906 °C.

Concerning the peptide-Fe complex obtained from FeSO_4 , the thermal decomposition of **F-Fe S** occurred in only two steps, after the evaporation of adsorbed water observed in the range 25-156 °C (with corresponding weight loss of 6.6 %). The first step, from 156 to 348 °C, is most likely related to the removal of coordinated water as well as the rupture of the peptide-iron bond, which was accompanied by a DTA exothermic peak at 265.1 °C. In the range of 348 - 476 °C, it was observed the final loss of the remaining organic part (exothermic peak at 456.6 °C), accompanied by the formation of Fe_2O_3 as the final product. According to the literature, in an oxygen atmosphere, iron(II) is converted to iron(III) before the sulfate species decompose via liberation of SO_3 gas (Gallagher et al., 1970).

It is evident, therefore, that the distinct spectroscopic and thermal behaviors of **F-Fe S** and **F-Fe C** allowed inferring that the counterions, which influenced the interactions ligand-metal and ligand-ligand, have a crucial role in the complex structure and its potential biological activity. Different structures can lead to different exposure of cleavage sites of gastrointestinal enzymes, which in turn can influence on the complexes digestion and hence on iron uptake (Eckert et al., 2016). The iron source may also influence on the capacity of the complex to carry iron during gastrointestinal digestion, hindering its interaction with other compounds and decreasing the pro-oxidant effect of the metal.

4. Conclusion

Complexes synthesized from both iron precursor compounds, FeCl_2 and FeSO_4 , showed metal-carboxylate coordination via bidentate mode and different effects on ligand conformation. The counterions play a central role in the process of complexes formation since they can interfere in the exposure of binding sites of the peptides or in the complexes conformation. In fact, chloride or sulfate substantially affects the dynamic of peptide-Fe interaction, yielding completely different compounds. Therefore, the adequate choice of the iron source to synthesize peptide-iron complexes is of great importance since the differences in ligand conformation and complexes structure may lead to differences in iron absorption and its pro-oxidant effect.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian Biosciences National Laboratories (LNBio) for the support with the Fluorescence analysis and the Laboratory of Organometallic Compounds (Institute of Chemistry, UNESP) for the support with the Infrared and Thermogravimetric analyses. This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [grant number 2013/10356-7].

References

- Adams, P. D., Chen, Y., Ma, K., Zagorski, M. G., Sönnichsen, F. D., McLaughlin, M. L., & Barkley, M. D. (2002). Intramolecular Quenching of Tryptophan Fluorescence by the Peptide Bond in Cyclic Hexapeptides. *Journal of the American Chemical Society*, 124(31), 9278-9286.
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. New York: Elsevier Applied Science Publishers.
- Agyare, K. K., & Damodaran, S. (2010). pH-Stability and Thermal Properties of Microbial Transglutaminase-Treated Whey Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1946-1953.
- Barth, A. (2007). Infrared Spectroscopy of Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(9), 1073-1101.
- Berova, N., Polavarapu, P. L., Nakanishi, K., & Woody, R. W. (2012). *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy, Applications in Stereochemical Analysis of Synthetic Compounds, Natural Products, and Biomolecules*. J. W. Sons (Vol. 2).
- Boen, T. R., Soeiro, B. T., Pereira-Filho, E. R., & Lima-Pallone, J. A. (2008). Folic Acid and Iron Evaluation in Brazilian Enriched Corn and Wheat Flours. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19, 53-59.
- Caetano-Silva, M. E., Bertoldo-Pacheco, M. T., Paes-Leme, A. F., & Netto, F. M. (2015). Iron-Binding Peptides from Whey Protein Hydrolysates: Evaluation, Isolation and Sequencing by LC-MS/MS. *Food Research International*, 71, 132-139.
- Chaud, M. V., Izumi, C., Nahaal, Z., Shuhama, T., Bianchi Mde, L., & de Freitas, O. (2002). Iron Derivatives from Casein Hydrolysates as a Potential Source in the Treatment of Iron Deficiency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 871-877.
- Claeys, E., De Smet, S., Balcaen, A., Raes, K., & Demeyer, D. (2004). Quantification of Fresh Meat Peptides by Sds-Page in Relation to Ageing Time and Taste Intensity. *Meat Science*, 67(2), 281-288.
- Dandurand, J., Samouillan, V., Lacoste-Ferre, M. H., Lacabanne, C., Bochicchio, B., & Pepe, A. (2014). Conformational and Thermal Characterization of a Synthetic Peptidic

- Fragment Inspired from Human Tropoelastin: Signature of the Amyloid Fibers. *Pathologie Biologie (Paris)*, 62(2), 100-107.
- Eckert, E., Lu, L., Unsworth, L. D., Chen, L., Xie, J., & Xu, R. (2016). Biophysical and in Vitro Absorption Studies of Iron Chelating Peptide from Barley Proteins. *Journal of Functional Foods*, 25, 291-301.
- Faa, G., & Crisponi, G. (1999). Iron Chelating Agents in Clinical Practice. *Coordination Chemistry Reviews*, 184(1), 291-310.
- Gallagher, P. K., Johnson, D. W., & Schrey, F. (1970). Thermal Decomposition of Iron(II) Sulfates. *Journal of the American Ceramic Society*, 53(12), 666-670.
- Gligic, L., Palic, T., & Nikolovski, J. (2004). The Beneficial Effects of Iron-Enriched Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* Biomass in Poultry Breeding. *Folia Veterinaria*, 48(2), 104-107.
- Guo, L., Hou, H., Li, B., Zhang, Z., Wang, S., & Zhao, X. (2013). Preparation, Isolation and Identification of Iron-Chelating Peptides Derived from Alaska Pollock Skin. *Process Biochemistry*, 48(5-6), 988-993.
- Haris, P. I., & Chapman, D. (1995). The Conformational Analysis of Peptides Using Fourier Transform IR Spectroscopy. *Biopolymers*, 37(4), 251-263.
- Huang, G., Ren, Z., & Jiang, J. (2011). Separation of Iron-Binding Peptides from Shrimp Processing by-Products Hydrolysates. *Food and Bioprocess Technology*, 4(8), 1527-1532.
- Ianoul, A., Boyden, M. N., & Asher, S. A. (2001). Dependence of the Peptide Amide III Vibration on the Φ Dihedral Angle. *Journal of the American Chemical Society*, 123(30), 7433-7434.
- Kim, S. B., Seo, I. S., Khan, M. A., Ki, K. S., Nam, M. S., & Kim, H. S. (2007). Separation of Iron-Binding Protein from Whey through Enzymatic Hydrolysis. *International Dairy Journal*, 17(6), 625-631.
- Krimm, S., & Bandekar, J. (1986). Vibrational Spectroscopy and Conformation of Peptides, Polypeptides, and Proteins. In C. B. Anfinsen, J. T. Edsall & F. M. Richards (Eds.), *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 38, pp. 181-364): Academic Press.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Springer.
- 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.
- Luo, Y., & Xie, W. (2012). Effect of Phytase Treatment on Iron Bioavailability in Faba Bean (*Vicia Faba* L.) Flour. *Food Chemistry*, 134(3), 1251-1255.
- Lv, Y., Guo, S., Tako, E., & Glahn, R. P. (2014). Hydrolysis of Soybean Protein Improves Iron Bioavailability by Caco-2 Cell. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(4), 162-166.

- Lv, Y., Liu, Q., Bao, X., Tang, W., Yang, B., & Guo, S. (2009). Identification and Characteristics of Iron-Chelating Peptides from Soybean Protein Hydrolysates Using IMAC-Fe³⁺. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4593-4597.
- Miquel, E., & Farré, R. (2007). Effects and Future Trends of Casein Phosphopeptides on Zinc Bioavailability. *Trends in Food Science and Technology*, 18(3), 139-143.
- Mukherjee, S., Chowdhury, P., & Gai, F. (2007). Infrared Study of the Effect of Hydration on the Amide I Band and Aggregation Properties of Helical Peptides. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(17), 4596-4602.
- Netto, A. V. G., Frem, R. C. G., Mauro, A. E., Crespi, M. S., Zorel Jr, H. E. (2007). Synthesis, spectral and thermal studies on pyrazolate-bridged palladium(II) coordination polymers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 87(3), 789-792.
- O'Loughlin, I. B., Kelly, P. M., Murray, B. A., FitzGerald, R. J., & Brodtkorb, A. (2015). Molecular Characterization of Whey Protein Hydrolysate Fractions with Ferrous Chelating and Enhanced Iron Solubility Capabilities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(10), 2708-2714.
- Prigogine, I., & Rice, S. A. (2009). *Advances in Chemical Physics* (J. W. Sons Ed. Vol. 111).
- Schagger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16-22.
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368-379.
- Sugiarto, M., Ye, A., & Singh, H. (2009). Characterisation of Binding of Iron to Sodium Caseinate and Whey Protein Isolate. *Food Chemistry*, 114(3), 1007-1013.
- Ueno, H. M., Urazono, H., & Kobayashi, T. (2014). Serum Albumin Forms a Lactoferrin-Like Soluble Iron-Binding Complex in Presence of Hydrogen Carbonate Ions. *Food Chemistry*, 145(0), 90-94.
- Wu, H., Liu, Z., Zhao, Y., & Zeng, M. (2012). Enzymatic Preparation and Characterization of Iron-Chelating Peptides from Anchovy (*Engraulis Japonicus*) Muscle Protein. *Food Research International*, 48(2), 435-441.
- Zhang, H., Frey, M., Navizaga, C., Lenzo, C., Taborda, J., Taifan, W., . . . Baltrusaitis, J. (2016). Dairy Wastewater for Production of Chelated Biodegradable Zn Micronutrient Fertilizers. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(3), 1722-1727.
- Zhang, Y., & Cremer, P. S. (2006). Interactions between Macromolecules and Ions: The Hofmeister Series. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(6), 658-663.
- Zhou, J., Wang, X., Ai, T., Cheng, X., Guo, H. Y., Teng, G. X., & Mao, X. Y. (2012). Preparation and Characterization of β -Lactoglobulin Hydrolysate-Iron Complexes. *Journal of Dairy Science*, 95(8), 4230-4236.

Artigo 2. Evaluation of *in vitro* iron bioavailability in free form and as whey peptide-iron complexes

Artigo publicado no periódico Journal of Food Composition and Analysis.

DOI: 10.1016/j.jfca.2017.03.010

Maria Elisa Caetano-Silva^a, Antonio Cilla^b, Maria Teresa Bertoldo-Pacheco^c, Flavia Maria Netto^{a,*}, Amparo Alegría^{b,*}

^a*Faculty of Food Engineering, University of Campinas, UNICAMP, Rua Monteiro Lobato, 80, 13083-862, Campinas, SP, Brazil*

^b*Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, Burjassot, Valencia, Spain*

^c*Center of Food Science and Quality, Institute of Food Technology, ITAL, Av. Brasil, 2880, 13070-178, Campinas, SP, Brazil*

*Corresponding authors. fmnetto@unicamp.br (F.M. Netto) and amparo.alegria@uv.es (A. Alegría)

ABSTRACT

Finding alternatives for food fortification in a bioavailable form of iron is needed because iron deficiency leads to several diseases. Iron solubility and *in vitro* iron absorption were evaluated in free and complexed forms, as iron salts or peptide-iron complexes. Whey peptide-iron complexes were synthesized with various ligands (whey protein hydrolysate; its fractions >5 kDa and <5 kDa, obtained by ultrafiltration/diafiltration using a 5-kDa cut-off membrane; and whey protein isolate) and iron sources (FeCl₂ and FeSO₄). Iron bioaccessibility was assessed after *in vitro* gastrointestinal digestion, whereas iron uptake was measured indirectly as ferritin synthesis in a Caco-2 cell model. Although all complexes showed high bioaccessibility (>85%), only complexes that were synthesized with low-molecular-mass peptides (<5 kDa) and FeCl₂ increased iron uptake by approximately 70% compared with FeSO₄, one of the most widely used salts for fortification. Thus, this complex is an alternative for food fortification that deserves further research.

Keywords: iron uptake; *in vitro* digestion; food fortification; Caco-2 cells; iron complexes; whey hydrolysates; food analysis; food composition.

1. Introduction

Food fortification with iron is used in regions where iron deficiency remains prevalent (Mazariegos et al., 2004) and is one of the main strategies that has been suggested by the World Health Organization (WHO) (FAO/WHO, 2007) for control of micronutrient deficiencies. Many factors contribute to iron deficiency, of which low dietary iron bioavailability is the main one. Thus, new ways for food fortification with iron have been studied to increase mineral intake by the population and to develop alternatives of more bioavailable iron sources. Further, problems that are associated with food fortification with this mineral, such as sensory changes, sediment formation, and lipid oxidation, render this practice challenging (Sugiarto et al., 2009). Thus, for food fortification with iron, it is essential to avoid sensorial changes and to ensure iron bioavailability.

However, most bioavailable compounds have greater reactivity, leading to lipid peroxidation and color changes in the foodstuff (Fairweather-Tait & Teucher, 2002). The bioavailability of iron is also limited by its insolubility at physiological pH (Puig et al., 2005) and is strongly influenced by the presence of enhancers and inhibitors in the diet (Zhu et al., 2009).

Many iron sources can be used for food fortification. Ferrous sulfate has been used widely to fortify diets, but this salt may cause some side effects, such as heartburn, abdominal pain, nausea, and diarrhea (Mimura et al., 2008). Experimental evidence also suggests that ferrous sulfate may promote the formation of hydroxyl radicals, which can start the peroxidation of lipids from biologic membranes, enzyme inactivation, and DNA damage (Schümann et al., 2007).

Iron complexation with organic compounds has been considered an alternative strategy for mitigating these problems. The complexed mineral is more stable and less prone to interactions with the chemical environment (Miquel & Farré, 2007). Peptides are considered as one of the best ligands because they have two functional groups that can participate in iron linkage (Ashmead, 2001). The iron-binding capacity of peptides, as well as the formation of complexes, is determined by the spatial distribution of functional groups of the amino acids in the peptide sequence, and their interactions are influenced by the amino acid sequence (Carlton Jr & Schug, 2011). Some researchers have focused on food fortification with complexed iron to decrease its impact on lipid oxidation (Guzun-Cojocar et al., 2011; Sugiarto et al., 2010) and increase its solubility and bioavailability (Ueno et al., 2014; Zhu et al., 2009).

The Caco-2 cell line is a useful model for evaluating iron absorption at the intestinal level (Quintaes et al., 2017). Caco-2 is a human colon carcinoma cell line that has proven to be suitable for studies of iron bioavailability in food (Zhu et al., 2009). These cells undergo

spontaneous differentiation in culture to form a polarized epithelial cell monolayer that has many characteristics of enterocytes (Glahn et al., 1996). Its advantages include rapid cellular replication and actuation that is similar to the barrier of human intestinal mucosa, predicting the conditions of passive absorption in humans (Balimane et al., 2000).

Iron interacts with several dietary compounds during digestion and forms complexes that can raise or decrease its absorption. Milk and whey proteins/peptides have been pointed out as iron bioavailability enhancers, based on their complexation with the mineral during digestion and absorption (Argyri et al., 2007; Argyri et al., 2009; Etcheverry et al., 2004; Ou et al., 2010). On the other hand, complexes can be synthesized prior to ingestion to increase iron absorption and reduce side effects. Several groups have studied the conditions of synthesis to obtain peptide/protein-iron complexes, showing evidence that these complexes have potential use for food fortification with this mineral (Caetano-Silva et al., 2015; Kim et al., 2007; Sugiarto et al., 2009; Ueno et al., 2014), but iron absorption analysis was not included in these studies.

To our knowledge, there are few results in the literature on iron bioavailability from synthesized peptide-iron complexes (Eckert et al., 2016; Wang et al., 2014), particularly with various iron sources compared with compounds that are commonly applied for food fortification. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of whey peptide-iron complexation, from different iron sources, on iron bioavailability *versus* its free form.

2. Material and methods

2.1. Reagents

The whey protein isolate (WPI) PROVON® was obtained from Glanbia Nutritionals (Kilkenny, Ireland). Pancreatin (4x USP, from porcine pancreas, EC 232-468-9, P1750), pepsin (≥ 250 units/mg solid, from porcine gastric mucosa, EC 232-629-3, P7000) and bile extract porcine (EC 232-369-0, B8631) were purchased from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). The iron salts $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) and Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA), respectively. Ferrous bisglycinate (Ferrochel®) was kindly donated by Albion Laboratories (Clearfield, Utah, USA). All other chemicals and reagents were analytical or chromatographic grade.

All glassware was washed, soaked 10 min in HNO_3 p.a. (Merck, Hohenbrunn, Germany), and rinsed 3 times with Milli-Q water (18 M Ω cm resistivity) before use to avoid mineral contamination.

2.2. Preparation of ligands: Hydrolysate and its fractions

WPI (10% protein solution w/v) was hydrolyzed by the pancreatin enzymatic system (enzyme:substrate ratio E/S 4% w/w) at pH 8.0 and 40 °C for 180 min (Caetano-Silva et al., 2015). A pH Stat Automatic Titrator (model DL 21 Grafix; Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Switzerland), with stirring and controlled temperature, was used to obtain the hydrolysate. After 180 min of reaction time, the enzyme was deactivated (85 °C/15 min), and the degree of hydrolysis (DH) of the hydrolysate, determined according to Adler-Nissen (1986), was 16.2%. The reaction mixture was adjusted to pH 6.0 with 1 mol/L HCl, diluted to 5% w/v protein and ultrafiltered (Ultrafiltration System Pellicon®, Millipore, Bedford, MA, USA) on an ultrafiltration membrane with an MWCO of 5 kDa (Cartridge Prep/Scale: TFF 6 ft²). Six diafiltration cycles were done, with addition of water at constant volume. The filtrate fraction (**F**), with MM < 5 kDa; retentate (**R**), with MM > 5 kDa; and non-ultrafiltered hydrolysate (**H**) were used as ligands. **WPI** was also used as a ligand to obtain protein-iron complexes and compare its behavior with peptide-iron complexes.

2.3. Synthesis of whey peptide-iron complexes

Whey peptide-iron complexes were synthesized using the same conditions as reported (Caetano-Silva et al., 2015). Briefly, dispersions of the ligands (**WPI**, **H**, **F**, and **R**) with 4% (w/v) protein were adjusted to pH 7.0, and $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ or $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ was then added to reach an iron concentration of 0.1% (w/v). The pH of the mixture was readjusted to 7.0 every 15 min for 60 min with stirring at 25 ± 2 °C. The solutions were then centrifuged (5000g/20 min) and passed through a common filter paper. The supernatants that contained the complexes were analyzed for iron content and freeze-dried.

2.4. Determination of iron

The iron content of supernatants from the synthesis reaction and freeze-dried complexes was determined by atomic absorption spectrophotometry (AAS) according to Cilla et al. (2008) on an Agilent Technologies 200 Series AA spectrometer (Santa Clara, CA, USA),

equipped with a deuterium lamp background corrector. Before the iron was measured, the organic matter was destroyed by ashing at 450 °C (model K1253A; Heraeus Instruments, Hanau, Germany), dissolved in concentrated HCl, and transferred quantitatively to volumetric flasks. The volumes were increased to 50 mL with ultrapure water.

Iron content was measured using a hollow cathode lamp for iron (248.3 nm), with air flame (2.5 L/h) acetylene (10 L/h), at approximately 2000 °C, using a standard curve ranging from 0.12 to 5.0 mg Fe/L. Iron standard solutions were freshly prepared by diluting a standard solution (1000 mg/l FeCl₃ in 15% HCl; Titrisol, Merck, Barcelona, Spain) with ultrapure water. Reference material (skim milk powder CRM 063) was analyzed to check the accuracy, and the certified and experimental values were 2.06 ± 0.25 and 2.02 ± 0.28 mg Fe/g, respectively. The coefficient of variation with regard to the precision was 4.76%. All experiments were carried out in triplicate.

2.5. Evaluation of iron solubility and *in vitro* absorption in free and complexed forms

The following analyses were carried out with iron in free form, as ferrous sulfate or ferrous chloride, and in complexed form, as peptide-iron complexes or ferrous bisglycinate (**Bis-Fe**). The complexes with **H**, **F**, **R**, and **WPI** were termed **H-Fe**, **F-Fe**, **R-Fe**, and **WPI-Fe**, respectively. The iron source was expressed with the letters **C** and **S** for FeCl₂ and FeSO₄, respectively.

2.5.1. Iron solubility at different pH levels

The freeze-dried complexes were dispersed in Milli-Q water (2 mg/mL), and the pH was adjusted with 0.1 mol/L NaOH or HCl to 2.0, 4.0, 6.0, or 8.0. The dispersions were kept at room temperature (25 ± 2 °C) with stirring (500 rpm) for 60 min and centrifuged (3200g/60 min, 4 °C). The centrifugation force was the same as in bioaccessibility assessment (see item 2.5.2 below), to compare the chemical and physiological solubility of iron. The iron content in the supernatants was determined by AAS, as previously described. The same procedure was carried out with 1 mM FeCl₂ or FeSO₄ solution to evaluate the iron solubility under the same conditions.

The protein content of the complexed samples was determined by Lowry et al. (1951).

2.5.2. *In vitro* gastrointestinal digestion and iron bioaccessibility

Dispersions of pepsin and pancreatin with bile extract were demineralized with resin (Chelex-100, Sigma Chemical Co.) to remove iron according to Glahn et al. (1998), with modifications as described by Perales et al. (2005). *In vitro* gastrointestinal digestion was carried out as described by Cilla et al. (2008). Briefly, an amount of each sample, enough for 2.4 mg Fe, was diluted in 80 mL of cell culture-grade water (Aqua B Braun, Braun Medical, Barcelona, Spain), adjusted to pH 2.0 with 6 mol/L HCl, and allowed to stabilize for 15 min, with readjustments to the pH if necessary. An aliquot of freshly prepared demineralized pepsin solution was added to the samples (0.02 g pepsin/sample), and the volume was increased to 100 mL and incubated at 37 °C for 2 h with stirring. Pepsin digestion was interrupted by keeping the gastric digests in an ice bath for 10 min, and the pH was adjusted to 6.5 with 1 mol/L NaHCO₃.

The intestinal digestion step was carried out after the addition of freshly prepared demineralized pancreatin/bile extract solution (0.005 g pancreatin and 0.03 g bile extract/sample) for 2 h at 37 °C with stirring. The digests were then placed in an ice bath for 10 min to interrupt the digestion, and the pH was adjusted to 7.2 by dropwise addition of 0.5 mol/L NaOH. The bioaccessible fraction was obtained by centrifugation (3200g/60 min, 4 °C). Total and soluble iron content was determined by AAS. Iron bioaccessibility was calculated as the amount of soluble iron relative to the total amount, according to Equation 1:

$$\% \text{ Iron bioaccessibility} = \frac{\text{Fe soluble (bioaccessible fraction)}}{\text{Fe total (initial)}} \times 100$$

After digestion, all samples were stored frozen until further analysis.

2.5.3. Iron bioavailability

2.5.3.1. Cell culture

The Caco-2 cells assays were carried out according to García-Nebot et al. (2010). Caco-2 cells were obtained from American Type Culture Collection (HTB-38, Rockville, MD, USA), and all assays were performed between passages 35 and 45. The cells were cultured and maintained under low iron conditions according to Viadel et al. (2007). To avoid

interference from iron sources other than the samples, fetal bovine serum (FBS) was depleted of iron as follows: The pH of FBS was adjusted to 4.5 in the presence of 300 g/l Chelex and stirred for 2 h, and the pH was readjusted then to 7.2. FBS was incubated at room temperature overnight, passed through a common filter paper, and sterilized through a 0.22- μ m filter.

Cells were maintained in medium that was depleted of iron (DMEM FeF), in an incubator at 37 °C in a 5% CO₂/95% air atmosphere at constant humidity in 75 cm² flasks. DMEM FeF consisted of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 1 g/L glucose (Gibco BRL Life Technologies, Scotland) and supplemented with 10% (v/v) FBS that was depleted of iron, 1% (v/v) non-essential amino acids (Gibco), 1% (v/v) HEPES, 1% (v/v) antibiotic solution (penicillin–streptomycin) (Biowhittaker), and 0.1% (v/v) Fungizone at pH 7.2–7.4. The culture medium was changed every 2 days.

After reaching confluence, the cells were detached with trypsin-EDTA solution and seeded at a density of 50,000 cells/cm² in 6-well plates and maintained in DMEM FeF. The iron uptake assays were carried out 10 days post-seeding, with differentiated cells previously characterized by the transepithelial electrical resistance values (>500 Ω cm⁻²). Prior to the iron bioavailability assays, the bioaccessible fractions were supplemented with 50 mM NaCl and diluted 1:1 (v/v) with DMEM FeF to adjust the osmolality to a physiological value (290–300 mOsm/Kg) (Ekmekcioglu, 2002), using a freezing-point osmometer (Osmomat 030, Berlin, Germany). Each experiment was conducted with four replicates.

2.5.3.2. Cell viability test

The cell viability test was carried out by MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,3-diphenyl tetrazolium bromide) assay, according to Cilla et al. (2008). The MTT assay was conducted after exposing Caco-2 cells to bioaccessible fractions with adjusted osmolality. MTT was added to a final concentration of 0.5 mg/mL in PBS, and the plates were incubated at 37 °C for 2 h. After the MTT solution was removed, insoluble formazan was dissolved in 2-propanol acid, and the optical density was measured at 570 nm, with background subtraction at 690 nm (Perkin Elmer Lambda 2 UV/Vis, Spectrometer, Waltham, MA, USA). The percentage of cell viability was calculated using untreated cells as a positive control (100% cell viability). All experiments were carried out with four replicates.

2.5.3.3. Ferritin assay

Immediately before the addition of the bioaccessible fraction, the cell growth medium was removed from each well, and the cell monolayer was washed with PBS at 37 °C. An aliquot (2 mL) of the bioaccessible fraction, with adjusted osmolality, or DMEM FeF (blank) was added to the cell monolayer. The cells were incubated at 37 °C for 2 h in 5% CO₂ and 95% relative humidity. The samples then were replaced with DMEM FeF and returned to the incubator for an additional 22 h.

Ferritin and total protein were determined according to García-Nebot et al. (2010). Cell monolayers were washed with PBS and detached with trypsin–EDTA solution. Subsequently, the cells were collected with 2 mL of cell-culture-grade water and homogenized at 17,000 rpm for 1 min at 4 °C (Polytron PT 2000, Kinematica AG). Aliquots of the cell suspensions were used to measure ferritin (Spectro Ferritin kit, Catalogue number S-22, Ramco Laboratories Inc., Stafford, TX, USA). The cell protein content was determined according to Lowry et al. (1951). The ferritin/protein ratio (ng ferritin/mg protein) was used as an index of iron uptake. Control cells (blank) were used throughout the experiments.

2.6. Statistical analysis

The analyses were carried out at least in triplicate unless otherwise indicated. The mean and relative standard deviation were calculated. The RSD was represented as (standard deviation/mean) × 100. The statistical analysis of the results was carried out using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) by one-way analysis of variance (ANOVA). For statistical differences between samples ($F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$), the means were compared by *post hoc* Tukey's test; $p < 0.05$ was considered significant (Granato et al., 2014).

3. Results

3.1. Synthesis of whey peptide-iron complexes

Iron showed high solubility (>85%) after the synthesis reaction with all ligands, whereas in the control assays with both salts at the same pH, iron remained insoluble. Iron in aqueous medium in the presence of oxygen forms insoluble ferric oxide, generating an inaccessible iron form (Frazer & Anderson, 2014). In contrast, synthesis reaction increased the iron solubility, although it was not possible to confirm whether the iron was in its ferrous or

ferric form during synthesis, because oxygen interferes with the oxidation state of the iron. The increased iron solubility suggests that all ligands, regardless of MM profile, have iron-binding capacity, hindering iron precipitation. The iron content of freeze-dried complexes with whey protein/peptides ranged from 16.7–20.3 µg/mg of sample (RSD < 4.2%), whereas **Bis-Fe** had an iron content of 190.8 µg/mg of sample (RSD 0.9%).

3.2. Iron solubility at different pH levels

The solubility of iron compounds is an important property that helps us understand their behavior in various food matrices and under physiological conditions. Iron solubility in free and complexed forms changed as a function of pH (Figure 1). Both iron salts showed high solubility at pH 2.0 and 4.0 (77.9–99.4%) and low solubility at pH 6.0 and 8.0 (0.9–5.9%), whereas the iron solubility of complexes exceeded 90% at pH 2.0, 6.0, and 8.0, decreasing at pH 4.0, especially complexes with **R**. Complexes with **WPI**, however, showed lower iron solubility at pH 6.0 and high solubility at pH 4.0. The low solubility at pH 6.0 can possibly be attributed to a change in the isoelectric point (pI) of **WPI**, which is approximately 4.8 (Demetriades et al., 1997), as a result of iron complexation, which occurs primarily through coordinated bonds with residues of acidic amino acids (Storcksdieck et al., 2007).

The decrease in iron solubility paralleled the protein/peptide solubility, as evidenced for **R-Fe** at pH 4.0 and **WPI-Fe** at pH 6.0 (Figure 1, B₁ and B₂). Peptide–peptide and protein–protein interactions might improve as a result of a change in the pH, leading to precipitation, including that of the complexed iron.

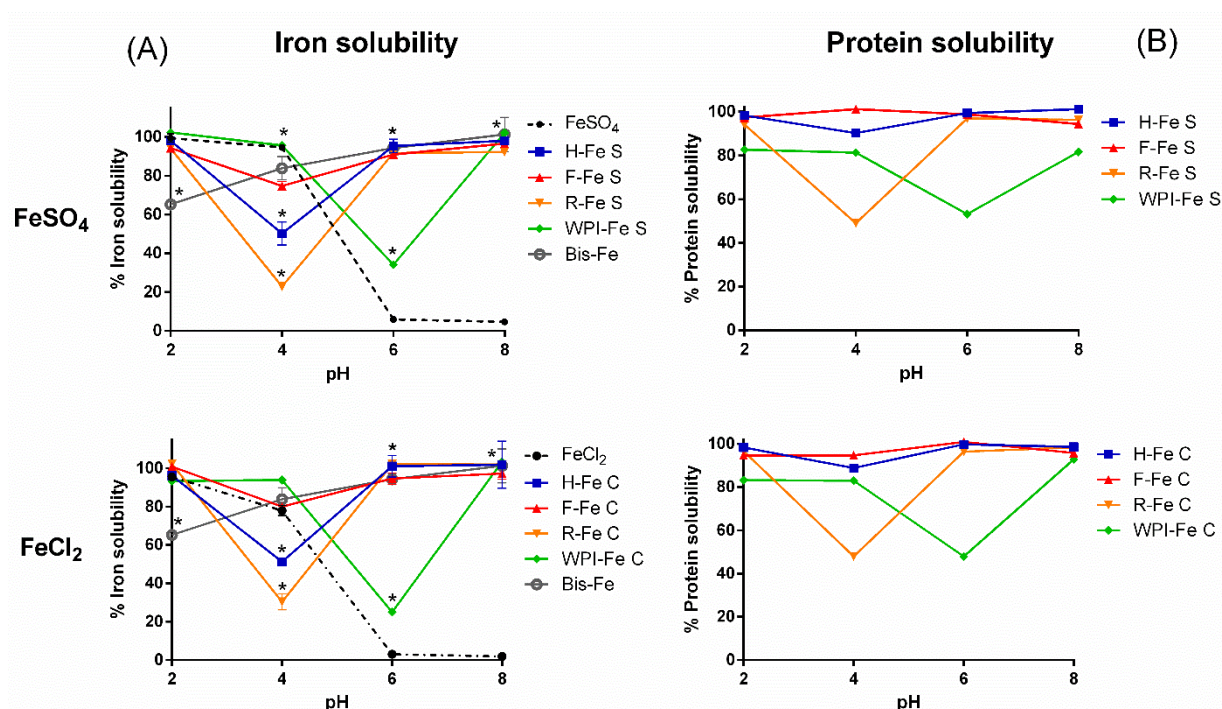


Figure 1. (A) Iron solubility in free form (FeCl₂ or FeSO₄) and complexed with hydrolysate (**H-Fe**), filtrate (**F-Fe**), retentate (**R-Fe**) or WPI (**WPI-Fe**) as a function of pH; S: Complexes with FeSO₄; C: Complexes with FeCl₂; **Bis-Fe**: ferrous bisglycinate. (B) Protein solubility in peptide-iron complexes as a function of pH. *Samples statistically different ($p < 0.05$) from control assay (FeSO₄ or FeCl₂) by Tukey's test.

3.3. Iron bioaccessibility

In the context of this study, iron bioaccessibility was assumed to be iron solubility after *in vitro* gastrointestinal digestion. The bioaccessibility of iron salts (Figure 2) was higher than the iron solubility in water at pH 6.0–8.0 with no addition of digestive fluids (Figure 1 A₁–A₂). This finding might be attributed to the binding ability of simulated gastrointestinal fluids, possibly due to the interactions between iron and the available functional groups on gastrointestinal enzymes (Caetano-Silva et al., 2015; O'Loughlin et al., 2015). In addition, porcine bile extract has strong ferrous-chelating ability (O'Loughlin et al., 2015), which might also have increased iron solubility. The bioaccessibility of complexed iron ranged from 85% to 100%, whereas that of free iron was 49.1% and 63.1% for FeSO₄ and FeCl₂, respectively (Figure 2). The iron bioaccessibility of complexes was not influenced by the iron source ($p > 0.05$). **Bis-Fe** showed lower bioaccessibility than the synthesized complexes (60.7%).

All bioaccessible fractions were thawed and homogenized before the cell assays. Bioaccessible fractions of iron salts, however, showed iron precipitation after thawing. The iron content in the thawed supernatant was 2.6-fold and 6.9-fold lower than the total iron content,

which was measured just after the bioaccessibility assay, for FeSO_4 and FeCl_2 , respectively (data not shown), highlighting the low stability of iron at neutral pH and the potential formation of hydroxides.

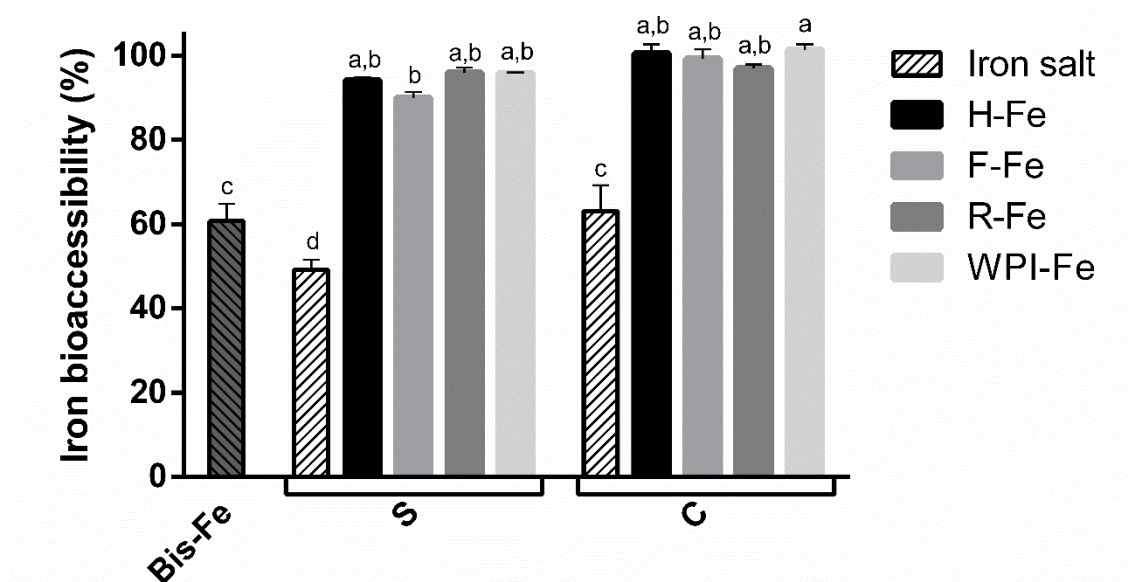


Figure 2. Iron bioaccessibility (%)* in free and complexed forms. *Soluble iron after *in vitro* gastrointestinal digestion and centrifugation (3200g/60 min, 4 °C). **H-Fe**: complex with hydrolysate; **F-Fe**: complex with filtrate (fraction < 5 kDa); **R-Fe**: complex with retentate (fraction > 5 kDa); **WPI-Fe**: complex with WPI; **S**: FeSO_4 ; **C**: FeCl_2 ; **Bis-Fe**: ferrous bisglycinate. All samples were compared by Tukey's test and different lowercase letters (a-d) are statistically different ($p < 0.05$). Results are shown as mean $\pm$ standard deviation.

3.4. Cell viability by MTT assay

All samples were tested regarding their ability to interfere with cell viability after adjustments to the osmolality (290–300 mmol/kg). In the MTT assay, the cell viability was greater than 87% for all samples compared with the DMEM-only control assay. This result indicates that complexes and iron salts did not compromise cell growth. Therefore, the same conditions — bioaccessible fraction diluted 1:1 with DMEM FeF and addition of NaCl — were used for the bioavailability assays with Caco-2 cells.

3.5. Iron bioavailability

Figure 3 shows the ferritin synthesis by Caco-2 cells, an indirect measurement of iron bioavailability (ng ferritin/mg cell protein), for all complexes, free iron, and **Bis-Fe**.

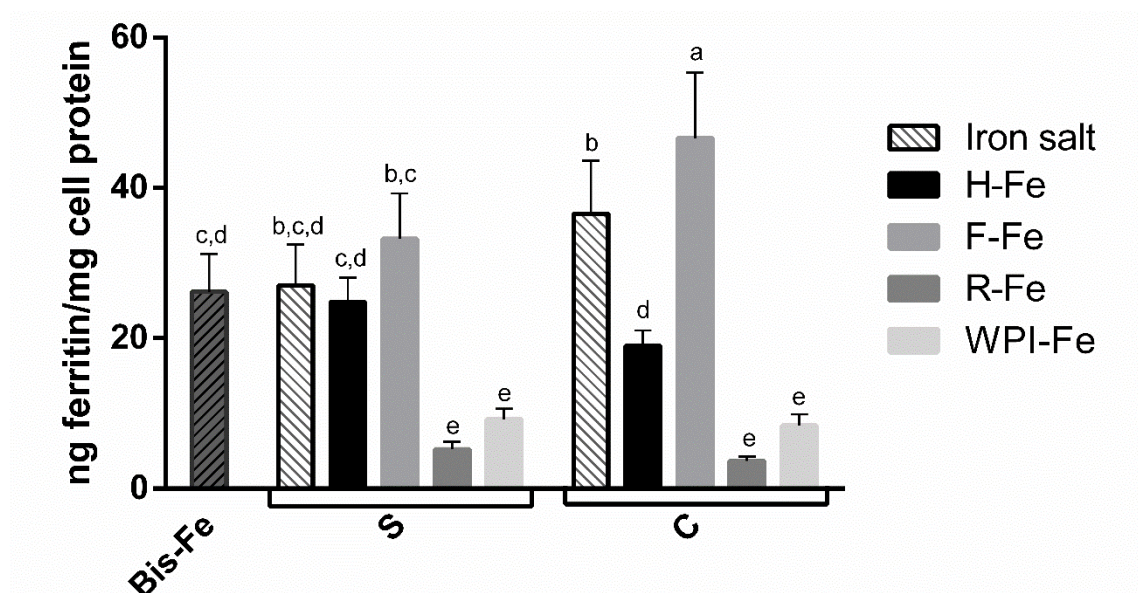


Figure 3. Iron bioavailability (ng ferritin/mg cell protein) in free and complexed forms. **H-Fe**: complex with hydrolysate; **F-Fe**: complex with filtrate (fraction < 5 kDa); **R-Fe**: complex with retentate (fraction > 5 kDa); **WPI-Fe**: complex with WPI; **S**: FeSO₄; **C**: FeCl₂; **Bis-Fe**: ferrous bisglycinate. All samples were compared by Tukey-s test and different lowercase letters (a-e) are statistically different ($p < 0.05$). Results are shown as mean $\pm$ standard deviation.

The **F-Fe C** complex yielded ferritin synthesis rates that were 2.4-, 5.6-, and 12.7-fold higher *versus* the **H-Fe C**, **WPI-Fe C**, and **R-Fe C** complexes, respectively, whereas the **F-Fe S** complex yielded ferritin synthesis rates that were 1.3-, 3.6-, and 6.3-fold higher compared with the **H-Fe S**, **WPI-Fe S**, and **R-Fe S** complexes. No difference ($p > 0.05$) was observed between complexes with the same ligand changing the iron source, except for **F** in complex with FeCl₂, which led to greater ferritin synthesis than when complexed with FeSO₄. Complexes with high MM peptides (**R**) and intact protein (**WPI**) elicited lower ferritin synthesis rates than their respective salts, whereas ferritin synthesis was similar between **Bis-Fe** and ferrous sulfate. The **F-Fe C** complex seems to be of interest, once iron uptake from this complex increased 27.5% compared with its respective salt (FeCl₂) and 72.7–78.2% *versus* FeSO₄ and **Bis-Fe**, both of which are commonly applied in food fortification.

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the iron bioavailability of peptide-iron complexes obtained with different iron sources, compared with compounds that are frequently used for iron fortification, such as ferrous sulfate and ferrous bisglycinate. Several ligands and iron sources were used to synthesize peptide-iron complexes, and the *in vitro* iron bioaccessibility and bioavailability from these complexes and from iron salts were assessed.

Bioaccessibility can be defined as the mineral that is released from the matrix during gastrointestinal digestion and becomes available for absorption in the intestine (de Lima et al., 2014). On the other hand, bioavailability is the proportion of ingested mineral that is available for use in metabolic processes or for deposition in storage compounds (Argyri et al., 2011) — namely, the mineral that is absorbed. Ferritin synthesis was used to assess iron uptake as an indirect measure of iron bioavailability. In the past several years, this measurement has been used widely (Cilla et al., 2008; Eckert et al., 2016; García-Nebot et al., 2010; Viadel et al., 2007; Wang et al., 2014; Zhu et al., 2009) because iron can be stored as ferritin, and greater iron absorption increases ferritin synthesis in Caco-2 cells (Glahn et al., 1998).

Although the bioaccessibility of iron is a precondition for its availability for absorption (Cilla et al., 2008; Salovaara et al., 2002), our results show that it does not necessarily predict bioavailability. The iron bioaccessibility of all complexes was high, with no difference among ligands, whereas bioavailability differed among them. Iron that was complexed with **F** exhibited the highest bioavailability compared with the other ligands. The complexes with **R** and **WPI** (high MM profiles) showed lower bioavailability than the respective salts, suggesting that complexes with these ligands hinder iron release and absorption. Complexes with **H** had intermediate values of bioavailability, due to the presence of high- and low-MM peptides as ligands.

The mechanism by which complexed iron enters the enterocyte is still unknown, for which two possible mechanisms have been considered. Complexed iron may be transported while remaining coordinated across the brush border membrane through the normal ligand pathway for release inside the cell. For instance, heme iron is transported by a specific binding protein and is then broken down by heme oxygenase 1 (Frazer & Anderson, 2014). Conversely, if complexed iron is released from the complexes prior to entering the enterocyte, it might be taken up by DMT-1 (divalent metal transporter-1), a membrane protein that is involved in iron transport across intestinal cells (Frazer & Anderson, 2014; Zhu et al.,

2009). In the latter pathway, effective uptake will depend on the forces of interaction in the complex formation and the ability of the ligand to release the mineral near the enterocyte to allow iron uptake by that transporter. Some complexes can be strong enough to keep iron from being donated to enterocytes, consequently impeding absorption (Salovaara et al., 2002), which appears to be true for the **R** and **WPI** complexes, which are composed of peptides with MM > 5 kDa and intact proteins, respectively.

The ligands **H**, **R**, and **F** contain iron-binding peptides with similar sequences, which were identified in a previous work (Caetano-Silva et al., 2015). These peptides, especially the sequences ⁴²YVEELKPTPEGDLEIL⁵⁷ and ¹²⁴RTPEVDDEALEK¹³⁵ in β -Lg and ⁸²DDDLTDDI⁸⁹ in α -La, are rich in Asp (D) and Glu (E) residues, the main iron-binding sites (Caetano-Silva et al., 2015). Despite this similarity, only the complex with **F** and FeCl₂ might have favored iron entry into enterocytes, increasing ferritin synthesis. Thus, we hypothesize that iron enters intestinal cells while remaining coordinated with low-MM peptides through a normal intestinal absorption route for peptides, such as carrier-mediated absorption by peptide transporter (PepT1) for di- and tripeptides, transcytosis (intracellular vesicle-mediated transport system) for oligopeptides, and paracellular passive diffusion for oligo and di-/tripeptides (Wada & Lönnerdal, 2014).

Concerning the ligand **F**, the iron source appears to interfere with how iron is absorbed. This finding can be explained in part by the presence of the iron salt counterions — chloride or sulfate — which can differentially affect peptide–peptide interactions and the structures of complexes. During *in vitro* gastrointestinal digestion, the enzymatic activity might differ for each complex, depending on the exposure of the cleavage sites. Thus, the compounds that reach the enterocyte might differ in structure and molecular size, leading to different iron uptake.

Many compounds are used for food fortification with iron, but ferrous sulfate has been one of the most commonly applied agents for controlling anemia, and it is considered a reference (Quintaes et al., 2017). Hence, in comparing the bioavailability of all samples with that of FeSO₄ (Figure 3), **F-Fe C** is a potential alternative for food fortification because its bioavailability was approximately 70% higher than that of this reference salt. **Bis-Fe**, which has been proposed for iron fortification in recent years, had bioavailability similar to ferrous sulfate, which is consistent with other authors (Fox et al., 1998; Wortley et al., 2005; Yeung et al., 2002).

In this study, the iron uptake from iron salts and complexes was determined in the absence of a food matrix. However, the food matrix has an important role in iron absorption

and can influence bioavailability in many ways. Bovell-Benjamin et al. (2000) reported that the absorption of iron from FeSO_4 was 19-fold greater than from a food matrix (whole maize meal), whereas the absorption of ferrous bisglycinate decreased by roughly 30% in the presence of the same matrix. The authors observed that ferrous bisglycinate was absorbed better than free iron in the presence of dietary inhibitors, possibly due to the protective effects of glycine, which chelates and protects iron from inhibitors (Ma et al., 2013). Further studies are needed to demonstrate how a food matrix can interact with the complexes that were synthesized in this study.

In addition to the physiological implications, iron solubility is an important property of a food ingredient because it can facilitate the incorporation of iron compounds in specific foodstuffs. Technologically, **F** complexes can be applied, especially **F-Fe C**, because they showed high iron solubility in a wide range of pH levels (Figure 1), making it easier to be incorporated in various products. The expected reduction in the pro-oxidant effects of iron due to complexation might minimize the undesirable changes in the products to which these complexes are added.

5. Conclusions

Whey peptide-iron complexes that are synthesized from low-MM peptides and FeCl_2 are a promising alternative to fortify food with iron instead of one of the most commonly applied salts, ferrous sulfate. Such complexes can be applied to several products and protect iron during gastrointestinal digestion, due to their high solubility over a wide range of pH and their greater bioaccessibility and bioavailability *versus* iron salts. The source of iron for synthesizing peptide-iron complexes might influence its bioavailability, requiring careful consideration. We are characterizing these complexes to understand the differences between iron sources better. Future studies on peptide-iron complexes in food products should demonstrate the impact of a food matrix on the bioavailability of iron from free and complexed iron and guide their application.

Acknowledgments

The authors thank the Bionutest Group of Nutrition and Food Science Area (Faculty of Pharmacy, University of Valencia) for support with the iron bioavailability analysis. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [grant number 2015/02254-5; 2013/10356-7].

References

- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, New York.
- Argyri, K., Miller, D.D., Glahn, R.P., Zhu, L., Kapsokafalou, M. (2007). Peptides isolated from in vitro digests of milk enhance iron uptake by Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(25), 10221-10225.
- Argyri, K., Tako, E., Miller, D.D., Glahn, R.P., Komaitis, M., Kapsokafalou, M. (2009). Milk peptides increase iron dialyzability in water but do not affect DMT-1 expression in Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(4), 1538-1543.
- Argyri, K., Theophanidi, E., Kapna, A., Staikidou, C., Pounis, G., Komaitis, M., Georgiou, C., Kapsokafalou, M. (2011). Iron or zinc dialyzability obtained from a modified in vitro digestion procedure compare well with iron or zinc absorption from meals. *Food Chemistry* 127(2), 716-721.
- Ashmead, S.D. (2001). The chemistry of ferrous bis-glycinate chelate. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 51(1 Suppl 1), 7-12.
- Balimane, P.V., Chong, S., Morrison, R.A. (2000). Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 44(1), 301-312.
- Bovell-Benjamin, A.C., Viteri, F.E., Allen, L.H. (2000). Iron absorption from ferrous bisglycinate and ferric trisglycinate in whole maize is regulated by iron status. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71(6), 1563-1569.
- Caetano-Silva, M.E., Bertoldo-Pacheco, M.T., Paes-Leme, A.F., Netto, F.M. (2015). Iron-binding peptides from whey protein hydrolysates: Evaluation, isolation and sequencing by LC-MS/MS. *Food Research International* 71, 132-139.
- Carlton Jr, D.D., Schug, K.A. (2011). A review on the interrogation of peptide-metal interactions using electrospray ionization-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 686(1-2), 19-39.
- Cilla, A., Perales, S., Lagarda, M.J., Barbera, R., Farre, R. (2008). Iron bioavailability in fortified fruit beverages using ferritin synthesis by Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(18), 8699-8703.
- de Lima, A.C.S., Soares, D.J., da Silva, L.M.R., de Figueiredo, R.W., de Sousa, P.H.M., de Abreu Menezes, E. (2014). In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry* 161(0), 142-147.
- Demetriades, K., Coupland, J.N., McClements, D.J. (1997). Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. *Journal of Food Science* 62(2), 342-347.

- Eckert, E., Lu, L., Unsworth, L.D., Chen, L., Xie, J., Xu, R. (2016). Biophysical and in vitro absorption studies of iron chelating peptide from barley proteins. *Journal of Functional Foods* 25, 291-301.
- Ekmekcioglu, C. (2002). A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chemistry* 76(2), 225-230.
- Etcheverry, P., Miller, D.D., Glahn, R.P. (2004). A low-molecular-weight factor in human milk whey promotes iron uptake by Caco-2 cells. *Journal of Nutrition* 134(1), 93-98.
- Fairweather-Tait, S.J., Teucher, B. (2002). Iron and calcium bioavailability of fortified foods and dietary supplements. *Nutrition Reviews* 60(11), 360-367.
- FAO/WHO (2007). Assessing the iron status of populations, in: World Health Organization, Centers for Disease Control and Prevention (Ed.), 2nd ed. Food and Agriculture Organization / World Health Organization, Geneva, Switzerland, p. 108.
- Fox, T.E., Eagles, J., Fairweather-Tait, S.J. (1998). Bioavailability of iron glycine as a fortificant in infant foods. *The American Journal of Clinical Nutrition* 67(4), 664-668.
- Frazer, D.M., Anderson, G.J. (2014). The regulation of iron transport. *BioFactors* 40(2), 206-214.
- García-Nebot, M.J., Cilla, A., Alegría, A., Barberá, R., Lagarda, M.J., Clemente, G. (2010). Effect of caseinophosphopeptides added to fruit beverages upon ferritin synthesis in Caco-2 cells. *Food Chemistry* 122(1), 92-97.
- Glahn, R.P., Lee, O.A., Yeung, A., Goldman, M.I., Miller, D.D. (1998). Caco-2 cell ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Journal of Nutrition* 128(9), 1555-1561.
- 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. *Journal of Nutrition* 126(1), 332-339.
- Granato, D., de Araújo Calado, V.M., Jarvis, B. (2014). Observations on the use of statistical methods in food science and technology. *Food Research International* 55, 137-149.
- Guzun-Cojocar, T., Koev, C., Yordanov, M., Karbowiak, T., Cases, E., Cayot, P. (2011). Oxidative stability of oil-in-water emulsions containing iron chelates: Transfer of iron from chelates to milk proteins at interface. *Food Chemistry* 125(2), 326-333.
- Kim, S.B., Seo, I.S., Khan, M.A., Ki, K.S., Nam, M.S., Kim, H.S. (2007). Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal* 17(6), 625-631.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1), 265-275.
- Ma, W., Wu, J., Zhuo, Z., Sun, H., Yue, M., Feng, J. (2013). Comparison of absorption characteristics of iron glycine chelate and ferrous sulfate in Caco-2 cells. *International Journal of Agriculture and Biology* 15(2), 372-376.

- Mazariegos, D.I., Pizarro, F., Olivares, M., Nuñez, M.T., Arredondo, M. (2004). The mechanisms for regulating absorption of Fe bis-glycine chelate and Fe-ascorbate in Caco-2 cells are similar. *Journal of Nutrition* 134(2), 395-398.
- Mimura, É.C.M., Breganó, J.W., Dichi, J.B., Gregório, 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.
- Miquel, E., Farré, R. (2007). Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability. *Trends in Food Science & Technology* 18(3), 139-143.
- O'Loughlin, I.B., Kelly, P.M., Murray, B.A., FitzGerald, R.J., Brodtkorb, A. (2015). Molecular characterization of whey protein hydrolysate fractions with ferrous chelating and enhanced iron solubility capabilities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(10), 2708-2714.
- Ou, K., Liu, Y., Zhang, L., Yang, X., Huang, Z., Nout, M.J.R., Liang, J. (2010). Effect of neutrase, alcalase, and papain hydrolysis of whey protein concentrates on iron uptake by Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(8), 4894-4900.
- Perales, S., Barberá, R., Lagarda, M.J., Farré, R. (2005). Bioavailability of calcium from milk-based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dialyzability, and uptake and transport by Caco-2 cells). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(9), 3721-3726.
- Puig, S., Askeland, E., Thiele, D.J. (2005). Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mrna degradation. *Cell* 120(1), 99-110.
- Quintaes, K.D., Barberá, R., Cilla, A. (2017). Iron bioavailability in iron fortified cereal foods: The contribution of in vitro studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57 (10), 2028-2041.
- Salovaara, S., Sandberg, A.-S., Andlid, T. (2002). Organic acids influence iron uptake in the human epithelial cell line Caco-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(21), 6233-6238.
- Schümann, 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* 21(3), 147-168.
- Storcksdieck, S., Bonsmann, G., Hurrell, R.F. (2007). Iron-binding properties, amino acid composition, and structure of muscle tissue peptides from in vitro digestion of different meat sources. *Journal of Food Science* 72(1), S019-S029.
- Sugiarto, M., Ye, A., Singh, H. (2009). Characterisation of binding of iron to sodium caseinate and whey protein isolate. *Food Chemistry* 114(3), 1007-1013.
- Sugiarto, M., Ye, A., Taylor, M.W., Singh, H. (2010). Milk protein-iron complexes: Inhibition of lipid oxidation in an emulsion. *Dairy Science Technology* 90(1), 87-98.
- Ueno, H.M., Urazono, H., Kobayashi, T. (2014). Serum albumin forms a lactoferrin-like soluble iron-binding complex in presence of hydrogen carbonate ions. *Food Chemistry* 145(0), 90-94.

- Viadel, B., Perales, S., Barberá, R., Lagarda, M.J., Farré, R. (2007). Ferritin synthesis by Caco-2 cells as an indicator of iron bioavailability: Application to milk-based infant formulas. *Food Chemistry* 102(3), 925-931.
- Wada, Y., Lönnerdal, B. (2014). Bioactive peptides derived from human milk proteins — mechanisms of action. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25(5), 503-514.
- Wang, X., Ai, T., Meng, X.L., Zhou, J., Mao, X.Y. (2014). In vitro iron absorption of α -lactalbumin hydrolysate-iron and β -lactoglobulin hydrolysate-iron complexes. *Journal of Dairy Science* 97(5), 2559-2566.
- Wortley, G., Leusner, S., Good, C., Gugger, E., Glahn, R. (2005). Iron availability of a fortified processed wheat cereal: A comparison of fourteen iron forms using an in vitro digestion/human colonic adenocarcinoma (Caco-2) cell model. *British Journal of Nutrition* 93(1), 65-71.
- Yeung, A.C., Glahn, R.P., Miller, D.D. (2002). Comparison of the availability of various iron fortificants in bread and milk using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture method. *Journal of Food Science* 67(6), 2357-2361.
- 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.

Artigo 3. The effect of peptide-iron complexation in decreasing the lipid oxidation catalyzed by iron

Artigo a ser submetido ao periódico International Journal of Food Science & Technology.

Maria Elisa Caetano-Silva^a, Lilian Regina Barros Mariutti^a, Neura Bragagnolo^a, Maria Teresa Bertoldo-Pacheco^b, Flavia Maria Netto^a

^a*Department of Food and Nutrition, Faculty of Food Engineering, University of Campinas, UNICAMP, 13083-862 Campinas, SP, Brazil.*

^b*Center of Food Science and Quality, Institute of Food Technology, ITAL, 13070-178 Campinas, SP, Brazil.*

ABSTRACT

Food fortification with iron may lead to lipid oxidation both in food matrices and human body. Iron in the form of salts (FeSO_4 or FeCl_2) or complexes (peptide-iron complexes or ferrous bisglycinate) were added to oil-in-water (O/W) emulsions and the extent of lipid oxidation was evaluated during 7 days, measured as primary (peroxide value) and secondary products (TBARS and volatile compounds from lipid oxidation by gas chromatography coupled with mass spectrometry – GC-MS). Both salts catalyzed lipid oxidation, leading to peroxide value up to 70.6-89.8 meqv/kg, 2.6- to 4.6-fold higher than the peptide-iron complexes. The volatile compounds, especially the main compound hexanal, were dramatically decreased in emulsions containing complexes comparing to the ones with iron salts. The two different iron salts led to varying levels of lipid oxidation, although the oxidation pathway was the same. The addition of peptide-iron complexes to the emulsions resulted in much lower lipid oxidation than the iron free form, possibly due to the antioxidant activity of the peptides and their capacity to keep iron away from the lipid phase since it is coordinated and takes part of a stable structure. The peptide-iron complexes showed potential to reduce the undesirable sensory changes in food products, and decrease the side effects related to free iron and the lipid damage of cell membranes in the organism, due to the lower reactivity of iron in the complexed form.

Keywords: Food fortification, gas chromatography, GC-MS, iron complexes, volatile lipid oxidation products (VLOPs), whey protein hydrolysate.

1. Introduction

Food fortification with iron is a strategy employed in many countries to decrease the anemia prevalence, one of the main nutritional problems in the world (WHO, 2015). For this practice to be effective, it is necessary to avoid sensory changes and assure iron bioavailability. Nevertheless, the most bioavailable forms of iron are generally more reactive (Habeych et al., 2016), thus, food fortification with this mineral may result in changes in physical and sensory properties of foods (Guo et al., 2014). Among the compounds that can be used for this purpose, ferrous sulfate has been the most applied, despite the side effects related to its use, such as heartburn, abdominal pain, nausea and diarrhea (Mimura et al., 2008). The use of this salt is also related to the formation of hydroxyl radicals, which can start the peroxidation of lipids of biological membranes, enzyme inactivation and DNA damage (Shiota et al., 2006; Schümann et al., 2007).

In iron fortified food products, lipid oxidation has a crucial role in the quality and shelf life due to the deleterious effects on polyunsaturated fatty acids and other oxidizable substrates (Coupland & McClements, 1996; Kamal-Eldin & Yanishlieva, 2005). The production of free radicals, catalyzed by iron ions in emulsified lipids, leads to rancidity, with the development of undesirable flavors (Cheng & Li, 2007). Iron can also catalyze lipid oxidation of cell membranes (Guzun-Cojocar et al., 2011), resulting in the formation of reactive oxygen species (ROS). These reactive species participate in tissue injuries and are related to cardio and neurological diseases (Frankel, 1991; Torres-Fuentes et al., 2012). In addition, free iron are related to gastric mucosa damage (Slivka et al., 1986) and may intensify inflammatory disturbs (Lih-Brody et al., 1996; Cayot et al., 2013).

Iron may lead to formation of lipid radicals by the Fenton reaction, in which catalytic amounts of iron yield to hydroxyl radicals ($\text{OH}\cdot$) from superoxide ($\text{O}_2\cdot^-$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) (Papanikolaou & Pantopoulos, 2005), which can then abstract hydrogen atoms from unsaturated fatty acids (Cheng & Li, 2007). These unsaturated fatty acids can form alkyl and peroxy radicals as a consequence of free radical chain reaction in the presence of oxygen (Frankel, 1980). The primary compounds of lipid oxidation, lipid hydroperoxides (LOOH), are formed by the reaction of these radicals and give rise to low molecular mass (MM) secondary products, such as aldehydes, ketones, and alcohols (Pratt et al., 2011). Therefore, both primary and secondary products of lipid oxidation should be monitored to follow the oxidative process.

Proteins dispersed in the continuous phase of oil-in-water (O/W) emulsions can inhibit the lipid oxidation (Faraji et al., 2004; Elias et al., 2005; Guzun-Cojocar et al., 2011),

but peptides have higher antioxidant potential and may enhanced the protection against lipid oxidation in an emulsion system (Díaz et al., 2003; Elias et al., 2006). Lipid oxidation lowering effect can be attributed to radical scavenging or complexation with pro-oxidant metals naturally present within the system (Faraji et al., 2004; Elias et al., 2005). Some authors have reported the effect of iron complexation by proteins on the decrease of the extent of lipid oxidation in milk or emulsions model systems added with iron sources (Hekmat & McMahon, 1998; Sugiarto et al., 2010; Ueno et al., 2012; Ueno et al., 2014).

Although peptides have been considered as good ligands to coordinate iron ions and form stable complexes (Huang et al., 2011; Zhou et al., 2012; Caetano-Silva et al., 2015; Eckert et al., 2016), the capacity of peptide-iron complexes to decrease lipid oxidation through coordination of the iron ions has not been studied. In previous studies, we demonstrated that peptides from whey protein hydrolysate form stable complexes with iron, by bidentate coordinate covalent bonds (*Artigo 1; p. 48*), which protect iron during *in vitro* gastrointestinal digestion and lead to an increase in iron uptake in Caco-2 cells (Caetano-Silva et al., 2017). In the present study, we evaluated the primary and secondary products of lipid oxidation in O/W emulsions containing iron in various forms: iron salts (FeSO₄ and FeCl₂) and whey peptide-iron complexes. We aimed at evaluating the effect of peptide-iron complexation on lipid oxidation catalyzed by iron, using O/W emulsions as a model system.

2. Material and Methods

2.1. Material

Whey protein isolate (WPI) PROVON® was obtained from Glanbia Nutritionals (Kilkenny, Ireland) (90.4 ± 1.1 % protein, determined by the micro-Kjeldahl method (AOAC, 2006) – conversion factor: 6.38). The enzymatic system Pancreatin (4xUSP, from porcine pancreas, EC 232-468-9, P1750), Tween 20 (Polyethylene glycol sorbitan monolaurate, P9416) and ferrous sulfate (FeSO₄·7H₂O) were purchased from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). Ferrous chloride (FeCl₂·4H₂O) was purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). The patented complex Ferrochel® (ferrous bisglycinate) was kindly donated by Albion Laboratories (Clearfield, Utah, USA). The canola (*Brassica campestris* L.) oil used for emulsion preparation was purchased in a local market. This oil is constituted by 13 to 81% of monounsaturated fatty acids and 16 to 39% of polyunsaturated fatty acids with 11 to 23% (w/w) of linoleic acid residues (n-6) and 5 to 13% (w/w) of α -linolenic acid residues (n-3) (Codex

Alimentarius, 1999). The following standards used in SPME-GC-MS to identify and quantify the volatile compounds were purchased from Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, USA), with purity varying from 95 to 99%: pentanal, hexanal, 1-penten-3-ol, 1-pentanol, 1-hexanol, nonanal, 1-octen-3-ol, 1-heptanol.

2.2. Synthesis of peptide-iron complexes

The peptide-iron complexes were synthesized according to previous experiments (Caetano-Silva et al., 2017). Briefly, WPI (10% protein solution w/v) was hydrolyzed with pancreatin (enzyme:substrate ratio E/S 4% w/w) at pH 8.0 and 40 °C for 180 min and the enzyme was deactivated by heating (85 °C/15 min), accordingly to previously defined conditions. The hydrolysate was ultrafiltered using a cut-off 5 kDa membrane, and the fraction filtrate (**F**), MM < 5kDa, was freeze-dried and used as a ligand. The complexes were synthesized at pH 7.0, using 4% protein and 0.1% iron from FeCl₂ or FeSO₄. After 60 min with stirring (25±2 °C), the solutions were centrifuged (5000g/20 min) and the supernatant, containing the complexes, were freeze-dried. The complexes synthesized with the filtrate and FeCl₂ (**F-Fe C**) or filtrate and FeSO₄ (**F-Fe S**) were stored frozen (-18 °C) until further analysis. The iron content of **F-Fe C** and **F-Fe S**, determined as described at item 2.3, was 18.2 ± 0.3 and 17.2 ± 0.8 µg Fe/mg, respectively, while ferrous bisglycinate (**Bis-Fe**) showed an iron content of 193.3± 3.1 µg Fe/mg.

2.3. Iron analysis

The iron content of the freeze-dried peptide-iron complexes (**F-Fe C** and **F-Fe S**) and ferrous bisglycinate (**Bis-Fe**) was assessed by atomic absorption spectrophotometry (AAS), using a Perkin-Elmer Analyst 300 spectrometer (USA) equipped with a deuterium lamp background corrector. The procedures were carried out according to Boen et al. (2008). Briefly, samples were digested with concentrated nitric acid and hydrogen peroxide (2:1 v/v) at 110 °C for 2 h. After transferring the samples to volumetric flasks and completing the volume with ultrapure water, the iron content was measured using a hollow cathode lamp for iron (248.3 nm). A standard curve ranging from 0.2 to 2.6 mg Fe/L was built. The experiments were carried out in triplicate.

2.4. Oil-in-water emulsion preparation

The effect of iron complexation on the lipid oxidation catalyzed by iron was evaluated in O/W emulsions containing peptide-iron complexes, in comparison with emulsions containing the iron salts FeCl_2 or FeSO_4 . The O/W emulsion was prepared with canola (*Brassica campestris* L.) oil due to its high content of polyunsaturated fatty acids. The procedures were carried out based on described by Guzun-Cozocar et al. (2011) with modifications.

The emulsion was formulated with 30% canola oil, 1% Tween 20 and ultrapure water, at room temperature (25 ± 2 °C). Preparation was carried out in two steps: pre-emulsification in a rotor–stator homogenizer (Ultra Turrax model T18, IKA, Staufen, Germany) (14.000 rpm/4 min), creating a coarse emulsion, followed by a two-stage high-pressure valve homogenizer (30 MPa/5 MPa) (Panda 2K NS1001L, Niro Soavi, Parma, Italy) (Gomes et al., 2016). The size of the droplets, expressed as the volume-surface mean diameter ($D_{3,2}$) and measured by the laser diffraction method using a Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK), was 1.31 ± 0.02 μm . Immediately after the preparation, the pH of the emulsion was adjusted to 2.0 to allow proper solubility of complexes and iron salts.

Seven emulsions were prepared with 1 mmol. L^{-1} Fe by the addition of: 1) ferrous chloride (**FeCl₂**); 2) ferrous sulfate (**FeSO₄**); 3) peptide-iron complex **F-Fe C**; 4) peptide-iron complex **F-Fe S**; 5) filtrate and FeCl_2 (**F + C**); 6) filtrate and FeSO_4 (**F + S**); and 7) ferrous bisglycinate (**Bis-Fe**). Two emulsions with no iron addition were prepared: 1) emulsion with filtrate addition (**F**) and 2) emulsion with no other component addition (**control**). The emulsions were stored in the dark at 30 °C in an Incubator BOD - *Biological Oxygen Demand* (TE-390, Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil). The primary and secondary products of lipid oxidation were measured every day during 7 days (Guzun-Cojocar et al., 2011). Day 0 corresponds to the emulsion control immediately after the emulsion preparation.

2.5. Primary products of lipid oxidation: peroxide value (PV)

The primary products of lipid oxidation were quantified by the peroxide value (PV) assay, using a protocol adapted from Rebellato et al. (2015). Briefly, 10 g of emulsion were destabilized by chloroform addition (1:2 w/v) and 0.5 g sodium sulfate. After 2 min of vigorous shaking, the destabilized emulsion was centrifuged (3000g/5 min, 4 °C), the aqueous phase was removed by aspiration and the bottom layer passed through a common filter paper. The

analyses were carried out using the lipid fraction (micelle with chloroform). This procedure was carried out in triplicate for each sample, in three independent trials. After addition of acetic acid (3:2 v/v) and 0.5 mL KI saturated solution to the lipid fraction, the following procedure was repeated three times: 20 seconds of vigorous shaking and 10 seconds of rest in the dark. The PV was determined by titration with sodium thiosulphate using starch (1% solution) as indicator as described by *American Oil Chemists' Society*, Cd 8-53) (AOCS, 1997). The PV was given by Equation 1:

$$PV \text{ (meqv/kg)} = \frac{C \times 1000 \times V}{m} \quad (\text{Eq. 1})$$

Where: PV = peroxide value (meqv /kg); C = molarity of sodium thiosulphate solution (mol/L); V = volume of sodium thiosulphate solution (mL); m = sample mass (g).

2.6. Secondary products of lipid oxidation

The secondary products formation was evaluated by two different methods: determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and identification and quantification of volatile compounds by solid-phase micro-extraction - gas chromatography coupled with mass spectrometry (SPME-GC-MS).

2.6.1. TBARS

TBARS test indirectly quantifies the formation of malonaldehyde (MDA), a dialdehyde formed during the oxidation of polyunsaturated fatty acids and largely used as a bioindicator (Grotto et al., 2008). The reaction between 2-thiobarbituric acid and MDA leads to a red compound, measured spectrophotometrically (532 nm). TBARS values were determined according to Di Mattia et al. (2010) with modifications. Briefly, emulsions were diluted with ultrapure water (1:5 to 1:100) and aliquots of 2.0 mL were transferred for test tubes. Four milliliters of TBA reagent (15% w/v trichloroacetic acid and 0.375% w/v thiobarbituric acid in 0.25 mol/L HCl) were added to the tests tubes, incubated in a boiling water bath for 15 min, then cooled in an ice bath for 10 min and centrifuged (6800g/15min). The absorbance of supernatants was measured at 532 nm using an Agilent 8453 spectrophotometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Each experiment was accomplished in four replicates of two independent trials. The concentrations of TBARS were determined using a standard curve prepared with 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP), which is hydrolyzed under the experiment conditions and leads to MDA formation. The curve ranged from 0.17 to 5.5 mg. L⁻¹ TEP, corresponding to 0.055 to 1.801 mg. L⁻¹ MDA.

2.6.2. Volatile lipid oxidation products (VLOPS) by SPME-GC-MS

The volatile lipid oxidation products (VLOPs) produced during the 7 days of emulsion storage were identified and quantified by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) gas chromatography coupled with a mass spectrometer detector (GC-MS) in a GCMS-QP2010 Ultra spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Sample preparation, i.e, pre incubation conditions and adsorption conditions, were carried out according to Waraho et al. (2009), while chromatographic separation and MS conditions were based on described by Souza and Bragagnolo (2014).

Briefly, 1.0 g of emulsion was weighed in glass headspace vials with magnetic screw caps (SU860103, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). The emulsion was pre-incubated at 55 °C/13 min in an autosampler (AOC-5000, Shimadzu, Kyoto, Japan) heating block before fiber (50/30 µm DVB/ Carboxen/PDMS, Supelco) exposure in the headspace for 1 min. Then, the fiber was transferred to the injector port (250 °C/3 min), which was operated in split mode. The separation of the volatile compounds was achieved on a capillary column RTX-Wax (30 m × 0.25 mm inner diameter, 0.20 µm thick stationary phase, polyethylene glycol, Restek, Bellefonte, PA, USA). The column temperature started at 30 °C/5 min. The temperature was increased up to 115 °C at a rate of 10 °C/1 min, with hold time of 1.0 min. Then, it increased up to 220 °C at 30 °C/1 min rate, held at this temperature for 12.0 min.

The carrier gas was helium, in linear flow control mode (column flow: 1.22 mL/min). Ion source was used in electron ionization (EI) mode at 70 eV and 250 °C, cutting the solvent after 3.0 min. The scan mode (m/z 35–350) of the quadrupole mass/charge analyzer was used to identify the compounds. The analyses were carried out in duplicate of two independent trials. The spectra were processed using the selected ion monitoring (SIM) mode and the compounds with standard for SPME-GC-MS were identified. The target ion for identification was the base peak of each compound, as shown in Table 1.

Table 1. Target fragments (m/z) used to identify and quantify the volatile lipid oxidation products (VLOPs) by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) gas chromatography coupled with a mass spectrometer detector (GC-MS).

Peak	Compound name	Target fragment (m/z)	Reference fragments (m/z)
1	pentanal	44	58, 41
2	hexanal	44	56, 41
3	1-penten-3-ol	57	41, 39
4	1-pentanol	42	55, 41
5	2-heptenal	41	55, 83
6	1-hexanol	56	43, 55
7	nonanal	57	41, 56
8	2-octenal	41	70, 55
9	1-octen-3-ol	57	43, 72
10	1-heptanol	70	56, 41

The identification of the volatile compounds in the mass spectra of samples was done by comparison with the mass spectra of the analytical standards obtained under the same experimental conditions and by consulting the mass spectra library (Wiley9). The peak area of Day 1 (D1) and Day 7 (D7) was determined for all the identified compounds (Table 1), as well as the difference between them ($\Delta = D7-D1$). The plot of the peak area vs. time (days) was used to evaluate the hexanal formation during the 7 days.

2.7. Statistical analysis

The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The statistical analysis was performed using the statistical package GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. The Pearson correlation coefficient (r) was calculated for all samples between the variables PV and TBARS and TBARS and hexanal values. The closer the value of r is to 1, the stronger the correlation between the two variables (Benesty et al., 2009).

3. Results

3.1. Primary products of lipid oxidation

Figure 1 shows the PV of emulsions containing iron from different salts and in different forms during 7 days of storage at 30 °C. The **control** emulsion reached around 10 meqv/kg after 7 days. The PV increased with the addition of 1 mmol. L⁻¹ iron to the emulsion, especially in those with iron salts addition. This fact evidences the pro-oxidant effect of iron, which catalyzed the initiation of lipid oxidation, yielding a large amount of hydroperoxides. **Bis-Fe** and **FeSO₄** yielded similar peroxide values during the 7 days.

The addition of peptide-iron complexes to the emulsions increased the PV in less extent than iron salts. From Day 1 to Day 7, the PV of the emulsions with peptide-iron complexes (**F-Fe S** and **F-Fe C**) increased around 3 to 5-fold, while the values of the emulsions with filtrate along with iron salts (**F + S** and **F + C**) increased approximately 9 to 12-fold. The addition of **F + S** or **F + C** to the emulsions led to lower PV than the ones containing only iron salt, especially in the first 2 days, when the PV of **F + S** and **F + C** were similar to **F-Fe S** and **F-Fe C**. In the emulsion **F**, PV was around 80% lower than the **control** at Day 7, which reinforce the antioxidant character of this fraction.

From the Day 5, the emulsion **FeCl₂** presented a decrease in PV possibly because the active phase of hydroperoxide decomposition had begun. This phase is marked by an exponential increase in the formation of secondary oxidation products resulting from hydroperoxide decomposition, and the rate of hydroperoxide degradation is greater than the rate of its formation (Kamal-Eldin & Yanishlieva, 2005). The formation of hydroperoxide in all emulsions, except for emulsion **FeCl₂**, was greater than its decomposition, since the PV values increased until Day 7.

The iron source influenced the PV developing in emulsions. Comparing the complexes synthesized with both iron sources, **F-Fe S** led to a PV approximately 30% lower than **F-Fe C** at Day 7. The lipid oxidation in the presence of iron added as FeCl₂ differed from FeSO₄ with or without peptides addition.

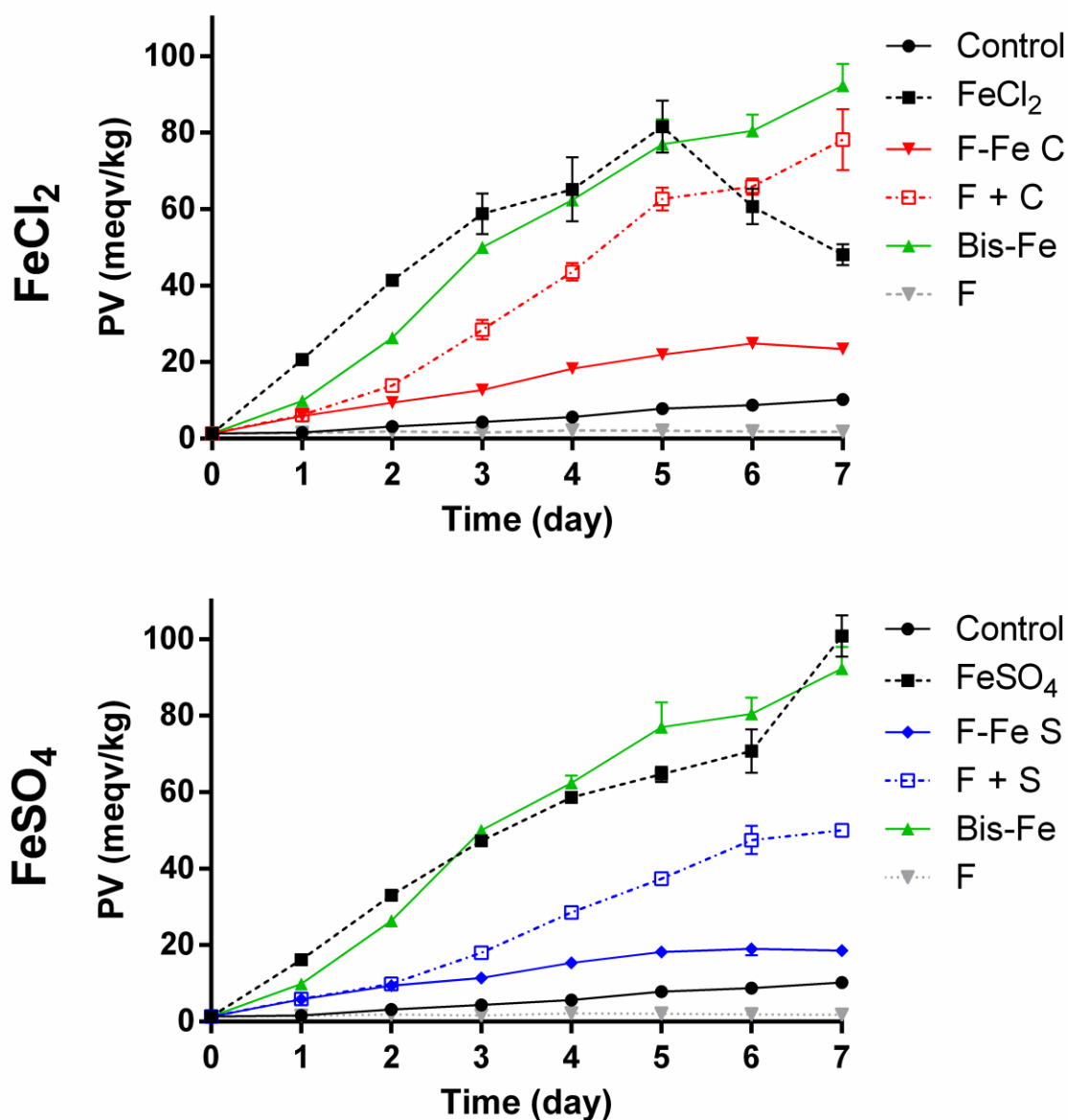


Figure 1. Peroxide value (PV) of canola oil O/W emulsion containing 1mM Fe in free and complexed forms. **FeCl₂** and **FeSO₄** – iron salts; **F-Fe C** and **F-Fe S** – peptide-iron complexes synthesized with filtrate and FeCl₂ or FeSO₄, respectively; **F + C** and **F + S** – filtrate (fraction < 5 kDa) (2 mg protein/g emulsion) + FeCl₂ or FeSO₄, respectively; **Bis-Fe** – ferrous bisglycinate. Control emulsions without iron: **control** – with no other component addition; **F** – filtrate (fraction < 5 kDa) (2 mg protein/g emulsion). Samples stored at 30 °C.

3.2. Secondary products of lipid oxidation

3.2.1. TBARS

Formation of secondary products of lipid oxidation, measured as TBARS, was observed from Day 1 in all iron added samples (Figure 2), indicating the fast breakdown of hydroperoxides to other products. At Day 7 the **control** showed TBARS values lower than the samples with iron addition at Day 1. The TBARS final values (Day 7) for the emulsions with iron salts, peptide-iron complexes or iron salts + peptides were, respectively, 37 to 39-, 16 to 20-, and 27 to 28-fold higher than that of the **control**. By the other hand, the **control** emulsion reached value more than 60% higher than the emulsion **F** after 7 days.

The TBARS increasing during the storage showed the same profile as observed for peroxide formation. TBARS values showed high correlation with PV results ($r > 0.96$) for all iron added samples, except for FeCl_2 . The lower correlation for this sample ($r = 0.85$) is due to the decrease of PV from the Day 5.

The TBARS assay gives the indirect measurement of malonaldehyde (MDA), a dialdehyde formed as a result of the reaction of a peroxy radical with a double bond of the lipid chain (Porter, 2013). It is worth mentioning that TBA can also react with other substances than MDA, such as amino acids, sugars, bile pigments, and other lipid oxidation products (Knight et al., 1988; Gutteridge, 1982). Thus, it is a nonspecific test, and the generated artifacts may overestimate TBARS results (Mariutti & Bragagnolo, 2015).

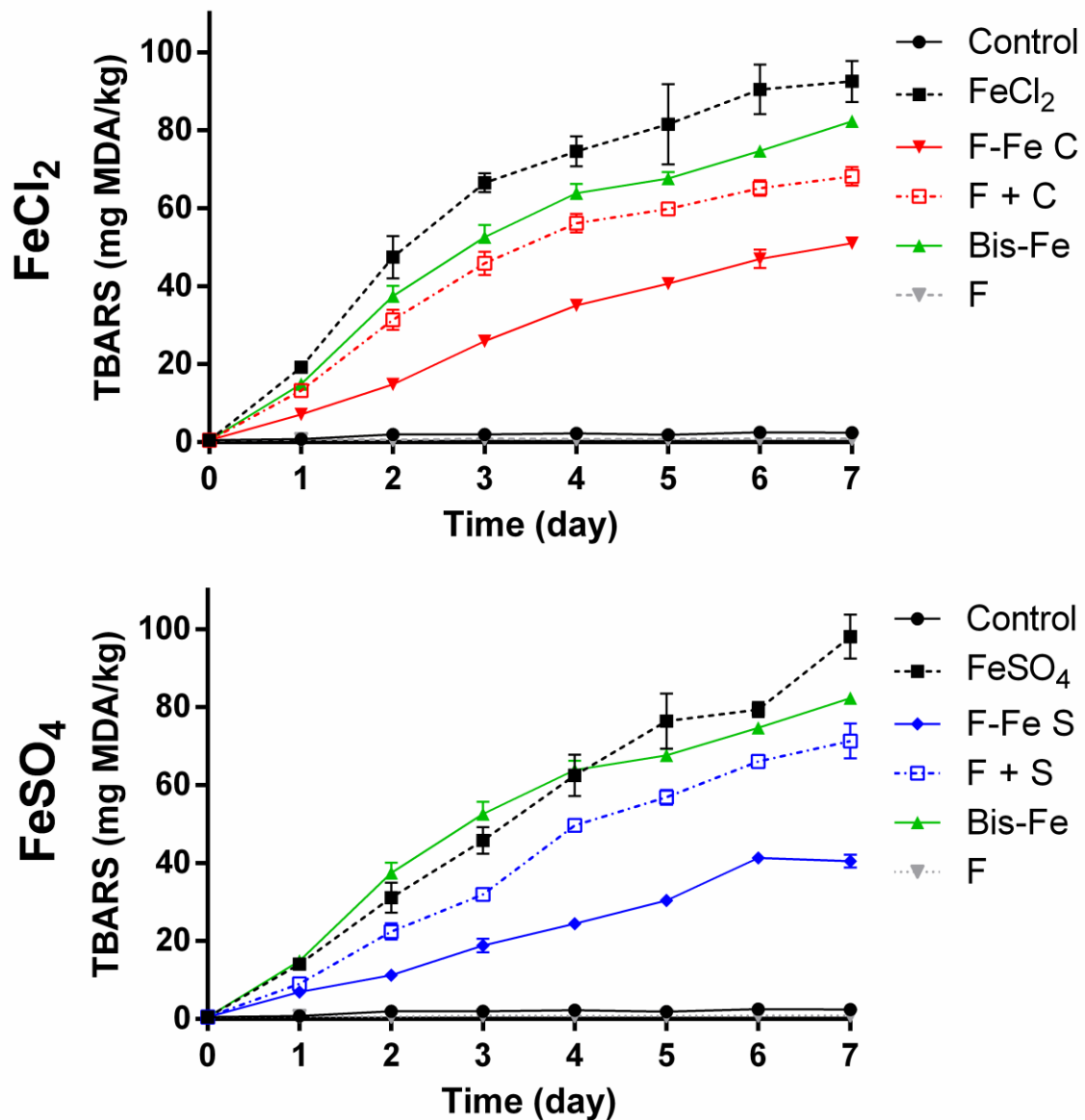


Figure 2. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) of canola oil O/W emulsion containing 1mM Fe in free and complexed forms. **FeCl₂** and **FeSO₄** – iron salts; **F-Fe C** and **F-Fe S** – peptide-iron complexes synthesized with filtrate and FeCl₂ or FeSO₄, respectively; **F + C** and **F + S** – filtrate (fraction < 5 kDa) (2 mg protein/g emulsion) + FeCl₂ or FeSO₄, respectively; **Bis-Fe** – ferrous bisglycinate. Control emulsions without iron: **control** – emulsion with no other component addition; **F** – filtrate (fraction < 5 kDa) (2 mg protein/g emulsion), with no iron addition. Samples stored at 30 °C.

3.2.2. Volatile lipid oxidation products (VLOPs) by SPME-GC-MS

The aldehydes hexanal, pentanal, 2-octenal, 2-heptenal, and nonanal, and the alcohols 1-pentanol, 1-penten-3-ol, 1-octen-3-ol, 1-hexanol, and 1-heptanol were identified at the first and the last day of the experiment. Table 2 shows the peak area relative to the identified volatile compounds in the emulsions spectra at Day 1 and Day 7. The color scale (from green to red) shows the increasing peak area of each compound. The profile of VLOPs formed in the emulsions containing iron in free and complexed form was quite different, as can be seen by the colors (Table 2). The addition of peptide-iron complexes led to formation of all VLOPs in lower extent than iron salts, resulting in peak area of compounds up to 195-fold lower. At Day 7, the main secondary products in the emulsions containing iron was hexanal, followed by pentanal, 1-penten-3-ol, and 1-pentanol for iron salts, while peptides along with iron salts and **Bis-Fe**. For peptide-iron complexes, the main compounds, besides hexanal, were 1-penten-3-ol and 1-hexanol.

The identified compounds were found in the emulsions from the Day 1, and their intensity increased throughout the storage, except the alcohol 1-heptanol, that was not detected in all samples at the first day. The volatile compounds pentanal and 1-heptanol were not detected in the spectra of the **control** and **F** emulsions neither in the first nor in the last day of the experiment. Concerning the different iron sources, FeSO_4 and FeCl_2 led to different levels of lipid oxidation products, but the pathway of lipid oxidation was not influenced since the compounds found in all samples did not differ.

After 7 days, the relative area of the hexanal peak in the GC-MS chromatogram was around 2 to 4-fold higher than the sum of the other identified compounds. Figure 3 shows the total ion chromatograms (TIC) obtained by GC-MS. The great difference of intensity between hexanal and the other compounds is clear in the chromatogram of emulsions with **FeCl₂**, **F + C**, and **F-Fe C**. Despite the lack of specificity of TBARS assay, hexanal values showed good correlation with TBARS ones ($r > 0.85$) for emulsions with iron addition, except with peptide-iron complexes ($r = 0.44-0.72$).

Table 2. Volatile lipid oxidation products (VLOP) (area under the GC-MS chromatographic peak; SIM MODE) identified in canola oil O/W emulsion containing 1mM Fe in free and complexed forms.

VLOP	Day 1 (D1)									Day 7 (D7)								
	Peak area (x 10 ⁴)									Peak area (x 10 ⁴)								
	Control	FeCl ₂	FeSO ₄	F-Fe C	F-Fe S	Bis	F + C	F + S	F	Control	FeCl ₂	FeSO ₄	F-Fe C	F-Fe S	Bis	F + C	F + S	F
Pentanal	*	31.82	76.53	3.63	1.29	71.69	49.95	15.41	*	*	729.57	551.93	5.04	3.54	577.64	534.91	206.56	*
Hexanal	2.86	747.47	537.90	87.18	55.73	553.05	361.54	209.46	3.10	14.56	4795.63	4078.90	189.26	90.28	3886.56	3752.56	1585.69	3.33
1-penten-3-ol	0.36	110.96	60.72	7.80	6.19	55.90	30.08	10.76	0.01	3.40	325.63	334.49	130.32	54.57	350.54	397.27	352.98	1.08
1-pentanol	0.18	11.43	6.84	0.90	0.54	6.63	3.46	1.54	0.24	0.71	201.08	185.79	6.37	4.54	159.69	209.75	85.04	0.37
2-heptenal	0.07	25.46	15.43	1.69	1.12	13.94	7.79	3.37	0.09	0.15	149.59	147.10	2.25	2.48	119.21	131.91	78.92	0.12
1-hexanol	0.21	1.80	1.22	0.68	0.34	1.08	0.82	0.59	0.17	0.77	22.28	19.01	33.48	9.20	17.82	18.69	19.88	0.26
nonanal	0.35	6.39	5.19	1.74	1.23	4.61	4.10	3.46	0.43	0.90	47.12	30.76	3.44	2.31	30.92	29.68	10.57	0.46
2-octenal	0.05	12.34	7.09	0.64	0.47	6.28	2.85	1.35	0.03	0.13	145.92	137.56	1.24	0.72	106.52	114.32	50.08	0.07
1-octen-3-ol	0.06	20.46	10.44	0.49	0.37	9.60	3.91	0.82	0.16	0.33	135.11	128.42	5.34	2.48	109.85	128.28	76.89	0.17
1-heptanol	*	1.40	*	*	*	0.67	0.16	0.26	*	*	39.85	19.58	*	*	21.39	23.36	7.12	*

Peak	VLOP	Target fragment (m/z) ¹	Reference fragments (m/z)	RT ²	ΔD7-D1								
					Peak area (x 10 ⁴)								
					Control	FeCl ₂	FeSO ₄	F-Fe C	F-Fe S	Bis	F + C	F + S	F
1	Pentanal	44	58, 41	5.3	*	697.75	475.40	1.40	2.25	505.95	484.96	191.15	*
2	Hexanal	44	56, 41	7.9	11.70	4048.16	3541.00	102.08	34.55	3333.50	3391.02	1376.24	0.23
3	1-penten-3-ol	57	41, 39	9.7	3.05	214.67	273.77	122.52	48.38	294.64	367.20	342.22	1.07
4	1-pentanol	42	55, 41	11.3	0.53	189.65	178.95	5.48	4.00	153.06	206.29	83.50	0.13
5	2-heptenal	41	55, 83	12.5	0.07	124.13	131.67	0.56	1.36	105.27	124.12	75.55	0.03
6	1-hexanol	56	43, 55	12.9	0.57	20.48	17.80	32.80	8.86	16.74	17.87	19.29	0.09
7	nonanal	57	41, 56	13.5	0.55	40.74	25.58	1.70	1.08	26.31	25.59	7.11	0.03
8	2-octenal	41	70, 55	14.1	0.07	133.58	130.47	0.60	0.25	100.24	111.46	48.73	0.04
9	1-octen-3-ol	57	43, 72	14.4	0.27	114.65	117.99	4.85	2.11	100.25	124.37	76.07	0.01
10	1-heptanol	70	56, 41	14.5	*	38.45	19.58	*	*	20.72	23.20	6.85	*

¹ The target ion for identification was the base peak of each compound; ² Retention time (min). *compound not detected. **FeCl₂** and **FeSO₄** – iron salts; **F-Fe C** and **F-Fe S** – peptide-iron complexes synthesized with filtrate and FeCl₂ or FeSO₄, respectively; **F + C** and **F + S** – filtrate (fraction < 5 kDa) + FeCl₂ or FeSO₄, respectively; **Bis-Fe** – ferrous bisglycinate. Control emulsions without iron: **control** – emulsion with no other component addition; **F** – filtrate (fraction < 5 kDa), with no iron addition. Samples stored at 30 °C. The label colors were defined using color scale in conditional formatting of Excel. Green labels represent compounds formed in a lower extent than red labels; yellow and orange labels represent intermediate values.

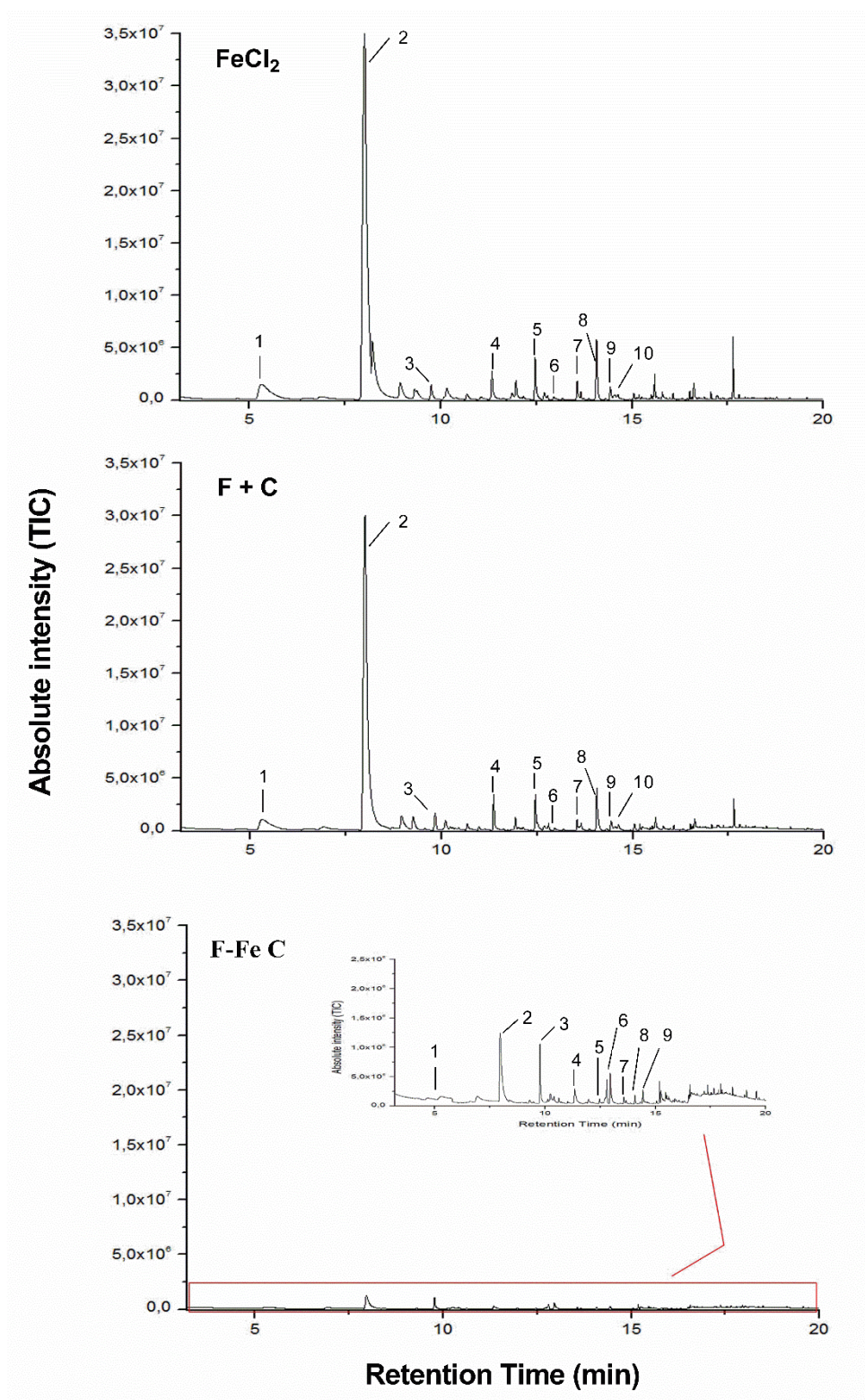


Figure 3. Total Ion Chromatograms (TIC) (m/z 35–350) of volatile compounds obtained by HS-SPME-GC-MS, of canola oil O/W emulsion. The emulsions contained 1mM Fe from FeCl_2 , **F-Fe C** (peptide-iron complex synthesized with filtrate (fraction < 5 kDa) and FeCl_2); and **F + C** (filtrate fraction + FeCl_2). The emulsions were stored 7 days at 30 °C. Compounds are numbered according to Table 1.

Hexanal, the major saturated aldehyde originated from the breakdown of n-6 fatty acid peroxides (Frankel, 1993), was identified and quantified in the emulsions during the 7 days of storage (Figure 4).

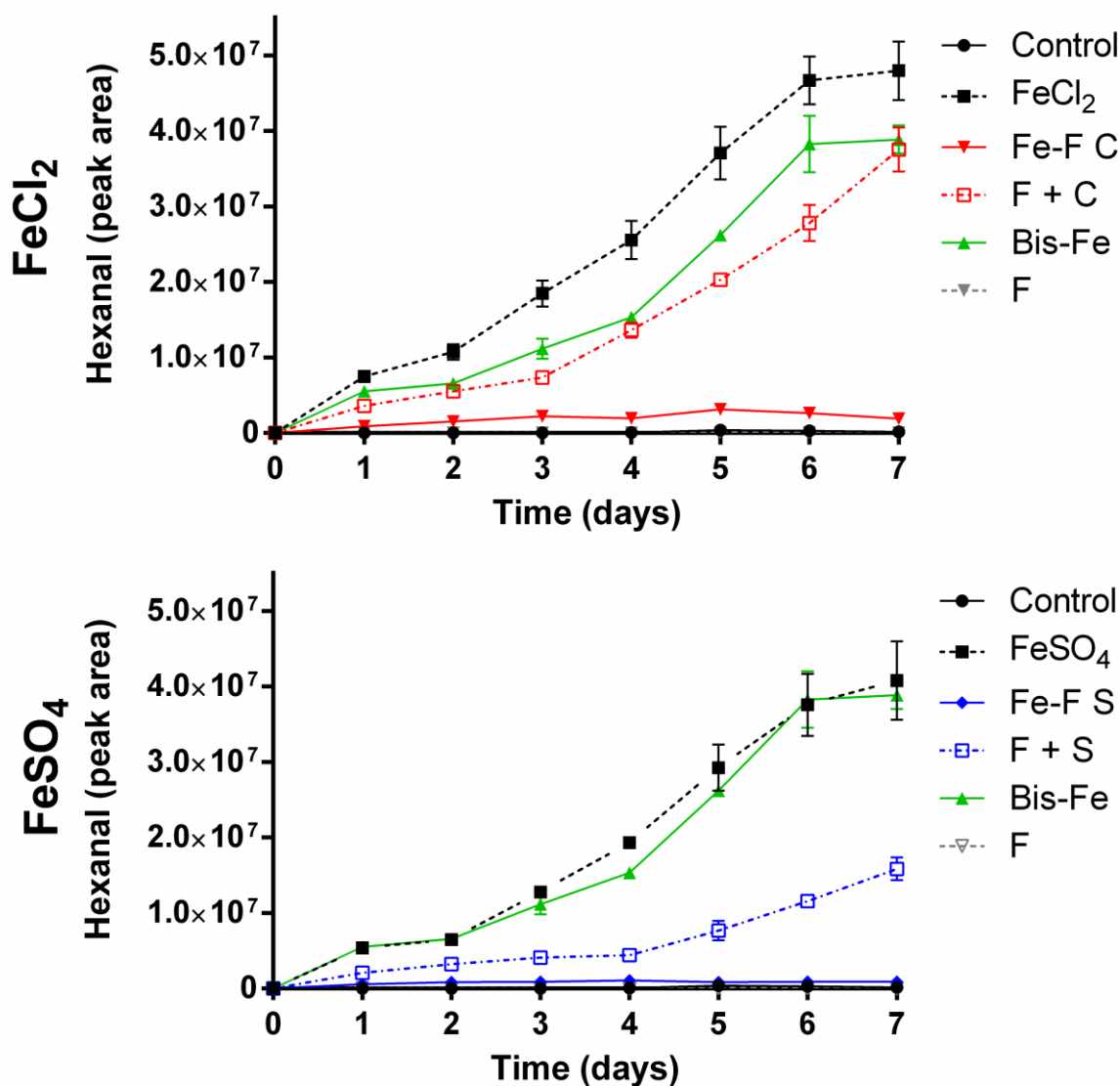


Figure 4. Hexanal (area under the GC-MS chromatographic peak; SIM MODE – m/z 44) of canola oil O/W emulsion containing 1mM Fe in free and complexed forms. **FeCl₂** and **FeSO₄** – iron salts; **F-Fe C** and **F-Fe S** – peptide-iron complexes synthesized with filtrate and FeCl₂ or FeSO₄, respectively; **F + C** and **F + S** – filtrate (fraction < 5 kDa) (2 mg protein/g emulsion) + FeCl₂ or FeSO₄, respectively; **Bis-Fe** – ferrous bisglycinate. Control emulsions without iron: **control** – emulsion with no sample addition; **F** – filtrate (fraction < 5 kDa) (2 mg protein/g emulsion), with no iron addition. Samples stored at 30 °C.

From the first day of storage, emulsion with iron salts and **Bis-Fe** led to a higher hexanal peak areas (Figure 4) than the emulsions with **F + C** and **F + S**. Among the iron added samples, the emulsions with **F-Fe C** and **F-Fe S** showed the smallest peak area, suggesting that the complexes hinder the lipid oxidation catalyzed by iron. This fact can be explained either by the lower formation of primary products or by the capacity of peptides to scavenging the secondary products.

4. Discussion

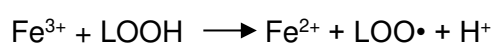
Iron, a transition metal, exhibits strong pro-oxidant effect in various food systems. It is capable of generating reactive oxygen species (ROS), including the hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) and superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) radicals, which can react directly with unsaturated fatty acids to produce hydroperoxides and promote oxidative damage at different levels (Saiga et al., 2003; Sugiarto et al., 2010). In this work, we studied the effect of peptide-iron complexation on the capacity of iron to oxidize canola oil, rich in polyunsaturated fatty acids, in O/W emulsions as a model system. The complexes **F-Fe C** and **F-Fe S** used in the present work showed the best *in vitro* iron bioavailability results in a previous work (Caetano-Silva et al., 2017).

The peptide-iron complexes seem to exert a crucial role in reducing the pro-oxidant effect of iron and thus increasing the oxidative stability of emulsions since they led to the lowest formation of primary and secondary oxidation products comparing to iron salts and whey peptides along with iron salts (**F + C** and **F + S**). To explain such differences, we propose two pathways, which can occur at the same time. First, the whey peptides, known for their antioxidant activity (Pihlanto, 2006; Peng et al., 2009; Brandelli et al., 2015), interacted and stabilized the reactive species generated during emulsion storage. This property was proved by the lowering of oxidation products formation observed when the peptides are included to emulsions (**F**), along with iron salt (**F + C** and **F + S**) and as peptide-iron complexes (**F-Fe C** and **F-Fe S**). In the peptide-iron complexes, which are composed by numerous peptides besides those involved in iron coordination, part of the peptides does not coordinate iron ions (*Artigo 1, p. 48*), therefore, they have functional groups available to scavenging reactive species.

The addition of **Bis-Fe** to the emulsion led to lipid oxidation similar to the iron salts, despite the iron complexation, proving the great importance of the whey peptides as antioxidants in the system. However, the comparison of the results from the emulsions added with **F + FeCl₂** or **F + FeSO₄** and with the complexes showed the impact of the previous formation of the peptide-iron complex. This stable structure may hinder the iron capacity to

interact with the lipid phase and to catalyze the lipid oxidation. Despite this protective effect, emulsions containing peptide-iron complexes showed formation of lipid oxidation products in a higher extent than the **control** and **F**. This fact suggests that part of the iron ions, possibly weakly bound, may act as pro-oxidant, albeit in a lower extent. Besides, the peptides may show less functional groups available to scavenge the radicals due to their participation in iron coordination.

Iron ions can promote the degradation of hydroperoxides by one of the following mechanisms (Cheng & Li, 2007; Halliwell & Gutteridge, 2007):



These lipid radicals can then abstract hydrogen atoms of unsaturated fatty acids, and propagate the chain reaction (Cheng & Li, 2007). The degradation of hydroperoxides catalyzed by iron ions can occur in proximity of emulsion droplet interface (Kellerby et al., 2006). The aqueous phase, which constitutes around 70% of the emulsions, could facilitate the motion of the ions (Silva et al., 1999) and their action in the oil:water interface. Cho et al. (2003) observed that iron chelators are capable of increasing the transfer of iron from lipid droplets in O/W emulsions to the aqueous phase, thus decreasing its pro-oxidant activity, which is in accordance with our results of emulsions containing iron as peptide-iron complexes.

In an aqueous medium, iron salts are ionized and dissociate in iron ion and their counterions. Osinchak et al. (1992) demonstrated that the chloride ion may have an important effect on lipid oxidation, contributing to an oxidative effect, which suggests that the counterions (SO_4^{2-} and Cl^-) may also have a role in the lipid oxidation process in the system of the present study. This fact may have contributed to the different oxidation levels observed between FeSO_4 and FeCl_2 , although the emulsions contained the same iron concentration.

Alkoxyl ($\text{LO}\cdot$) and peroxy ($\text{LOO}\cdot$) radicals, formed by hydroperoxides (LOOH) degradation, lead to the formation of other products, such as aldehydes, ketones, acids, esters, alcohols, and short-chain hydrocarbons (Frankel, 1983; Silva et al., 1999; Choe & Min, 2006). In the emulsions without iron addition (**control** and **F**) the formation of less types of compounds and in much lower extent than the emulsions containing iron were observed (Table 2). Therefore, even more than temperature and time, iron ions seem to be the main responsible for the formation of alcohols and aldehydes identified in the iron containing emulsions. Considering the low levels of volatile compounds found in the emulsions with peptide-iron

complexes, it seems that iron remained mostly linked to peptides functional groups and out of reach of the lipid interface, decreasing the rate of oxidation.

Each volatile compound is formed from a different fatty acid. The degradation of peroxides from n-3 fatty acids yields to 1-penten-3-ol (Souza & Bragagnolo, 2014), whereas the n-6 fatty acids give rise to the formation of pentanal, hexanal, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-octen-3-ol, and 2-octenal (Choe & Min, 2006). The aldehyde nonanal and the alcohol 1-heptanol are formed from the oxidation of n-9 fatty acids (Choe & Min, 2006).

Although n-9 fatty acids constitute the majority of canola oil composition, the volatile compounds formed in a greater extent in the emulsions containing the peptide-iron complexes were 1-penten-3-ol from α -linolenic acid (n-3) and hexanal and 1-hexanol originated from linoleic acid (n-6) (Table 2), due to the greater susceptibility of these fatty acids to oxidation. The oxidation rate for oleic, linoleic and linolenic acid generally follows the proportion 1:12:25, respectively, due to the number of double bonds and the bond energy necessary for abstraction of hydrogen atom (Min & Boff, 2002). Emulsions containing free form of iron resulted in a greater extent of volatile compounds formation, including the ones originated from n-9 fatty acid.

Although fat hydroperoxides are generally tasteless and odorless, the short-chain volatile compounds have a great impact on the sensory quality of foods, including the rancid off-flavor (Frankel, 1983; Kamal-Eldin & Pokorn, 2005). Thus, the peptide-iron complex may lead to lower impact in the sensory quality of foodstuffs in comparison to iron salts, ferrous bisglycinate, and even to iron salts added with peptides.

One of the major challenges at choosing a compound to fortify food with iron is the relation bioavailability vs. reactivity, since, generally, the higher bioavailability of the compound, the lower the stability (Habeych et al., 2016), due to its reactivity. The complex **F-Fe C** could be an exception for this statement. Comparing to compounds applied for food fortification, such as ferrous sulfate and ferrous bisglycinate, the complex **F-Fe C** showed lower reactivity and, according to previous results, higher *in vitro* bioavailability (Caetano-Silva et al., 2017). Previous *in vitro* bioavailability experiments showed that the complexed iron is possibly transported across the brush border membrane through the normal intestinal absorption route for peptides, while remaining coordinated. Therefore, this complex might not release the iron ions during gastrointestinal digestion, preventing interactions with inhibitory dietary ligands and binding agents such as phytate and oxalate. Moreover, an undissociated compound may be less likely to cause gastrointestinal irritation in sensitive people (Gerber, 2011).

The protection of iron provided by the metal coordination could make the use of this peptide-iron complex advantageous for food fortification. However, in this study, we evaluated a model system during 7 days at 30 °C. Future studies on peptide-iron complexes in food products, evaluating the entire shelf life, should demonstrate the impact of peptide-iron complexation in the pro-oxidant effect of iron regarding the possible decrease in undesirable sensory changes.

5. Conclusion

Whey peptide-iron complexes reduce the pro-oxidant effect of iron comparing to the iron salt form in an emulsified model system. The aldehydes and alcohols formed in emulsions containing the complexes were mainly derived from n-3 and n-6 fatty acids, more susceptible to oxidation. Iron in its free form led to the formation of volatile compounds in much greater extent, including the ones formed from n-9 fatty acids, suggesting that more iron ions are available to catalyze the lipid oxidation. The source of iron for synthesizing peptide-iron complexes might influence the lipid oxidation catalyzed by iron, because FeCl_2 and FeSO_4 led to lipid oxidation in varying levels.

Besides the capacity of whey peptides to neutralize the lipid radicals, the previous formation of a peptide-iron complex can exert an indirect antioxidant capacity, since the lipid oxidation of emulsions containing these complexes was quite lower than the emulsions containing whey peptides along with iron salts. The formation of a ring structure with the metal seems to protect iron from interacting with the lipid phase and thus diminish the lipid oxidation. Therefore these complexes can potentially reduce the undesirable sensory changes and hence be an alternative of less reactive iron for food fortification, but further studies are necessary to evaluate if the behavior observed in this model system is also observed in food products

Acknowledgments

The authors thank the Laboratory of Process Engineering (Department of Food Engineering) and the Food Chemistry Laboratory II (Department of Food Science) at the Faculty of Food Engineering (University of Campinas) for the support with the emulsions production and the GC-MS analyses. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [grant number 2013/10356-7].

References

- AOAC. (2006). *Official Methods of Analysis of the AOAC International* (18th ed.). Gaithersburg: AOAC.
- AOCS. (1997). *Official Methods and Recommended Practices of AOCS* (5th ed.). Champaign.
- Benesty, J., Chen, J., Huang, Y., & Cohen, I. (2009). *Pearson Correlation Coefficient Noise Reduction in Speech Processing* (pp. 1-4): Springer.
- Boen, T. R., Soeiro, B. T., Pereira-Filho, E. R., & Lima-Pallone, J. A. (2008). Folic Acid and Iron Evaluation in Brazilian Enriched Corn and Wheat Flours. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19, 53-59.
- Brandelli, A., Daroit, D. J., & Corrêa, A. P. F. (2015). Whey as a Source of Peptides with Remarkable Biological Activities. *Food Research International*, 73, 149-161.
- Caetano-Silva, M. E., Bertoldo-Pacheco, M. T., Paes-Leme, A. F., & Netto, F. M. (2015). Iron-Binding Peptides from Whey Protein Hydrolysates: Evaluation, Isolation and Sequencing by LC-MS/MS. *Food Research International*, 71, 132-139.
- Caetano-Silva, M. E., Cilla, A., Bertoldo-Pacheco, M. T., Netto, F. M., & Alegría, A. (2017). Evaluation of in Vitro Iron Bioavailability in Free Form and as Whey Peptide-Iron Complexes. *Journal of Food Composition and Analysis*.
- Cayot, P., Guzun-Cojocar, T., & Cayot, N. (2013). Iron Fortification of Milk and Dairy Products. In V. R. Preedy, R. Srirajaskanthan & V. B. Patel (Eds.), *Handbook of Food Fortification and Health: From Concepts to Public Health Applications*, Volume 1 (pp. 75-89). New York, NY: Springer New York.
- Cheng, Z., & Li, Y. (2007). What Is Responsible for the Initiating Chemistry of Iron-Mediated Lipid Peroxidation: An Update. *Chemical Reviews*, 107(3), 748-766.
- Cho, Y. J., Alamed, J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2003). Ability of Chelators to Alter the Physical Location and Prooxidant Activity of Iron in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Food Science*, 68(6), 1952-1957.
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), 169-186.
- Codex Alimentarius. (1999). *Codex Standard for Named Vegetable Oils (CODEX-STAN 210 - 1999)*. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/004/y2774e/y2774e04.htm>
- Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1996). Lipid Oxidation in Food Emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 7(3), 83-91.
- Di Mattia, C. D., Sacchetti, G., Mastrocola, D., Sarker, D. K., & Pittia, P. (2010). Surface Properties of Phenolic Compounds and Their Influence on the Dispersion Degree and Oxidative Stability of Olive Oil O/W Emulsions. *Food Hydrocolloids*, 24(6-7), 652-658.
- Díaz, M., Dunn, C. M., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2003). Use of Caseinophosphopeptides as Natural Antioxidants in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2365-2370.

- Eckert, E., Lu, L., Unsworth, L. D., Chen, L., Xie, J., & Xu, R. (2016). Biophysical and in Vitro Absorption Studies of Iron Chelating Peptide from Barley Proteins. *Journal of Functional Foods*, 25, 291-301.
- Elias, R. J., Bridgewater, J. D., Vachet, R. W., Waraho, T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2006). Antioxidant Mechanisms of Enzymatic Hydrolysates of Beta-Lactoglobulin in Food Lipid Dispersions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9565-9572.
- Elias, R. J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2005). Antioxidant Activity of Cysteine, Tryptophan, and Methionine Residues in Continuous Phase Beta-Lactoglobulin in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 10248-10253.
- Faraji, H., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2004). Role of Continuous Phase Protein on the Oxidative Stability of Fish Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4558-4564.
- Frankel, E. N. (1980). Lipid Oxidation. *Progress in Lipid Research*, 19(1-2), 1-22.
- Frankel, E. N. (1983). Volatile Lipid Oxidation Products. *Progress in Lipid Research*, 22(1), 1-33.
- Frankel, E. N. (1991). Review. Recent Advances in Lipid Oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54(4), 495-511.
- Frankel, E. N. (1993). Formation of Headspace Volatiles by Thermal Decomposition of Oxidized Fish Oils vs. Oxidized Vegetable Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(8), 767-772.
- Gerber, J. (2011). A Review of Mineral Absorption with Special Consideration of Chelation as a Method to Improve Bioavailability of Mineral Supplements. Retrieved Feb 7th, 2017, from <http://www.integrativepractitioner.com/article_ektid6418.aspx>
- Gomes, A., Costa, A. L. R., de Assis Perrechil, F., & da Cunha, R. L. (2016). Role of the Phases Composition on the Incorporation of Gallic Acid in O/W and W/O Emulsions. *Journal of Food Engineering*, 168, 205-214.
- Grotto, D., Valentini, J., Boeira, S., Paniz, C., Maria, L. S., Vicentini, J., . . . Cardoso, S. G. (2008). Avaliação da Estabilidade do Marcador Plasmático do Estresse Oxidativo: Malondialdeído. *Química Nova*, 31, 275-279.
- Guo, L., Harnedy, P. A., Li, B., Hou, H., Zhang, Z., Zhao, X., & FitzGerald, R. J. (2014). Food Protein-Derived Chelating Peptides: Biofunctional Ingredients for Dietary Mineral Bioavailability Enhancement. *Trends in Food Science & Technology*, 37(2), 92-105.
- Guzun-Cojocar, T., Koev, C., Yordanov, M., Karbowiak, T., Cases, E., & Cayot, P. (2011). Oxidative Stability of Oil-in-Water Emulsions Containing Iron Chelates: Transfer of Iron from Chelates to Milk Proteins at Interface. *Food Chemistry*, 125(2), 326-333.

- Habeych, E., van Kogelenberg, V., Sagalowicz, L., Michel, M., & Galaffu, N. (2016). Strategies to Limit Colour Changes When Fortifying Food Products with Iron. *Food Research International*, 88, Part A, 122-128.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine* (4th ed.). United States: Oxford University Press Inc. .
- Hekmat, S., & McMahon, D. J. (1998). Distribution of Iron between Caseins and Whey Proteins in Acidified Milk. *LWT - Food Science and Technology*, 31(7–8), 632-638.
- Huang, G., Ren, Z., & Jiang, J. (2011). Separation of Iron-Binding Peptides from Shrimp Processing by-Products Hydrolysates. *Food and Bioprocess Technology*, 4(8), 1527-1532.
- Kamal-Eldin, A., & Pokorn, J. (2005). Lipid Oxidation Products and Methods Used for Their Analysis *Analysis of Lipid Oxidation*: AOCS Publishing.
- Kamal-Eldin, A., & Yanishlieva, N. (2005). Kinetic Analysis of Lipid Oxidation Data *Analysis of Lipid Oxidation*: AOCS Publishing.
- Kellerby, S. S., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2006). Role of Proteins in Oil-in-Water Emulsions on the Stability of Lipid Hydroperoxides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7879-7884.
- Lih-Brody, L., Powell, S. R., Collier, K. P., Reddy, G. M., Cerchia, R., Kahn, E., . . . Mullin, G. E. (1996). Increased Oxidative Stress and Decreased Antioxidant Defenses in Mucosa of Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 41(10), 2078-2086.
- Mariutti, L. R. B., & Bragagnolo, N. (2015). Analysis Methods for Thiobarbituric Acid Reactive Substances and Malonaldehyde in Food and Biological Samples In J. C. Taylor (Ed.), *Advances in Chemistry Research* (Vol. 29, pp. 91-124). New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Mimura, É. C. M., Breganó, J. W., Dichi, J. B., Gregório, 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.
- Min, D., & Boff, J. (2002). Lipid Oxidation of Edible Oil *Food Lipids*: CRC Press.
- Osinchak, J. E., Hultin, H. O., Zajicek, O. T., Kelleher, S. D., & Huang, C.-H. (1992). Effect of NaCl on Catalysis of Lipid Oxidation by the Soluble Fraction of Fish Muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, 12(1), 35-41.
- Papanikolaou, G., & Pantopoulos, K. (2005). Iron Metabolism and Toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202(2), 199-211.
- Peng, X., Xiong, Y. L., & Kong, B. (2009). Antioxidant Activity of Peptide Fractions from Whey Protein Hydrolysates as Measured by Electron Spin Resonance. *Food Chemistry*, 113(1), 196-201.
- Pihlanto, A. (2006). Antioxidative Peptides Derived from Milk Proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1306-1314.

- Porter, N. A. (2013). A Perspective on Free Radical Autoxidation: The Physical Organic Chemistry of Polyunsaturated Fatty Acid and Sterol Peroxidation. *The Journal of Organic Chemistry*, 78(8), 3511-3524.
- Pratt, D. A., Tallman, K. A., & Porter, N. A. (2011). Free Radical Oxidation of Polyunsaturated Lipids: New Mechanistic Insights and the Development of Peroxyl Radical Clocks. *Accounts of Chemical Research*, 44(6), 458-467.
- 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, Part 3, 385-391.
- Saiga, A., Tanabe, S., & Nishimura, T. (2003). Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3661-3667.
- Schümann, 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*, 21(3), 147-168.
- Shiota, M., Uchida, T., Oda, T., & Kawakami, H. (2006). Utilization of Lactoferrin as an Iron-Stabilizer for Soybean and Fish Oil. *Journal of Food Science*, 71(3), C120-C123.
- Silva, F. A. M., Borges, M. F. M., & Ferreira, M. A. (1999). Métodos Para Avaliação Do Grau De Oxidação Lipídica E Da Capacidade Antioxidante. *Química Nova*, 22, 94-103.
- Slivka, A., Kang, J., & Cohen, G. (1986). Hydroxyl Radicals and the Toxicity of Oral Iron. *Biochemical pharmacology*, 35(4), 553-556.
- Souza, H. A. L., & Bragagnolo, N. (2014). New Method for the Extraction of Volatile Lipid Oxidation Products from Shrimp by Headspace–Solid-Phase Microextraction–Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Evaluation of the Effect of Salting and Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(3), 590-599.
- Sugiarto, M., Ye, A., Taylor, M. W., & Singh, H. (2010). Milk Protein-Iron Complexes: Inhibition of Lipid Oxidation in an Emulsion. *Dairy Science Technology*, 90(1), 87-98.
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., & Vioque, J. (2012). Iron-Chelating Activity of Chickpea Protein Hydrolysate Peptides. *Food Chemistry*, 134(3), 1585-1588.
- Ueno, H. M., Shiota, M., Ueda, N., Isogai, T., & Kobayashi, T. (2012). Iron-Lactoferrin Complex Reduces Iron-Catalyzed Off-Flavor Formation in Powdered Milk with Added Fish Oil. *Journal of Food Science*, 77(8), C853-858.
- Ueno, H. M., Urazono, H., & Kobayashi, T. (2014). Serum Albumin Forms a Lactoferrin-Like Soluble Iron-Binding Complex in Presence of Hydrogen Carbonate Ions. *Food Chemistry*, 145(0), 90-94.
- Waraho, T., Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M. T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2009). Prooxidant Mechanisms of Free Fatty Acids in Stripped Soybean Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 7112-7117.

- WHO. (2015). The Global Prevalence of Anaemia in 2011. In World Health Organization (Ed.). Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Zhou, J., Wang, X., Ai, T., Cheng, X., Guo, H. Y., Teng, G. X., & Mao, X. Y. (2012). Preparation and Characterization of B-Lactoglobulin Hydrolysate-Iron Complexes. *Journal of Dairy Science*, 95(8), 4230-4236.

3. Discussão geral

A anemia por deficiência de ferro é um dos principais problemas nutricionais no mundo e, nos últimos anos, alternativas para fortificar alimentos com ferro têm sido estudadas, especialmente em uma forma mais biodisponível e menos reativa que as formas tradicionais. No presente trabalho, complexos peptídeo-Fe foram sintetizados e caracterizados e duas principais hipóteses do efeito da complexação do ferro foram estudadas: aumento de sua biodisponibilidade *in vitro* e redução de seu efeito pró-oxidante.

Para a síntese dos complexos, foram utilizadas duas fontes de ferro, FeCl_2 e FeSO_4 . Como ligantes, foram utilizados peptídeos derivados da hidrólise das proteínas do soro de leite, além da proteína íntegra (**WPI**). Os peptídeos foram obtidos por hidrólise do WPI com pancreatina. A pancreatina é um sistema enzimático constituído de diferentes enzimas com ação de endopeptidases (quimotripsina, tripsina, elastase e colagenase) e exopeptidases (carboxipeptidases A e B) (Yamamoto, 1975), resultando em hidrolisado com perfil variado de fragmentos. O perfil de clivagem desse sistema enzimático resultou em maioria de fragmentos de MM < 5 kDa, que foram separados por membrana de ultrafiltração e constituem a fração denominada filtrado (**F**). Após ultrafiltração do hidrolisado (**H**), 83,4% do material proteico encontraram-se no filtrado (**F**), enquanto 16,6% constituíram a fração retentado (**R**). Apesar de apresentarem perfis de MM e hidrofiliidade distintos, observamos, em trabalho anterior, que ambas as frações apresentam fragmentos com capacidade de ligação ao ferro provenientes das mesmas sequências ($^{42}\text{YVEELKPTPEGDLEIL}^{57}$ e $^{124}\text{RTPEVDDEALEK}^{135}$ da β -Lg e $^{82}\text{DDDLTDDI}^{89}$ da α -La), todos ricos em Asp (D) e Glu (E), principais sítios de ligação ao ferro (Chaud *et al.*, 2002; Lv *et al.*, 2009).

Nos complexos formados, independente do ligante (**H**, **F**, **R** ou **WPI**), a coordenação do ferro ocorreu principalmente por grupos carboxílicos de modo bidentado, evidenciada pela presença de bandas em IR referentes a dois modos vibracionais: estiramento assimétrico e simétrico da ligação COO-Fe . A formação dessa estrutura em anel, possivelmente, é responsável pela proteção do ferro ao longo do trato gastrointestinal, uma vez que a bioacessibilidade do ferro, representada pela solubilidade do mineral após digestão *in vitro*, foi superior a 85% para todos os complexos. No entanto, nossos resultados mostraram que a bioacessibilidade não prediz a biodisponibilidade do ferro, uma vez que a permeação do mineral em células Caco-2 diferiu significativamente entre os ligantes. Complexos sintetizados com peptídeos de menor MM resultaram em maior síntese de ferritina, enquanto complexos com peptídeos de maior MM ou proteína íntegra apresentaram redução significativa em relação à forma livre do mineral. Portanto, a formação de um complexo estável

à digestão gastrointestinal e que favoreça a solubilidade do ferro não resulta necessariamente em maior entrada de ferro nos enterócitos.

A MM e estrutura desses complexos parecem influenciar a captação do mineral pelas células intestinais. Alguns estudos apontam a complexação com proteína íntegra como uma alternativa para elevar sua biodisponibilidade (Sugiarto *et al.*, 2010; Ueno *et al.*, 2014). Por outro lado, peptídeos de cadeia curta são mais estáveis e mais fáceis de serem absorvidos pelas células intestinais (Eckert *et al.*, 2016), o que está de acordo com nossos resultados. Esses fatos sugerem que a absorção do ferro está relacionada não só à capacidade dos ligantes de protegê-lo durante a digestão e possibilitarem sua chegada ao enterócito, mas também, de alguma forma, ao mecanismo convencional de absorção do ligante.

A captação de ferro na forma de sal ocorre pelo mecanismo DMT-1, proteína transportadora de metal divalente situada na borda em escova do enterócito, cuja expressão de mRNA correspondente é fortemente induzida na deficiência de ferro (Gunshin *et al.*, 1997; Anderson e Frazer, 2005). Embora o nível de transportadores não tenha sido avaliado nesse estudo, possivelmente a expressão de DMT-1 tenha sido elevada em função das condições de deficiência de ferro nas quais as células foram cultivadas (Viadel *et al.*, 2007), podendo favorecer a captação de ferro na forma inorgânica. No caso do ferro proveniente dos complexos peptídeo-Fe, apenas a fração de ferro eventualmente liberada do complexo poderia ser afetada pela elevada expressão de DMT-1. Argyri *et al.* (2009) observaram que peptídeos de leite aumentaram a absorção de ferro em células Caco-2, mas não afetaram a expressão de DMT-1. Com base no conjunto dos resultados, sugerimos que a permeação do ferro em células Caco-2 em sua forma complexada está relacionada ao mecanismo convencional de absorção dos peptídeos que o coordenam, como absorção mediada por transportador (PepT1) para di- e tripeptídeos, transcitose (sistema de transporte mediado por vesícula intracelular) para oligopeptídeos ou difusão passiva paracelular para oligo e di-/tripeptídeos (Wada & Lönnerdal, 2014).

Conforme exposto acima, o ferro pode permear a membrana dos enterócitos seja pelo mecanismo DMT-1 ou por um dos mecanismos de absorção dos peptídeos. Uma vez dentro da célula, o mineral está disponível para ser transportado para a corrente sanguínea e utilizado em processos metabólicos ou ser armazenado, sendo, portanto, estimado como ferro biodisponível. O modelo de digestão gastrointestinal *in vitro* associada ao ensaio de captação em células intestinais é muito útil para o estudo da biodisponibilidade *in vitro* do ferro, a qual é representada pela captação de ferro em células Caco-2 (Quintaes *et al.*, 2017). Nesse estudo, a síntese de ferritina em células Caco-2 foi utilizada como medida indireta da biodisponibilidade *in vitro* do ferro (Viadel *et al.*, 2007; Cilla *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009;

García-Nebot *et al.*, 2010; García-Nebor *et al.*, 2013; Lv *et al.*, 2014; Flores *et al.*, 2015; Rodriguez-Ramiro *et al.*, 2017), considerando que esse parâmetro está diretamente relacionado à entrada de ferro na célula intestinal (Glahn *et al.*, 1998). Os resultados não podem ser extrapolados para biodisponibilidade *in vivo*, na qual a absorção envolve o transporte do ferro até a corrente sanguínea, quando necessária sua utilização para desempenhar sua função. No entanto, a comparação da capacidade do ferro livre e complexado de permear as células intestinais e promover a síntese de ferritina indica o potencial desses complexos para elevar a absorção do ferro *in vivo*. Futuros estudos poderão confirmar se a diferença na permeação de ferro livre ou complexado em células Caco-2 também é observada quando avaliado o transporte do mineral e sua utilização.

Complexos com hidrolisado (**H**) resultaram em valores de síntese de ferritina intermediários entre complexos com filtrado (**F**) e retentado (**R**), o que poderia ser esperado uma vez que se trata de uma mistura das duas frações. Porém, esses valores não refletiram as proporções de peptídeos de MM maior e menor que 5 kDa (**R** e **F**, respectivamente) no hidrolisado, o que sugere que mais fatores possam estar envolvidos na absorção de ferro. A presença de peptídeos maiores pode interferir na absorção dos complexos **Fe-H C** e **Fe-H S**, em virtude de uma possível sinergia entre ligantes de diferentes MM.

Em adição ao tipo de ligante, a fonte de ferro utilizada para a síntese dos complexos influenciou a permeação do mineral em células Caco-2. Isso pode estar relacionado à diferença de estrutura dos complexos, constatada por espectroscopia de infravermelho e análise térmica. Os contra-íons cloreto e sulfato parecem exercer papel chave na exposição de sítios de ligação de ferro e estrutura do complexo formado, resultando em diferente comportamento biológico. O favorecimento de agregação exercido pelos contra-íons sulfato (Zhang e Cremer, 2006) pode ter comprometido a permeação do complexo **Fe-F S**. Já no complexo **Fe-F C**, a influência do contra-íon cloreto, possivelmente em virtude da diferença de conformação dos complexos sintetizados com FeCl_2 , como a presença de α -hélice hidratada, pode ter favorecido sua permeação. Considerando a absorção de ferro ainda complexado pela via convencional de absorção de peptídeos, a conformação dos complexos pode interferir na sua aproximação ao enterócito e entrada na célula.

Além do impacto na biodisponibilidade *in vitro*, a complexação peptídeo-Fe também influenciou o efeito do ferro na oxidação lipídica em sistema modelo. A extensão de formação tanto de produtos primários quanto secundários da oxidação lipídica foi drasticamente reduzida quando o ferro estava na forma complexada em relação à forma livre. Os compostos voláteis formados em maior extensão em emulsões contendo complexos peptídeo-Fe foram aldeídos e álcoois formados a partir da degradação dos ácidos graxos n-3

e n-6 (Choe e Min, 2006; Souza e Bragagnolo, 2014), mais susceptíveis à oxidação. A oxidação dos ácidos graxos oleico, linoleico e linolênico ocorre na proporção de 1:12:25, respectivamente, devido à energia necessária para a abstração do átomo de hidrogênio (Min e Boff, 2002). A formação de compostos nas emulsões contendo o ferro na forma livre, incluindo aqueles formados a partir de ácidos graxos monoinsaturados n-9, ocorreu em maior extensão, sugerindo maior disponibilidade de íons ferro para catalisar a oxidação lipídica.

Emulsões adicionadas de sal de ferro e peptídeos apresentaram oxidação em menor extensão do que emulsões contendo apenas o sal de ferro, possivelmente devido à ação antioxidante dos peptídeos, que agem por neutralização de espécies reativas e/ou radicais lipídicos (Samaranayaka e Li-Chan, 2011). Os resultados para emulsão contendo apenas peptídeos corroboram essa hipótese, uma vez que a formação de hexanal foi cerca de 60% inferior à emulsão controle (sem adição de outro componente) após 7 dias de armazenamento. Resíduos de valina e leucina, presentes nos peptídeos com capacidade quelante da fração filtrado (Caetano-Silva *et al.*, 2015), podem ter contribuído para a localização dos peptídeos na interface água-lipídeo, favorecendo o acesso aos radicais livres formados na fase lipídica (Ranathunga *et al.*, 2006). No entanto, simultaneamente à neutralização de espécies reativas e/ou radicais lipídicos, outra via de ação pode ocorrer: a ação antioxidante indireta exercida pela complexação que impede o ferro de catalisar a oxidação lipídica.

O efeito pró-oxidante do ferro foi avaliado em emulsão como sistema modelo, assim como em outros estudos (Hu *et al.*, 2004; Sugiarto *et al.*, 2010; Guzun-Cojocar *et al.*, 2011; Ueno *et al.*, 2014). Embora não seja possível extrapolar para a incorporação desses complexos em matrizes alimentícias, os resultados sugerem que a ligação coordenada envolvida na formação desses complexos favorece que o ferro não catalise a oxidação lipídica, ainda que em um meio rico em substratos para a sua reatividade. Estudos futuros, que incluam a avaliação da estabilidade oxidativa ao longo de toda a vida de prateleira, poderão avaliar se esse comportamento em sistema modelo de fato é preditivo de uma redução de alterações sensoriais indesejáveis.

Os resultados dos ensaios *in vitro* sugerem que a permeação do ferro em células Caco-2 está relacionada também ao mecanismo de absorção convencional do ligante, sugerindo que o ferro permanece ligado aos peptídeos após digestão gastrointestinal. Assim, o comportamento observado em ensaio de oxidação lipídica pode ser preditivo para o comportamento biológico desse complexo, que pode também apresentar o potencial de redução de danos às membranas celulares, bem como dos efeitos colaterais no organismo.

De forma geral, nossa hipótese é que o ferro continua complexado ao longo do trato gastrointestinal, permanecendo solúvel (bioacessibilidade do mineral complexado > 85%) e, dessa forma, sendo impedido de reagir com outros compostos. Ao chegar próximo ao enterócito, o ferro é então captado e passa a integrar o *pool* de íons de ferro inorgânico no interior da célula. A via de utilização do ferro pelo organismo pode seguir a mesma do ferro livre captado pelas células intestinais.

O presente trabalho visou o estudo de complexos peptídeo-Fe que potencialmente possam ser aplicados para fortificar produtos alimentícios com ferro e contribuir para a redução da prevalência de anemia. Devido à maior absorção de ferro na forma complexada, a fortificação de produtos com esses complexos será requerida em menores níveis, com efeito equivalente ou superior se comparado aos sais inorgânicos de ferro (Gerber, 2011), como o sulfato ferroso. Além disso, as alterações sensoriais em produtos fortificados, resultado da ação do ferro como catalisador da oxidação lipídica, tendem a ser reduzidas se empregados complexos peptídeo-Fe.

4. Conclusão

Peptídeos oriundos da hidrólise da proteína de soro de leite bem como a proteína íntegra apresentaram capacidade de atuar como ligantes na formação de complexos com o ferro, mostrando que a complexação não depende da MM dos ligantes. No entanto, o complexo sintetizado com peptídeos de baixa MM (< 5 kDa) apresentou maior permeação do mineral em células Caco-2 e redução do efeito pró-oxidante do ferro em sistema modelo, em relação ao sulfato ferroso, largamente empregado para fortificação. Além disso, a solubilidade do ferro complexado foi superior a 85% em ampla faixa de pH, o que pode facilitar a incorporação desse composto em diferentes matrizes alimentares.

Os complexos peptídeo-Fe apresentaram ligações coordenadas principalmente de modo bidentado com grupos carboxílicos, independente do ligante. A estrutura em anel formada com o metal pode ter favorecido a estabilidade dos complexos à digestão gastrointestinal *in vitro* e alta bioacessibilidade do ferro. No entanto, a permeação de ferro em células Caco-2 foi diferente para complexos com ligantes de diferentes MM, o que sugere que o mecanismo de absorção do ferro complexado está relacionado ao mecanismo de absorção convencional dos peptídeos que atuam como ligante. A utilização de diferentes fontes de ferro, FeSO₄ ou FeCl₂, resultou em complexos com diferentes estruturas, o que pode ter contribuído para diferenças na permeação do mineral. As hipóteses desse trabalho, de que a complexação do ferro promove o aumento de sua biodisponibilidade *in vitro* e a redução de seu efeito pró-oxidante, foram confirmadas pelos resultados obtidos para complexos peptídeo-Fe sintetizados com peptídeos de baixa MM (< 5 kDa) e FeCl₂. No entanto, a incorporação desse complexo em uma matriz pode interferir na absorção do mineral, bem como em sua capacidade de catalisar a oxidação lipídica.

A principal aplicação desses complexos peptídeo-Fe é para fortificação direcionada, ou seja, em produtos destinados às pessoas com deficiência de ferro. Além de oferecer ferro menos reativo e mais biodisponível, disponibiliza-se importante aporte de peptídeos de elevada digestibilidade, rápida absorção pelo organismo e oriundos de proteína de alto valor biológico (Sgarbieri, 2004). Desse modo, pessoas que necessitam de ambos os nutrientes podem ser beneficiadas. Um exemplo são os pacientes pós-cirurgia bariátrica, os quais podem apresentar, além da comum deficiência de ferro, problemas associados à má absorção de proteína (Fujioka, 2005; Rashti *et al.*, 2015). A administração de proteína já hidrolisada e complexada com ferro parece ser uma alternativa viável para reduzir ambas as deficiências. Assim, futuros estudos utilizando-se o complexo peptídeo-Fe sintetizado com

peptídeos de baixa MM e FeCl_2 em matriz alimentícia podem contribuir para sua aplicação na indústria de alimentos.

5. Referências

- ADAMS, P. D. et al. Intramolecular quenching of tryptophan fluorescence by the peptide bond in cyclic hexapeptides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 31, p. 9278-9286, 2002.
- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- AGYARE, K. K.; DAMODARAN, S. pH-stability and thermal properties of microbial transglutaminase-treated whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 1946-1953, 2010.
- AL-JOWDER, O. et al. Mid-infrared spectroscopy and chemometrics for the authentication of meat products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 8, p. 3210-3218, 1999.
- ANDERSON, G.; FRAZER, D. Recent advances in intestinal iron transport. **Current Gastroenterology Reports**, v. 7, n. 5, p. 365-372, 2005.
- ANDERSON, G. J.; VULPE, C. D. Mammalian iron transport. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 20, p. 3241-61, 2009.
- AOAC. **Official methods of analysis of the AOAC international**. In: (Ed.). 18th. Gaithersburg: AOAC, 2006.
- AOCS. **Official methods and recommended practices of AOCS**. In: SOCIETY, A. O. C. (Ed.). 5th. Champaign, 1997.
- ARGYRI, K. et al. Peptides isolated from in vitro digests of milk enhance iron uptake by Caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 25, p. 10221-10225, 2007.
- ARGYRI, K. et al. Milk peptides increase iron dialyzability in water but do not affect DMT-1 expression in Caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1538-43, 2009.
- ARGYRI, K. et al. Iron or zinc dialyzability obtained from a modified in vitro digestion procedure compare well with iron or zinc absorption from meals. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 716-721, 2011.
- ARTURSSON, P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, n. 6, p. 476-82, 1990.
- ASHMEAD, S. D. The chemistry of ferrous bis-glycinate chelate. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 51, n. 1 Suppl 1, p. 7-12, 2001.
- BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 301-312, 2000.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, 2007.

- BECKER, H. Measuring iron bioavailability. **Agricultural Research**, v. 47, n. 8, p. 4-6, 1999.
- BELL, C. F. **Principles and applications of metal chelation**. Oxford: Clarendon Press, 1977. VIII, 147 p.
- BENESTY, J. et al. Pearson correlation coefficient. In: (Ed.). **Noise reduction in speech processing**: Springer, 2009. p.1-4.
- BENITO, P.; MILLER, D. Iron absorption and bioavailability: An updated review. **Nutrition Research**, v. 18, n. 3, p. 581-603, 1998.
- BENZIE, I. F. Lipid peroxidation: A review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 233-61, 1996.
- BEROVA, N. et al. **Comprehensive chiroptical spectroscopy, applications in stereochemical analysis of synthetic compounds, natural products, and biomolecules**. 2 ed. John Wiley & Sons, 2012.
- BOEN, T. R. et al. Folic acid and iron evaluation in brazilian enriched corn and wheat flours. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 53-59, 2008.
- BOIRIE, Y. et al. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 26, p. 14930-5, 1997.
- BOTHWELL, T. H.; MACPHAIL, A. P. The potential role of NaFeEDTA as an iron fortificant. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 74, n. 6, p. 421-34, 2004.
- BOVELL-BENJAMIN, A. C.; VITERI, F. E.; ALLEN, L. H. Iron absorption from ferrous bisglycinate and ferric trisglycinate in whole maize is regulated by iron status. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 6, p. 1563-9, 2000.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, v. 73, p. 149-161, 2015.
- BRASIL. Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. **Portaria n.º 31, de 13 de janeiro de 1998**. Aprova o regulamento técnico referente a alimentos adicionados de nutrientes essenciais, 1998.
- _____. Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. **Resolução rdc nº 344, de 13 de dezembro de 2002**. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico, 2007.
- _____. Ministério da saúde. Secretaria de atenção à saúde. **Programa nacional de suplementação de ferro**: Manual de condutas gerais. Brasília, 2013.
- BRISKE-ANDERSON, M. J.; FINLEY, J. W.; NEWMAN, S. M. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of caco-2 cells. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 214, n. 3, p. 248-57, 1997.

- CAETANO-SILVA, M. E. et al. Iron-binding peptides from whey protein hydrolysates: Evaluation, isolation and sequencing by LC–MS/MS. **Food Research International**, v. 71, p. 132-139, 2015.
- CAETANO-SILVA, M. E. et al. Evaluation of in vitro iron bioavailability in free form and as whey peptide-iron complexes. **Journal of Food Composition and Analysis**, DOI: 10.1016/j.jfca.2017.03.010, 2017.
- CARLTON JR, D. D.; SCHUG, K. A. A review on the interrogation of peptide–metal interactions using electrospray ionization-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 686, n. 1–2, p. 19-39, 2011.
- CARRASCO-CASTILLA, J. et al. Antioxidant and metal chelating activities of *Phaseolus vulgaris* L. Var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1157-1164, 2012.
- CAYOT, P.; GUZUN-COJOCARU, T.; CAYOT, N. Iron fortification of milk and dairy products. In: PREEDY, V. R.; SRIRAJASKANTHAN, R., et al (Ed.). **Handbook of food fortification and health: From concepts to public health applications**. Volume 1. New York, NY: Springer New York, 2013. p.75-89.
- CHAUD, M. V. et al. Iron derivatives from casein hydrolysates as a potential source in the treatment of iron deficiency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 871-877, 2002.
- CHENG, Z.; LI, Y. What is responsible for the initiating chemistry of iron-mediated lipid peroxidation: An update. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 3, p. 748-766, 2007.
- CHO, Y. J. et al. Ability of chelators to alter the physical location and prooxidant activity of iron in oil-in-water emulsions. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 6, p. 1952-1957, 2003.
- CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, n. 4, p. 169-186, 2006.
- CHRISTIDES, T. et al. Iron bioavailability from commercially available iron supplements. **European Journal of Nutrition**, v. 54, n. 8, p. 1345-52, 2015.
- CILLA, A. et al. Iron bioavailability in fortified fruit beverages using ferritin synthesis by Caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8699-703, 2008.
- CLAEYS, E. et al. Quantification of fresh meat peptides by SDS–PAGE in relation to ageing time and taste intensity. **Meat Science**, v. 67, n. 2, p. 281-288, 2004.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Codex Standard for Named Vegetable Oils** (CODEX-STAN 210 - 1999). Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/004/y2774e/y2774e04.htm>> Acesso em: 12 mai. 2017.
- COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. **Introduction to infrared and raman spectroscopy**. 3rd. United States: Academic Press, 1990. 547 p.
- CONRAD, M. E.; UMBREIT, J. N.; MOORE, E. G. Iron absorption and transport. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 318, n. 4, p. 213, 1999.
- COOK, J. D.; REUSSER, M. E. Iron fortification: An update. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 38, n. 4, p. 648-59, 1983.

- COUPLAND, J. N.; MCCLEMENTS, D. J. Lipid oxidation in food emulsions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 3, p. 83-91, 1996.
- COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de minerais. **Revista de Nutrição**, v. 10, p. 87-98, 1997.
- COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2 Ed. Barueri, SP: Manole, 2007.
- DALLMAN, P. R. Iron deficiency: Does it matter? **Journal of Internal Medicine**, v. 226, n. 5, p. 367-372, 1989.
- DANDURAND, J. et al. Conformational and thermal characterization of a synthetic peptidic fragment inspired from human tropoelastin: Signature of the amyloid fibers. **Pathologie Biologie (Paris)**, v. 62, n. 2, p. 100-7, 2014.
- DARY, O.; FREIRE, W.; KIM, S. Iron compounds for food fortification: Guidelines for Latin America and the Caribbean 2002. **Nutrition Reviews**, v. 60, p. S50-S61, 2002.
- DAVIS, P. A. et al. Comparative effects of various dietary levels of Se as sodium selenite or Se yeast on blood, wool, and tissue Se concentrations of wether sheep. **Small Ruminant Research**, v. 74, n. 1-3, p. 149-158, 2008.
- DE LA HOZ, L. et al. Iron-binding properties of sugar cane yeast peptides. **Food Chemistry**, v. 142, n. 0, p. 166-169, 2014.
- DE LIMA, A. C. S. et al. In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 161, n. 0, p. 142-147, 2014.
- DEMETRIADES, K.; COUPLAND, J. N.; MCCLEMENTS, D. J. Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 2, p. 342-347, 1997.
- DEWAYNE ASHMEAD, H. The absorption and metabolism of iron amino acid chelate. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 51, p. 13-21, 2001.
- DI MATTIA, C. D. et al. Surface properties of phenolic compounds and their influence on the dispersion degree and oxidative stability of olive oil O/W emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 6-7, p. 652-658, 2010.
- DÍAZ, M. et al. Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2365-2370, 2003.
- DOBARGANES, M. C.; VELASCO, J. Analysis of lipid hydroperoxides. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, n. 7, p. 420-428, 2002.
- DOS SANTOS, Q. et al. An evaluation of the effectiveness of the flour iron fortification programme in Brazil. **Public Health Nutrition**, v. 18, n. 9, p. 1670, 2015.
- ECKERT, E.; BAMDAD, F.; CHEN, L. Metal solubility enhancing peptides derived from barley protein. **Food Chemistry**, v. 159, n. 0, p. 498-506, 2014.
- ECKERT, E. et al. Biophysical and in vitro absorption studies of iron chelating peptide from barley proteins. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 291-301, 2016.

- EFTINK, M. R. Fluorescence techniques for studying protein structure. In: (Ed.). **Methods of biochemical analysis**: John Wiley & Sons, Inc., 2006. p.127-205.
- EKMEKCIOGLU, C. A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. **Food Chemistry**, v. 76, n. 2, p. 225-230, 2002.
- ELIAS, R. J. et al. Antioxidant mechanisms of enzymatic hydrolysates of beta-lactoglobulin in food lipid dispersions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 25, p. 9565-72, 2006.
- ELIAS, R. J.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase beta-lactoglobulin in oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 26, p. 10248-53, 2005.
- ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991.
- ETCHEVERRY, P.; MILLER, D. D.; GLAHN, R. P. A low-molecular-weight factor in human milk whey promotes iron uptake by Caco-2 cells. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 1, p. 93-98, 2004.
- ETHCEVERRY, P.; GRUSAK, M. A.; FLEIGE, L. E. Application of *in vitro* bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B₆, B₁₂, D, and E. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 317, 2012.
- FAA, G.; CRISPONI, G. Iron chelating agents in clinical practice. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 184, n. 1, p. 291-310, 1999.
- FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; TEUCHER, B. Iron and calcium bioavailability of fortified foods and dietary supplements. **Nutrition Reviews**, v. 60, n. 11, p. 360-367, 2002.
- FAIRWEATHER, T. et al. The use of solubility, dialyzability, and Caco-2 cell methods to predict iron bioavailability. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 77, n. 3, p. 158-165, 2007.
- FAO/WHO. **Report of a joint FAO/WHO expert consultation on protein quality evaluation**. Maryland, USA: Food and Agriculture Organization / World Health Organization 1990.
- _____. **Assessing the iron status of populations**. World Health Organization, Centers for Disease Control and Prevention. Geneva, Switzerland: Food and Agriculture Organization / World Health Organization: 108 p. 2007.
- FARAJI, H.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4558-64, 2004.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, n. 11, p. 751-760, 2009.

- FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 345-353, 1997.
- FIDLER, M. C. et al. A micronised, dispersible ferric pyrophosphate with high relative bioavailability in man. **British Journal of Nutrition**, v. 91, n. 01, p. 107-112, 2004.
- FINCH, C. Regulators of iron balance in humans. **Blood**, v. 84, n. 6, p. 1697-702, 1994.
- FLORES, S. R. L.; DOBBS, J.; DUNN, M. A. Mineral nutrient content and iron bioavailability in common and Hawaiian seaweeds assessed by an *in vitro* digestion/Caco-2 cell model. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 43, p. 185-193, 2015.
- FOMON, S. J. **Nutrition of normal infants**. St. Louis, EUA: Mosby-Year Book, Inc., 1993.
- FOX, T. E.; EAGLES, J.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Bioavailability of iron glycine as a fortificant in infant foods. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 4, p. 664-8, 1998.
- FRANKEL, E. N. Lipid oxidation. **Progress in Lipid Research**, v. 19, n. 1-2, p. 1-22, 1980.
- _____. Volatile lipid oxidation products. **Progress in Lipid Research**, v. 22, n. 1, p. 1-33, 1983.
- _____. Review. Recent advances in lipid oxidation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 54, n. 4, p. 495-511, 1991.
- _____. Formation of headspace volatiles by thermal decomposition of oxidized fish oils vs. oxidized vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 8, p. 767-772, 1993.
- FRANZAN, R. **Preparação e caracterização físico-química de complexos de hidrolisados parciais de proteína com minerais** 2006. 50f dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.
- FRAZER, D. M.; ANDERSON, G. J. The regulation of iron transport. **BioFactors**, v. 40, n. 2, p. 206-214, 2014.
- FRAZER, D. M. et al. Hpcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. **Gastroenterology**, v. 123, n. 3, p. 835-844, 2002.
- FUJIOKA, K. Follow-up of nutritional and metabolic problems after bariatric surgery. **Diabetes Care**, v. 28, n. 2, p. 481-484, 2005.
- FUQUA, B. K.; VULPE, C. D.; ANDERSON, G. J. Intestinal iron absorption. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 26, n. 2-3, p. 115-119, 2012.
- GALLAGHER, P. K.; JOHNSON, D. W.; SCHREY, F. Thermal decomposition of iron(II) sulfates. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 53, n. 12, p. 666-670, 1970.
- GAN, L.-S. L.; THAKKER, D. R. Applications of the Caco-2 model in the design and development of orally active drugs: Elucidation of biochemical and physical barriers posed by the intestinal epithelium. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 77-98, 1997.

- GARCÍA-CASAL, M. N. Planning and implementing food fortification programs to combat micronutrient malnutrition: iron. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 880-888, 2014.
- GARCÍA-NEBOT, M. J.; BARBERÁ, R.; ALEGRÍA, A. Iron and zinc bioavailability in Caco-2 cells: Influence of caseinophosphopeptides. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1298-1303, 2013.
- GARCÍA-NEBOT, M. J. et al. Effect of caseinophosphopeptides added to fruit beverages upon ferritin synthesis in Caco-2 cells. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 92-97, 2010.
- GERBER, J. A review of mineral absorption with special consideration of chelation as a method to improve bioavailability of mineral supplements. 2011. Disponível em: <http://www.integrativepractitioner.com/article_ektid6418.aspx> Acesso em: 06 jan. 2017.
- GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica—parte II. **Cerâmica**, v. 34, n. 225, p. 163-164, 1988.
- GLAHN, R. P. et al. Decreased citrate improves iron availability from infant formula: Application of an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 2, p. 257-264, 1998.
- GLAHN, R. P. et al. Caco-2 cell ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 9, p. 1555-1561, 1998.
- GLAHN, R. P. et al. 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**, v. 126, n. 1, p. 332-339, 1996.
- GLIGIC, L.; PALIC, T.; NIKOLOVSKI, J. The beneficial effects of iron-enriched yeast *saccharomyces cerevisiae* biomass in poultry breeding. **Folia Veterinaria**, v. 48, n. 2, p. 104-107, 2004.
- GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; RIZZELLO, C. G. Angiotensin i-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2-3, p. 173-188, 2004.
- GOMES, A. et al. Role of the phases composition on the incorporation of gallic acid in O/W and W/O emulsions. **Journal of Food Engineering**, v. 168, p. 205-214, 2016.
- GRANATO, D.; DE ARAÚJO CALADO, V. M.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in food science and technology. **Food Research International**, v. 55, p. 137-149, 2014.
- GROTTO, D. et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Química Nova**, v. 32, p. 169-174, 2009.
- GROTTO, D. et al. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo: Malondialdeído. **Química Nova**, v. 31, p. 275-279, 2008.
- GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: Uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, p. 390-397, 2008.

- GULEC, S.; ANDERSON, G. J.; COLLINS, J. F. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 307, n. 4, p. G397-409, 2014.
- GUNSHIN, H. et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. **Nature**, v. 388, n. 6641, p. 482-488, 1997.
- GUO, L. et al. Food protein-derived chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement. **Trends in Food Science & Technology**, v. 37, n. 2, p. 92-105, 2014.
- GUO, L. et al. Preparation, isolation and identification of iron-chelating peptides derived from alaska pollock skin. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5-6, p. 988-993, 2013.
- GUTTERIDGE, J. M. Free-radical damage to lipids, amino acids, carbohydrates and nucleic acids determined by thiobarbituric acid reactivity. **International Journal of Biochemistry**, v. 14, n. 7, p. 649-53, 1982.
- GUZUN-COJOCARU, T. et al. Oxidative stability of oil-in-water emulsions containing iron chelates: Transfer of iron from chelates to milk proteins at interface. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 326-333, 2011.
- HAAS, J. D.; BROWNLIE, T. T. Iron deficiency and reduced work capacity: A critical review of the research to determine a causal relationship. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 2s-2, p. 676S-688S; discussion 688S-690S, 2001.
- HABEYCH, E. et al. Strategies to limit colour changes when fortifying food products with iron. **Food Research International**, v. 88, Part A, p. 122-128, 2016.
- HAINES, P. J. **Thermal methods of analysis: Principles, applications and problems**. 1st. Springer-Science Business Media, B. V., 1995.
- HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: Some new concepts. **FASEB Journal**, v. 1, n. 5, p. 358-64, 1987.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4th. United States: Oxford University Press Inc. , 2007. 851 p.
- HARIS, P. I.; CHAPMAN, D. The conformational analysis of peptides using fourier transform IR spectroscopy. **Biopolymers**, v. 37, n. 4, p. 251-263, 1995.
- HEGENAUER, J.; SALTMAN, P.; LUDWIG, D. Effects of supplemental iron and copper on lipid oxidation in milk. 2. Comparison of metal complexes in heated and pasteurized milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, n. 4, p. 868-871, 1979.
- HEKMAT, S.; MCMAHON, D. J. Distribution of iron between caseins and whey proteins in acidified milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 31, n. 7-8, p. 632-638, 1998.
- HU, M.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Impact of chelators on the oxidative stability of whey protein isolate-stabilized oil-in-water emulsions containing x-3 fatty acids. **Food Chemistry**, v. 88, p. 57-62, 2004.
- HUANG, G.; REN, Z.; JIANG, J. Separation of iron-binding peptides from shrimp processing by-products hydrolysates. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1527-1532, 2011.

- HUANG, G. R.; REN, Z. Y.; JIANG, J. X. Optimization of hydrolysis conditions for iron binding peptides production from shrimp processing byproducts. **American Journal of Food Technology**, v. 9, p. 49-55, 2014.
- HUR, S. J. et al. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 1-12, 2011.
- HURRELL, R. How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food. **Nutrition Reviews**, v. 60, n. 7 Pt 2, p. S7-15; discussion S43, 2002.
- HURRELL, R. F. Fortification: Overcoming technical and practical barriers. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 4, p. 806S-812S, 2002.
- HURRELL, R. F. et al. Enhancing the absorption of fortification iron. A sustain task force report. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 74, n. 6, p. 387-401, 2004.
- HURRELL, R. et al. 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**, v. 31, n. 1, 2010.
- IANOUL, A.; BOYDEN, M. N.; ASHER, S. A. Dependence of the peptide amide III vibration on the ϕ dihedral angle. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 30, p. 7433-7434, 2001.
- IONASHIRO, M.; CAIRES, F.; GOMES, D. Giolito: Fundamentos da termogravimetria e análise térmica diferencial/calorimetria exploratória diferencial. **São Paulo: Giz**, v. 1, p. 80, 2005.
- KAMAL-ELDIN, A.; POKORN, J. Lipid oxidation products and methods used for their analysis. In: (Ed.). **Analysis of lipid oxidation**: AOCS Publishing, 2005.
- KAMAL-ELDIN, A.; YANISHLIEVA, N. Kinetic analysis of lipid oxidation data. In: (Ed.). **Analysis of lipid oxidation**: AOCS Publishing, 2005.
- KAZMIERSKI, M.; CORREDIG, M. Characterization of soluble aggregates from whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 5, p. 685-692, 2003.
- KELLERBY, S. S.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Role of proteins in oil-in-water emulsions on the stability of lipid hydroperoxides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7879-7884, 2006.
- KIM, N.-H. et al. Purification of an iron-chelating peptide from spirulina protein hydrolysates. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 91-95, 2014.
- KIM, S. B.; LIM, J. W. Calcium-binding peptides derived from tryptic hydrolysates of cheese whey protein. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 17, n. 10, p. 1459-1464, 2004.
- KIM, S. B. et al. Enzymatic hydrolysis of heated whey: Iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4033-4042, 2007.
- KIM, S. B. et al. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 6, p. 625-631, 2007.

- KIM, S. H.; KINSELLA, J. E. Effects of reduction with dithiothreitol on some molecular properties of soy glycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, n. 4, p. 623-627, 1986.
- KRATZER, F. H.; VOHRA, P. **Chelates in nutrition**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1986.
- KRIMM, S.; BANDEKAR, J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. In: ANFINSEN, C. B.; EDSALL, J. T., *et al* (Ed.). **Advances in protein chemistry**: Academic Press, v. Volume 38, 1986. p.181-364.
- KRISHNAMURTHY, P.; XIE, T.; SCHUETZ, J. D. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 114, n. 3, p. 345-358, 2007.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Springer, 2006.
- LAYRISSE, M. *et al*. Iron bioavailability in humans from breakfasts enriched with iron bis-glycine chelate, phytates and polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 9, p. 2195-2199, 2000.
- LAZARTE, C. E. *et al*. Phytate, zinc, iron and calcium content of common bolivian food, and implications for mineral bioavailability. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 39, p. 111-119, 2015.
- LEA, T. Caco-2 cell line. In: VERHOECKX, K.; COTTER, P., *et al* (Ed.). **The impact of food bioactives on health: In vitro and ex vivo models**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p.103-111.
- _____. Epithelial cell models; general introduction. In: VERHOECKX, K.; COTTER, P., *et al* (Ed.). **The impact of food bioactives on health: In vitro and ex vivo models**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p.95-102.
- LEE, S.-H.; SONG, K. B. Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 378-381, 2009.
- LIEU, P. T. *et al*. The roles of iron in health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, n. 1-2, p. 1-87, 2001.
- LIH-BRODY, L. *et al*. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 41, n. 10, p. 2078-2086, 1996.
- LIMA, E.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: Mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.
- LIN, F. Y.; CHEN, W. Y.; HUANG, S. Y. Selective separation of caseinophosphopeptides through immobilized metal ion affinity chromatography: Effects of pH values, salt concentrations and degree of phosphorylation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 23, n. 5, p. 467-471, 2000.
- LIU, F.-R. *et al*. Calcium-binding capacity of wheat germ protein hydrolysate and characterization of peptide-calcium complex. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 31, p. 7537-7544, 2013.

- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- LUND, M.; ARDÖ, Y. Purification and identification of water-soluble phosphopeptides from cheese using Fe(III) affinity chromatography and mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6616-6622, 2004.
- LUO, Y.; XIE, W. Effect of phytase treatment on iron bioavailability in faba bean (*Vicia faba* L.) flour. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1251-1255, 2012.
- LV, Y. et al. Hydrolysis of soybean protein improves iron bioavailability by Caco-2 cell. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 4, p. 162-166, 2014.
- LV, Y. et al. Identification and characteristics of iron-chelating peptides from soybean protein hydrolysates using IMAC-Fe³⁺. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4593-4597, 2009.
- MA, W. et al. Comparison of absorption characteristics of iron glycine chelate and ferrous sulfate in Caco-2 cells. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 15, n. 2, p. 372-376, 2013.
- MACKENZIE, E. L.; IWASAKI, K.; TSUJI, Y. Intracellular iron transport and storage: From molecular mechanisms to health implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 6, p. 997-1030, 2008.
- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Analysis methods for thiobarbituric acid reactive substances and malonaldehyde in food and biological samples In: TAYLOR, J. C. (Ed.). **Advances in chemistry research**. New York: Nova Science Publishers, Inc., v.29, 2015. p. 91-124
- MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review**, v. 9, n. 2, p. 136-156, 2004.
- MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. et al. Iron deficiency and iron fortified foods—a review. **Food Research International**, v. 35, n. 2–3, p. 225-231, 2002.
- MAZARIEGOS, D. I. et al. The mechanisms for regulating absorption of Fe bis-glycine chelate and Fe-ascorbate in Caco-2 cells are similar. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 2, p. 395-398, 2004.
- MAZEROLLES, G. et al. Infrared and fluorescence spectroscopy for monitoring protein structure and interaction changes during cheese ripening. **Lait**, v. 81, n. 4, p. 509-527, 2001.
- MCKIE, A. T. et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. **Science**, v. 291, n. 5509, p. 1755-1759, 2001.
- MEGÍAS, C. et al. Affinity purification of copper-chelating peptides from sunflower protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 16, p. 6509-6514, 2007.
- MERCIER, A.; GAUTHIER, S. F.; FLISS, I. L. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 3, p. 175-183, 2004.

- MIMURA, É. C. M. et al. Comparison of ferrous sulfate and ferrous glycinate chelate for the treatment of iron deficiency anemia in gastrectomized patients. **Nutrition**, v. 24, n. 7–8, p. 663-668, 2008.
- MIN, D.; BOFF, J. Lipid oxidation of edible oil. In: (Ed.). **Food lipids**: CRC Press, 2002. (Food science and technology).
- MIQUEL, E.; FARRÉ, R. Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 3, p. 139-143, 2007.
- MONSEN, E. R. Iron nutrition and absorption: Dietary factors which impact iron bioavailability. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 88, n. 7, p. 786-790, 1988.
- MONTALVO, G. et al. Infrared signature and folding dynamics of a helical beta-peptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 16, p. 5616-8, 2010.
- MORR, C. V.; HA, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993.
- MUKHERJEE, S.; CHOWDHURY, P.; GAI, F. Infrared study of the effect of hydration on the amide I band and aggregation properties of helical peptides. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 17, p. 4596-4602, 2007.
- NETTO, A. V. G. et al. Synthesis, spectral and thermal studies on pyrazolate-bridged palladium(II) coordination polymers. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 3, p. 789-792, 2007.
- NICOLAS, G. et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 7, p. 1037-44, 2002.
- O'LOUGHLIN, I. B. et al. Molecular characterization of whey protein hydrolysate fractions with ferrous chelating and enhanced iron solubility capabilities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 2708-14, 2015.
- OSINCHAK, J. E. et al. Effect of NaCl on catalysis of lipid oxidation by the soluble fraction of fish muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 35-41, 1992.
- OU, K. et al. Effect of neutrase, alcalase, and papain hydrolysis of whey protein concentrates on iron uptake by Caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4894-4900, 2010.
- PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 202, n. 2, p. 199-211, 2005.
- PAVORD, S. et al. Uk guidelines on the management of iron deficiency in pregnancy. **British Journal of Haematology**, v. 156, n. 5, p. 588-600, 2012.
- PENG, X.; XIONG, Y. L.; KONG, B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 196-201, 2009.
- PERALES, S. et al. Bioavailability of calcium from milk-based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dialyzability, and

- uptake and transport by Caco-2 cells). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3721-3726, 2005.
- PICARIELLO, G. et al. Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: Biological and toxicological implications. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 3–4, p. 295-308, 2010.
- PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1306-1314, 2006.
- PINTO, M. et al. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Biology of the Cell**, v. 47, p. 323-330, 1983.
- PORATH, J. Amino acid side chain interaction with chelate-liganded crosslinked dextran, agarose and tsk gel. A mini review of recent work. **Journal of Molecular Recognition**, v. 3, n. 3, p. 123-127, 1990.
- PORTER, N. A. A perspective on free radical autoxidation: The physical organic chemistry of polyunsaturated fatty acid and sterol peroxidation. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 78, n. 8, p. 3511-3524, 2013.
- PRATT, D. A.; TALLMAN, K. A.; PORTER, N. A. Free radical oxidation of polyunsaturated lipids: New mechanistic insights and the development of peroxy radical clocks. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 6, p. 458-467, 2011.
- PRIGOGINE, I.; RICE, S. A. **Advances in chemical physics**. v.111, John Wiley & Sons. 2009. 650 p.
- PUIG, S.; ASKELAND, E.; THIELE, D. J. Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. **Cell**, v. 120, n. 1, p. 99-110, 2005.
- PULLAKHANDAM, R. et al. Bioavailability of iron and zinc from multiple micronutrient fortified beverage premixes in Caco-2 cell model. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. H38-H42, 2011.
- QUINTAES, K. D.; BARBERÁ, R.; CILLA, A. Iron bioavailability in iron fortified cereal foods: The contribution of in vitro studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 10, p. 2028-2041-, 2017.
- RAFFIN, S. B. et al. Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 54, n. 6, p. 1344-1352, 1974.
- RANATHUNGA, S.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S.-K. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (conger myriaster). **European Food Research and Technology**, v. 222, n. 3, p. 310-315, 2006.
- RASHTI, F. et al. Overview of nutritional deficiencies after bariatric surgery. In: RAJENDRAM, R.; PREEDY, V. R., et al (Ed.). **Diet and nutrition in critical care**. New York, NY: Springer New York, 2015. p.1079-1092.
- REBELLATO, A. P. et al. Iron in fortified biscuits: A simple method for its quantification, bioaccessibility study and physicochemical quality. **Food Research International**, v. 77, Part 3, p. 385-391, 2015.

- REDDY, I. M.; MAHONEY, A. W. Solution visible difference spectral properties of Fe^{3+} -L-amino acid complexes at pH 6.60. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 6, p. 1436-1443, 1995.
- REDDY, M. B.; COOK, J. D. Assessment of dietary determinants of nonheme-iron absorption in humans and rats. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, n. 4, p. 723-8, 1991.
- REN, Z. Y. et al. Preparation and characteristic of iron-binding peptides from shrimp processing discards hydrolysates. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 5, p. 348-354, 2011.
- ROCHA, R. A.; VÉLEZ, D.; DEVESA, V. In vitro evaluation of intestinal fluoride absorption using different cell models. **Toxicology Letters**, v. 210, n. 3, p. 311-317, 2012.
- ROUSSET, M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two in vitro models for the study of intestinal differentiation. **Biochimie**, v. 68, n. 9, p. 1035-40, 1986.
- ROYER, C. A. Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 5, p. 1769-1784, 2006.
- SAIGA, A.; TANABE, S.; NISHIMURA, T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3661-3667, 2003.
- SAINT-SAUVEUR, D. et al. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 3, p. 260-270, 2008.
- SALOVAARA, S.; SANDBERG, A.-S.; ANDLID, T. Organic acids influence iron uptake in the human epithelial cell line Caco-2. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6233-6238, 2002.
- SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 229-254, 2011.
- SAWYER, L. et al. Milk protein structure—what can it tell the dairy industry? **International Dairy Journal**, v. 12, n. 4, p. 299-310, 2002.
- SCHAGGER, H. Tricine-sds-page. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 16-22, 2006.
- SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.
- SCHEERS, N.; SANDBERG, A.-S. Ascorbic acid uptake affects ferritin, Dcytb and nramp2 expression in Caco-2 cells. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 7, p. 401-408, 2008.
- SCHÜMANN, K. et al. On risks and benefits of iron supplementation recommendations for iron intake revisited. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 21, n. 3, p. 147-168, 2007.

- SETH, A.; MAHONEY, R. R. Binding of iron by chicken muscle protein digests: The size of the iron-binding peptides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 11, p. 1595-1600, 2000.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: Propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 397-409, 2004.
- SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.
- SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation: Measurement methods. In: (Ed.). **Bailey's industrial oil and fat products**: John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- SHANKAR, P.; BOYLAN, M.; SRIRAM, K. Micronutrient deficiencies after bariatric surgery. **Nutrition**, v. 26, n. 11-12, p. 1031-7, 2010.
- SHIOTA, M. et al. Utilization of lactoferrin as an iron-stabilizer for soybean and fish oil. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 3, p. C120-C123, 2006.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, p. 94-103, 1999.
- SLIVKA, A.; KANG, J.; COHEN, G. Hydroxyl radicals and the toxicity of oral iron. **Biochemical pharmacology**, v. 35, n. 4, p. 553-556, 1986.
- SOUTH, P. K.; MILLER, D. D. Iron binding by tannic acid: Effects of selected ligands. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 167-172, 1998.
- SOUZA, H. A. L.; BRAGAGNOLO, N. New method for the extraction of volatile lipid oxidation products from shrimp by headspace–solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry and evaluation of the effect of salting and drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 3, p. 590-599, 2014.
- STORCKSDIECK, S.; BONSMANN, G.; HURRELL, R. F. Iron-binding properties, amino acid composition, and structure of muscle tissue peptides from in vitro digestion of different meat sources. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 1, p. S019-S029, 2007.
- SUGIARTO, M.; YE, A.; SINGH, H. Characterisation of binding of iron to sodium caseinate and whey protein isolate. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 1007-1013, 2009.
- SUGIARTO, M. et al. Milk protein-iron complexes: Inhibition of lipid oxidation in an emulsion. **Dairy Science Technology**, v. 90, n. 1, p. 87-98, 2010.
- GONZÁLEZ-TELLO, P. G. et al. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. I. Molecular-weight range. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 4, p. 529-532, 1994.
- TORRES-FUENTES, C.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J. Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 485-490, 2011.
- _____. Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1585-1588, 2012.

- TRINDER, D. et al. Molecular pathogenesis of iron overload. **Gut**, v. 51, n. 2, p. 290-295, 2002.
- UCHIDA, T. et al. Availability of lactoferrin as a natural solubilizer of iron for food products. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 2, p. 95-101, 2006.
- UEDA, E. K.; GOUT, P. W.; MORGANTI, L. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. **Journal of chromatography. A**, v. 988, n. 1, p. 1-23, 2003.
- UENO, H. M. et al. Iron-lactoferrin complex reduces iron-catalyzed off-flavor formation in powdered milk with added fish oil. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 8, p. C853-8, 2012.
- UENO, H. M.; URAZONO, H.; KOBAYASHI, T. Serum albumin forms a lactoferrin-like soluble iron-binding complex in presence of hydrogen carbonate ions. **Food Chemistry**, v. 145, n. 0, p. 90-94, 2014.
- VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, p. 523-530, 2000.
- VAN DER VEN, C. et al. FTIR spectra of whey and casein hydrolysates in relation to their functional properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 24, p. 6943-6950, 2002.
- VEGARUD, G. E.; LANGSRUD, T.; SVENNING, C. Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. SupplementS1, p. 91-98, 2000.
- VIADEL, B. et al. Ferritin synthesis by Caco-2 cells as an indicator of iron bioavailability: Application to milk-based infant formulas. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 925-931, 2007.
- WADA, Y.; LÖNNERDAL, B. Bioactive peptides derived from human milk proteins — mechanisms of action. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 5, p. 503-514, 2014.
- WANG, C. et al. Zn(II) chelating with peptides found in sesame protein hydrolysates: Identification of the binding sites of complexes. **Food Chemistry**, v. 165, n. 0, p. 594-602, 2014.
- WANG, X. et al. In vitro iron absorption of α -lactalbumin hydrolysate-iron and β -lactoglobulin hydrolysate-iron complexes. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 5, p. 2559-2566, 2014.
- WANG, X. et al. Preparation and characteristics of yak casein hydrolysate-iron complex. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 8, p. 1705-1710, 2011.
- WARAHO, T. et al. Prooxidant mechanisms of free fatty acids in stripped soybean oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 7112-7117, 2009.
- WARDENCKI, W.; MICHULEC, M.; CURYŁO, J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 39, n. 7, p. 703-717, 2004.

- WATERHOUS, D. V.; JOHNSON, W. C. Importance of environment in determining secondary structure in proteins. **Biochemistry**, v. 33, n. 8, p. 2121-2128, 1994.
- WHO/FAO. **Guidelines on food fortification with micronutrients**. In: (Ed.). Geneva: World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006. p. 97-104.
- WHO. **Assessing the iron status of populations**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2007.
- _____. **The global prevalence of anaemia in 2011**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2015.
- WIENK, K. J. H.; MARX, J. J. M.; BEYNEN, A. C. The concept of iron bioavailability and its assessment. **European Journal of Nutrition**, v. 38, n. 2, p. 51-75, 1999.
- WONG, D. W. S. et al. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, n. 8, p. 807-844, 1996.
- WORTLEY, G. et al. Iron availability of a fortified processed wheat cereal: A comparison of fourteen iron forms using an in vitro digestion/human colonic adenocarcinoma (Caco-2) cell model. **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. 1, p. 65-71, 2005.
- WU, H. et al. Enzymatic preparation and characterization of iron-chelating peptides from anchovy (*Engraulis japonicus*) muscle protein. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 435-441, 2012.
- YAMAMOTO, A. Proteolytic enzymes. In: REED, G. (Ed.). **Enzymes in food processing**. 2 ed. London: Academic Press, 1975. p.123-179.
- YAMAMOTO, Y. et al. Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels by high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 7-13, 1987.
- YEUNG, A. C.; GLAHN, R. P.; MILLER, D. D. Comparison of the availability of various iron fortificants in bread and milk using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture method. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 6, p. 2357-2361, 2002.
- ZHANG, H. et al. Dairy wastewater for production of chelated biodegradable Zn micronutrient fertilizers. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 3, p. 1722-1727, 2016.
- ZHANG, M.-N.; HUANG, G.-R.; JIANG, J.-X. Iron binding capacity of dephytinised soy protein isolate hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 5, p. 994-999, 2014.
- ZHANG, Y.; CREMER, P. S. Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 658-663, 2006.
- ZHAO, L. et al. A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 46-53, 2014.
- ZHOU, J. et al. Preparation and characterization of β -lactoglobulin hydrolysate-iron complexes. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4230-4236, 2012.

- ZHU, L. et al. Comparing soluble ferric pyrophosphate to common iron salts and chelates as sources of bioavailable iron in a Caco-2 cell culture model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 5014-5019, 2009.
- ZHU, L. et al. Iron dissociates from the NaFeEDTA complex prior to or during intestinal absorption in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7929-7934, 2006.
- ZOLLER, H. et al. Expression of the duodenal iron transporters divalent-metal transporter 1 and ferroportin 1 in iron deficiency and iron overload. **Gastroenterology**, v. 120, n. 6, p. 1412-1419, 2001.

ANEXO

Permissão da editora para inclusão do Artigo 2 na tese

04/04/2017

RightsLink Printable License

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Apr 04, 2017

This Agreement between Maria Elisa Caetano ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4081910991639
License date	
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Journal of Food Composition and Analysis
Licensed Content Title	Evaluation of in vitro iron bioavailability in free form and as whey peptide-iron complexes
Licensed Content Author	Maria Elisa Caetano-Silva, Antonio Cilla, Maria Teresa Bertoldo-Pacheco, Flavia Maria Netto, Amparo Alegria
Licensed Content Date	Available online 24 March 2017
Licensed Content Volume	n/a
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	1
Start Page	
End Page	
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	Whey peptide-iron complexes: obtaining, characterization and evaluation of iron pro-oxidant effect and iron bioavailability using Caco-2 cell culture model
Expected completion date	Jun 2017
Estimated size (number of pages)	150
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Maria Elisa Caetano-Silva Monteiro Lobato 80 Campinas, SP 13083-862 Brazil Attn: Maria Elisa Caetano-Silva
Billing Type	Invoice
Billing Address	Maria Elisa Caetano-Silva Monteiro Lobato 80 Campinas, Brazil 13083-862 Attn: Maria Elisa Caetano-Silva