

Área: Ciência de Alimentos

OBTENÇÃO DE FONTE ALTERNATIVA DE FERRO PARA ALIMENTAÇÃO HUMANA ATRAVÉS DO USO DA NANOTECNOLOGIA

Lidiane Muniz Moreira*, Anelise Christ Ribeiro, Antônio Matias Navarrete Toledo,
Fábio Andrei Duarte; Leonor Almeida de Souza-Soares

Laboratório de Ciência de Alimentos, Curso de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.

**E-mail: lidianemunizmoreira@yahoo.com.br*

RESUMO – Anemia ferropriva é definida pela produção de eritrócitos pequenos e pela diminuição do índice de hemoglobina circulante, constituindo o último estágio da deficiência de ferro e corresponde a um longo período de privação deste nutriente. No Brasil, estudos conduzidos em diversos Estados indicam que a anemia ferropriva prevalece em 70% das crianças na faixa etária de 6 a 12 meses de idade, além de gestantes, lactantes e lactentes e, para isso tornou obrigatória à adição de sais de ferro em farinhas de trigo e de milho. Com o objetivo de oferecer uma fonte alternativa deste mineral, foram obtidas e caracterizadas nanopartículas de *Spirulina*. A cianobactéria estudada, *Spirulina* cepa LEB-18, foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da mesma Universidade. Para obtenção das nanopartículas foi utilizada a técnica de ultra homogeneização, onde a biomassa foi homogeneizada com diferentes solventes na proporção 1:100 a $10,2 \times 10^3$ rpm/20 minutos; posteriormente liofilizada e analisada quanto ao tamanho das partículas por Microscopia Eletrônica de Varredura. Constatado o tamanho das partículas em escala nanométrica, estas foram imediatamente encaminhadas às determinações dos teores de ferro, cálcio, fósforo e magnésio pelo método de Espectroscopia de Absorção/emissão Atômica. Os resultados obtidos foram comparados com os valores recomendados para *Spirulina* para consumo humano pela *Food and Drug Administration* e com Ingestão Diária Recomendada de minerais pelo Ministério da Saúde. Os resultados indicam que a *Spirulina* em tamanho nanométrico pode ser uma fonte alternativa de minerais.

Palavras-chave: anemia ferropriva, cianobactéria, minerais essenciais, *Spirulina*.

1 INTRODUÇÃO

Anemia ferropriva é definida pela produção de eritrócitos pequenos e pela diminuição do índice de hemoglobina circulante; constitui o último estágio da deficiência de ferro e corresponde a um longo período de privação deste nutriente. Esta carência ocorre principalmente em crianças, adolescentes do sexo feminino,

gestantes e idosos. Conhecidamente, as principais causas desta deficiência são a depleção dos estoques de ferro, a ingestão insuficiente de alimentos ricos neste mineral e a sua baixa absorção (ADOM et al., 2010).

A fortificação de alimentos com sais de ferro é uma das estratégias para o combate à anemia ferropriva em países subdesenvolvidos, tendo como vantagens o alcance a todos os eixos da população e não requerer a cooperação do indivíduo. No entanto, esta fortificação merece atenção especial, pois as formas de ferro com boa solubilidade, como sulfato de ferro, são quimicamente reativas e provocam alterações sensoriais indesejáveis aos alimentos. E compostos de ferro inerte ou sais de ferro insolúveis, como ferro reduzido e fosfato ferroso, não provocam tais alterações, porém tem baixa absorção (WEGMÜLLER et al., 2004; COCATO et al., 2007).

Sabe-se que o tamanho da partícula poderá influenciar na absorção. Em relação ao ferro, uma elevada absorção foi relatada após a sua redução em micropartículas (WEGMÜLLER et al., 2004; COCATO et al., 2007). Rohner et al. (2007), após reduzirem compostos solúveis de ferro em nanopartículas verificaram, através de experimento com ratos, o aumento da biodisponibilidade deste mineral. A nanobiotecnologia é a combinação da nanociência e biotecnologia com objetivo de produzir sistemas com menor tamanho e mais eficientes. O prefixo “nano” está relacionado a uma escala de medida em que um nanômetro (1 nm) representa um bilionésimo do metro ou um milionésimo do milímetro. Estruturas nessa escala apresentam propriedades funcionais únicas não encontradas na escala macro (FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

Segundo Jassby (1988) a quantidade de ferro na cianobactéria do gênero *Spirulina* destaca-se em relação aos demais, sendo que cada 3 g de *Spirulina* contém 1.3 mg de ferro. Em estudos realizados foi demonstrado que o ferro presente na *Spirulina* é um bom regenerador de hemoglobina em ratos (MOREIRA et al., 2011 apud KAPPOR e MEHTA., 1993). Levando em consideração a composição da *Spirulina*, que a anemia ferropriva é um dos maiores problemas nutricionais em países em desenvolvimento e que compostos em escala nanométrica podem apresentar uma melhor absorção pelo organismo, o grupo de pesquisa achou pertinente quantificar, na biomassa de *Spirulina* em tamanho nanométrico, o teor de ferro e de minerais que possam influenciar na sua absorção.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

A microalga utilizada no presente trabalho foi *Spirulina* cepa LEB-18 (MORAIS et al., 2008), isolada da Lagoa Mangueira. A biomassa foi triturada em moinho de facas (Laboratory Mill 3100, Perten®) e peneirada em agitador de peneiras, alcançando uma granulometria de 88 µm. Após foi acondicionada a vácuo em embalagens de polietileno de alta densidade (PEAD), com capacidade para 500 g, e armazenada a $5 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.2. Métodos

2.2.1. Obtenção de *Spirulina* em tamanho nanométrico

Micropartículas secas de *Spirulina* LEB-18 foram misturadas, na proporção 1:100 (p/v) com solução tampão fosfato de sódio (0.2 M e pH 7) em Homogeneizador Digital Ultraturrax a 10.2×10^3 rpm por 20 min. A escolha do solvente, rotação e tempo foi embasada na metodologia descrita por Machado (2011) e Dotto et al. (2012). As soluções obtidas foram armazenadas a -60 °C por 24 horas em Ultrafreezer e encaminhadas ao processo de liofilização.

2.2.2. Determinação do tamanho e morfologia das amostras

As amostras foram analisadas quanto ao seu tamanho e morfologia em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), com resolução de 100 e 5.000 vezes. Para isso as amostras em pó, obtidas através do processo de liofilização, foram previamente adicionadas de acetona, encaminhadas ao banho ultrassônico por 25 min e metalizadas em ouro por 3 min.

2.2.3. Determinação de ferro, cálcio, fósforo e magnésio.

As amostras (~ 300 mg) foram pesadas em triplicata e digeridas em forno de micro-ondas modelo Speedwave 4 (Berghof, Alemanha). O programa de aquecimento está descrito na Tabela 1. Para digestão, foram utilizados 5 mL de HNO₃ concentrado e redestilado (Merck) e 0,5 ml de HF a 40% (Merck). Após a digestão, as amostras foram diluídas 5 a 500X em 5% HNO₃ para posterior quantificação por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (modelo Optima 4300 DV, Shelton, EUA).

Tabela 1 - Programa de aquecimento em forno de micro-ondas

Etapas	Rampa (min)	T (°C)	Tempo de permanência (min)	Pressão (bar)
1	20	170	10	35
2	5	200	25	35
3	5	50	20	35

A introdução das amostras do espectrometro foi realizada utilizando um nebulizador GemCone e uma câmara de pulverização ciclônica. As outras condições do equipamento estão descritas na Tabela 2. O plasma foi formado a partir de argônio (White Martins, São Paulo, Brasil), com uma pureza de 99,996%.

Tabela 2 - Condições de operação do equipamento ICP OES*

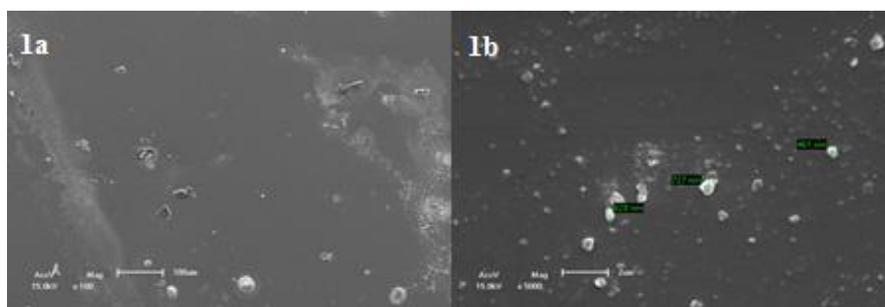
Parâmetros	Condições
Potência (W)	1400
Vazão do gás principal (L min ⁻¹)	15
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,2
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,7
Comprimento de onda (nm)	Ferro 238.204 Cálcio 315. 887 Fósforo 214.914 Magnésio 279. 077

* Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 são duas microfotografias eletrônicas da *Spirulina* LEB-18 após homogeneização com solução tampão fosfato 0.2 M. Na imagem 1a observa-se a amostra, em totalidade, em um aumento de 100 x no MEV. Na imagem 1b, em uma resolução de 5.000 x, observa-se uma região específica da amostra, onde foram escolhidas e medidas 3 partículas (461, 628 e 727 nm). Machado (2011), com o mesmo método, obteve nanopartículas de *Spirulina* com tamanho médio de 215 nm. Dotto (2012), seguindo a mesma metodologia, porém com secagem das partículas em estufa a vácuo, obteve partículas com diâmetro variando de 100 a 350 nm.

Figura 1 - Microfotografias eletrônicas de *Spirulina* LEB-18 em tamanho nano obtidas em análise de MEV nas resoluções 100 x (1a) e 5.000 x (1b)



Após constatação do tamanho nano, a amostra foi analisada quanto aos teores de ferro, cálcio, fósforo e magnésio. Os resultados podem ser observados na Tabela 3, onde são comparados com valores preconizados pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2011) e com a Legislação Brasileira (BRASIL, 2004).

Tabela 3 – Conteúdo de minerais em *Spirulina* nanométrica em comparação com valores preconizados pela *Food and Drug Administration* em *Spirulina* para consumo humano e Índice de Ingestão Diária para crianças recomendado pelo Ministério da Saúde

Mineral	<i>Spirulina</i> nanosize	FDA	IDR para crianças*
	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm \text{dp}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	μg
Ferro	479 ± 12	533	6.000 – 9.000
Cálcio	7.198 ± 50	4.667	500.000-700.000
Fósforo	13.6369 ± 1441	10.000	460.000-1.250.000
Magnésio	2.066 ± 40	7.667	60.000-100.000

*Crianças de 1 a 10 anos.

Com exceção do teor de ferro encontrado na *Spirulina* em tamanho nanométrico, todos os outros minerais estão presentes em elevado percentual, quando comparados aos preconizados pela FDA para *Spirulina* para consumo humano. O percentual de ferro obtido é próximo ao que estabelece a FDA e também condiz com o

estudo de Ramírez-Moreno e Olvera-Ramírez (2006). Na pesquisa, os autores relatam encontrar 0,03 a 0,05% de ferro em *Spirulina* e no presente estudo encontrou-se 0,04% deste mineral na *Spirulina* em tamanho nanométrico. Ao observarmos a coluna 4 da Tabela 3 para o mineral ferro, pode-se verificar que 12 – 18 g da microalga supririam a RDI deste mineral para crianças.

4 CONCLUSÃO

A presente pesquisa demonstrou que a cianobactéria *Spirulina* em tamanho nanométrico é uma importante fonte de minerais, em especial o ferro, podendo contribuir com o combate às carências nutricionais dos grupos de risco.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - REDE NANOFOTOBIOTEC), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

6 REFERÊNCIAS

- ADOM, T.; STEINER-ASIEDU, M.; SAKYU-DAWSON, E. Effect of fortification of maize with cowpea and iron on growth and anaemia status of children. **African Journal of Food Science**. V.4, n.4, p:136-142, 2010.
- BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2004). Regulamento técnico sobre ingestão diária recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas e minerais. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B8989-1-0%5D.PDF>>. Acesso em 15 jul de 2013.
- COCATO, M. L.; RÊ, M. I.; CHIEBAO, H. P.; COLLI, C. Avaliação por métodos *in vitro* e *in vivo* da biodisponibilidade de sulfato ferroso microencapsulado. **Journal of Nutritional**, v. 20, n. 3, p. 239-247, 2007.
- DOTTO, G. L.; CADAVAL, T. R. S.; PINTO, L. A. A. Preparation of bionanopartiles derived from *Spirulina platensis* and its application for Cr (VI) removal from aqueous solutions. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. V. 18, n. 6, p.1925-1930, 2012.
- FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal Food Technology**. V.11, n. 2, p:103-112, 2008.
- FDA - Food and Drug Administration. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153674.htm>. Acesso em 15 jul de 2013.
- JASSBY, A. *Spirulina*: a model for microalgae as human food. In: **Algae and human affairs**. Cambridge: Cambridge University Press. p.179, 1988.

- KAPPOR, S. J.; MEHTA, U. Iron Status and growth of rats fed different dietary iron sources. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 44, n.1, p:29-34, 1993.
- MACHADO, A. R. **Avaliação biológica de *Spirulina* em tamanho micro e nanométrico e estudo da sua encapsulação em lipossomas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande), p.149, 2011.
- MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A.J.; MARINS, L. F. F.; COSTA, J. A.V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforsch.** V. 63, p:144 -150, 2008.
- MOREIRA, L. M.; BEHLING, B.; RODRIGUES, R. S.; COSTA, J. A. V.; SOUZA-SOARES, L. A. (2013). *Spirulina* as a Protein Source in the Nutritional Recovery of *Wistar* Rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. V.56, n. 3, p:447 – 456, 2013.
- RAMÍREZ-MORENO, L.; OLVERA-MORENO, R. Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthosphira* sp.) **Interciencia**. V. 31, n. 9, p:657-663, 2006.
- ROHNER, F.; ERNEST, F. O.; ARNOLD, M.; HILBE, M.; BIEBINGER, R.; EHRENSPERGER, F.; PRATSINIS, S. E.; LANGHANS, W.; HURRELL, R. F.; ZIMMERMANN, M. B. Synthesis, characterization and bioavailability in rats of ferric phosphate nanoparticles. **Journal of Nutritional**. V.137, p:614-619, 2007.
- WEGMULLER, R.; ZIMMERMANN, M. B.; MORETTI, D.; ARNOLD, M.; LANGHANS, W.; HURRELL, R. Particle size reduction and encapsulation affect the bioavailability of ferric pyrophosphate in rats. **Journal of Nutrition**. V.134, p:3301-3304, 2004.