

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA NUTRIÇÃO
ÁREA DE NUTRIÇÃO BÁSICA E EXPERIMENTAL

Parcer

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Maria Margareth
Velooso Naves Cabral e aprovada pela Comissão
Julgadora em 28.12.90,
Campinas, 28 de dezembro de 1990.

Valdemir C. Sgarbi

UTILIZAÇÃO BIOLÓGICA DO FERRO DO FEIJÃO
'CARIOCA 80 S.H.' (*Phaseolus vulgaris*, L.),
NA REPLEÇÃO DA HEMOGLOBINA DE RATOS ANÊ-
MICOS

MARIA MARGARETH V. NAVES CABRAL

Orientador:

Prof. Dr. VALDEMIRO C. SGARBIERI

21/90

B-1910077X

Tese apresentada ao Departamento de Planejamento Alimentar e Nu-
trição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, para
obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA DA NUTRIÇÃO.

CAMPINAS

1990

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais, ao Marcos e ao Álvaro.

BANCA EXAMINADORA

Valdemiro C. Sgarbieri
Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
(Orientador)

Maria de Lourdes Pires Bianchi
Profª Drª Maria de Lourdes Pires Bianchi
(Membro)

Berene (Wilke)
Profª Drª Berenice Cunha Wilke
(Membro)

Suplente
Profª Drª Débora de Queiroz Tavares
(Membro)

Campinas, 28 de dezembro de 1990

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

À Profª Drª Mª de Lourdes Pires Bianchi (USP)

Ao Prof. Dr. Lázaro José Chaves (UFG)

Ao Prof. Dr. Quirino A. C. Carmello (ESALQ)

À Profª Drª Maria Judi de Mello Ferreira (UFG)

À Bibliotecária Cláudia Oliveira de Moura (UFG)

À Eliete, funcionária do Biotério (FEA/UNICAMP)

Ao datilógrafo Ricardo A. P. Queiroz (UFG)

Aos amigos:

Ricardo Coelho

Miriam de las Mercedes

Cáritas de J. S. Mendonça

Semíramis M. A. Domeni

Hilda R. Torin

Valquíria Rocha S. Veloso

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica Nutricional (FEA
UNICAMP)

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)

À Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.

Aos meus irmãos

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho,

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	<u>Páginas</u>
1. INTRODUÇÃO.	001
2. OBJETIVOS	020
3. MATERIAL E MÉTODOS	021
3.1. MATERIAL	021
3.1.1. <u>Animais</u>	021
3.1.2. <u>Rações</u>	021
3.1.2.1. Ração basal, pobre em ferro...	021
3.1.2.2. Rações padrões	024
3.1.2.3. Rações experimentais	024
3.2. MÉTODOS	030
3.2.1. <u>Determinações químicas</u>	030
3.2.2. <u>Preparo das rações</u>	032
3.2.3. <u>Ensaio biológico: depleção e repleção</u> <u>de hemoglobina</u>	033
3.2.4. <u>Dosagem de hemoglobina</u>	035
3.2.5. <u>Determinação da utilização biológica</u> <u>(Biodisponibilidade %) do ferro</u>	037

	<u>Páginas</u>
3.2.6. <u>Metodologia estatístico-experimental</u>	038
4. RESULTADOS	040
4.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FARINHAS DO FEIJÃO E DAS RA ÇÕES	040
4.2. ENSAIO BIOLÓGICO	040
4.2.1. <u>Fase de depleção</u>	040
4.2.2. <u>Fase de repleção</u>	045
4.3. UTILIZAÇÃO BIOLÓGICA DO FERRO	055
4.3.1. <u>RBV(%) ou Valor Biológico Relativo</u>	055
4.3.2. <u>HRE(%) ou Eficiência de Regeneração da Hemo globina</u>	055
5. DISCUSSÃO	060
5.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FARINHAS DO FEIJÃO	060
5.2. ENSAIO BIOLÓGICO	063
5.2.1. <u>Fase de depleção</u>	063
5.2.2. <u>Fase de repleção</u>	066
5.2.2.1. Grupo basal	066
5.2.2.2. Ganho de peso	066
5.2.2.3. Consumo de ração	067
5.2.2.4. Variações nos parâmetros hematolô gicos	069
5.3. UTILIZAÇÃO BIOLÓGICA DO FERRO	072
5.3.1. <u>Valor Biológico Relativo (RBV %)</u>	073
5.3.2. <u>Eficiência de Regeneração da Hemoglobina (HRE %)</u>	081
5.4. LIMITAÇÕES DO USO DO RATO COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA PREDIZER A BIODISPONIBILIDADE DO FERRO	084

	<u>Páginas</u>
5.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	088
6. CONCLUSÕES	089
7. RESUMO	091
8. SUMMARY	093
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	095

1. INTRODUÇÃO

O ferro é um elemento que está em todas as células do organismo e suas funções estão, na sua grande maioria, relacionadas aos processos de respiração celular. Considerando que o organismo do indivíduo adulto contém cerca de quatro gramas de ferro, este elemento constitui o metal mais importante para os mamíferos (Forth & Rummel, 1973). A maioria deste ferro se encontra na forma de complexos ligados à proteína, tanto como grupo ferroporfirina, principalmente na forma de hemoglobina (60 - 70%) e também como mioglobina e certas enzimas, ou como compostos não "heme" ligados à proteína tais como ferritina (ferro de reserva), transferrina (no plasma) e enzimas ferroflavoproteínas. O ferro iônico está presente no organismo em quantidades irrelevantes (Underwood, 1977).

A demanda de ferro no organismo varia consideravelmente durante as etapas da vida e o organismo apresenta grande habilidade em adaptar-se às mudanças nestas necessidades. A deficiência de ferro é consequência de um balanço negativo entre o aporte e as necessidades deste nutriente e determina a longo prazo, uma alteração na eritropoiese, reduzindo os níveis de hemoglobina no sangue. A deficiência sistêmica de ferro se processa no organismo humano de maneira gradual e

progressiva, resultando tardiamente no aparecimento de anemia (Brandalise & Matsuda, 1986).

A anemia ferropriva constitui um problema de saúde pública, não somente nos países subdesenvolvidos como naqueles altamente industrializados, embora apresente maior prevalência entre as populações do terceiro mundo (Baker & Demaeyer, 1979, Florentino & Guirriec, 1984, Fossi et al, 1987). A anemia por deficiência de ferro, a mais comum entre as anemias, permanece como o maior problema nutricional em todo o mundo, atingindo especialmente crianças e mulheres em idade fértil. Sem dúvida, as principais causas desta deficiência nutricional são a reduzida ingestão de ferro, associada ao consumo de ferro de baixa qualidade, isto é, pouco biodisponível (Finch & Cook, 1984, Gordon & Godber, 1989). A Organização Mundial de Saúde (1975) constatou, em diferentes partes do mundo, que 21 a 80% das gestantes são anêmicas e 40 a 99% delas apresentam alguma deficiência de ferro.

A maior incidência de anemia ferropriva ocorre entre os seis meses e três anos de idade, sendo particularmente prevalente em lactentes e pré-escolares, em virtude do rápido crescimento corporal, que acarreta grandes necessidades de ferro (Brandalise & Matsuda, 1986). Entretanto a introdução de uma dieta pobre em ferro associada à reduzida capacidade deste ser aproveitado pelo organismo, determinam uma elevada prevalência de deficiência de ferro entre os seis meses e um ano de idade, principalmente nos países subdesenvolvidos (Anderson et al, 1979, Fossi et al, 1987, Halberg 1981c). Margo et al (1977), pesquisando a prevalência e tipo de anemia nutricional em 344 crianças de Johannesburg (África do Sul), constataram que 23% das crianças de um ano de idade apresentavam anemia ferropriva e que 53% tinham evidências bioquímicas de deficiên

cia de ferro. Por outro lado, Bailey & Cerda (1988) relatam que 5 a 15% das crianças americanas de 9 a 36 meses de idade são anêmicas (por deficiência de ferro) e que a nutrição do lactente parece ser o fator mais importante na determinação do aparecimento de anemia nesta fase.

No Brasil, a anemia ferropriva constitui um dos principais problemas nutricionais de saúde pública, demonstrado por diversos trabalhos (INAN, 1984, Roncada & Szarfarc, 1975, Szarfarc, 1985). Sigulem et al (1978) constataram uma elevada prevalência de anemia ferropriva (22,7%) em crianças de 6 a 60 meses do município de São Paulo, com maior frequência entre crianças menores de 2 anos de idade. Araújo et al (1987) também encontraram uma situação semelhante em pré-escolares da cidade de Belo Horizonte - 21,5% de crianças anêmicas. Registros sobre a ocorrência de anemia ferropriva em cinco estados do Brasil revelam uma prevalência que varia de 20 a 80%, tratando-se portanto, de um quadro sem dúvida relevante (INAN, 1984). Monteiro (1988), pesquisando a nutrição das crianças do município de São Paulo, encontrou que a anemia ocorre com grande frequência sobretudo nos dois primeiros anos de vida (53,7 a 58,1 %) e que nenhuma das dietas dos lactentes (primeiro ano de vida) atingiu as recomendações de ingestão de ferro. O autor conclui que a anemia constitui a deficiência nutricional mais comum entre as crianças de São Paulo.

O organismo depletado em ferro apresenta uma série de comprometimentos. Estudos com agricultores evidenciam a influência negativa que a anemia ferropriva exerce sobre a capacidade física para o trabalho (Hallberg, 1981c). Ohira et al (1981) também constataram esta relação em ratos machos adultos, concluindo que a concentração de hemoglobina é o maior determinante do con

sumo total de oxigênio e da capacidade de trabalho nestes ani mais. Por outro lado, indivíduos anêmicos apresentam doenças in fecciosas mais frequentemente e mais graves (Vyas & Chandra, 1984, Kuvibidila, 1987). Ainda, a deficiência de ferro tem sido rela cionada com redução da capacidade cognitiva, fadiga e mudanças comportamentais em geral (Beaton et al, 1989, Vyas & Chandra , 1984).

O ferro é um elemento que está largamente distribuí do na natureza e existe em quantidades relativamente grandes na maioria dos alimentos consumidos pelo homem. Mesmo assim, a defi ciência de ferro continua a ser o maior problema nutricional em todo o mundo, como já relatado. Isto pode ser explicado pelo fa to de que o homem tem grande dificuldade em absorver este nutri triente através da mucosa intestinal, o que por sua vez está bas tante relacionado com a forma química em que o ferro se encontra nos alimentos e as interações que podem ocorrer entre ele e ou tros constituintes da dieta (Hallberg, 1981b, Stekel et al, 1983). Assim, o conteúdo total de ferro em um alimento ou dieta não in dica a quantidade do mesmo que está metabolicamente disponível e portanto, não é suficiente para avaliar sua adequação nutricio nal (Amine et al, 1972). Para conhecer a quantidade de ferro po tencialmente disponível dos alimentos é necessário, portanto, não somente saber a quantidade de ferro aportada, mas sua natureza química e a composição da refeição com a qual ele é consumido (Monsen et al, 1978). De acôrdo com o mecanismo de absorção, o fer ro dietético se apresenta sob duas formas químicas principais: a forma "heme" e a forma "não heme".

O ferro "heme" é encontrado nos alimentos de origem animal sob a forma de hemoglobina e mioglobina e corresponde em média a cerca de 40% do ferro total presente nos tecidos animais

incluindo produtos cárneos, fígados, aves e peixes. O tipo de refeição tem pouca influência na absorção do ferro "heme" porque ele permanece dentro do complexo porfirina até ser absorvido pela célula da mucosa. Stekel et al (1983), estudando a absorção do ferro "heme", utilizaram pó concentrado de hemoglobina marcada intrinsecamente com ^{55}Fe (de sangue bovino) na fortificação de leite, arroz e bolo de farinha de trigo. Os resultados de taxa de absorção, calculada pela radioatividade incorporada nas células vermelhas, revelaram que a absorção do ferro da hemoglobina foi elevada, uniforme e independente dos constituintes dos alimentos. Portanto, o ferro "heme" é bem absorvido e, dependendo do "status" nutricional de ferro do organismo, sua absorção pode variar de cerca de 15% em indivíduos com estoques repletos à 35% naqueles com baixas reservas de ferro (Clydesdale, 1983), sendo sua absorção média de 23% (Herbert, 1987, Monsen et al, 1978).

O ferro "não heme" é encontrado nos alimentos de origem vegetal, ovos, leite e derivados, carnes (cerca de 60% do ferro total) e em alimentos industrializados fortificados com sais de ferro. A absorção do ferro de origem vegetal ("não heme") é bem menor do que a do ferro "heme" (cerca de 1 a 5%) e bastante vulnerável à presença de vários fatores dietéticos que melhoram (ácido ascórbico, tecido animal) ou bloqueiam (oxalatos, fibras, fitatos, taninos, entre outros) a disponibilidade do ferro para absorção, por alteração de sua solubilidade no trato gastrointestinal (Cook, 1983, Hazell, 1985).

A disponibilidade do ferro "não heme" para absorção, de um modo geral, depende da proporção relativa dos fatores que promovem ou inibem a liberação do ferro na mucosa do trato gastrointestinal. Um dos fatores mais efetivos no aumento da absorção do ferro "não heme" é o ácido ascórbico, cuja ação tem sido

claramente demonstrada por diversos trabalhos (Hallberg, 1981c, Hallberg et al , 1989, Lynck & Cook, 1980). O ferro está presente nos alimentos de origem vegetal predominantemente na forma de complexos férricos, de baixa biodisponibilidade (Lee & Clydesdale, 1979). O ácido ascórbico promove a redução deste ferro ao estado ferroso que é mais solúvel (poder redutor) e também pode formar quelato com ions férricos (ferro-ascorbato) em pH ácido que permanece solúvel com o aumento do pH no intestino delgado proximal. Este efeito é observado somente quando o ácido ascórbico é ingerido simultaneamente com o ferro e quando não está em sua forma oxidada, que tem menor poder redutor (Monsen, 1988). Cook & Monsen (1977) observaram um aumento de 1,7 a 9,6 vezes na absorção do ferro (de baixa biodisponibilidade) de uma refeição semi-sintética, proporcional à adição de doses crescentes de ácido ascórbico entre 25 e 1000 mg. A influência do ácido ascórbico é particularmente importante em dietas contendo apenas ferro "não heme", como dietas vegetarianas ou de populações de baixo nível sócio-econômico, onde o consumo de alimentos ricos em ácido ascórbico, tais como frutas cítricas, caju, goiaba e mamão, pode aumentar em até seis vezes a absorção do ferro, conforme relatado por Hallberg (1981b). Além disso, a fortificação de alimentos com ácido ascórbico parece ser mais eficiente para combater a deficiência de ferro nestas populações, do que a fortificação com sais de ferro (Cook, 1977).

Os tecidos animais também promovem a absorção do ferro "não heme", além de contribuir com o ferro "heme" no aporte total de ferro da dieta. O efeito melhorador da carne, peixe e aves foi relatado primeiramente por Layrisse et al (1968) e esta observação tem sido confirmada tanto em refeições semi-sintéticas

(Cook et al, 1972) quanto em alimentos, conforme sumariza Hallberg (1981b). Como no caso do ácido ascórbico, o efeito facilitador que a carne exerce sobre a absorção do ferro "não heme" está relacionado com a quantidade de carne presente na refeição, mas o mecanismo exato desta ação não está totalmente elucidado. Tem-se proposto que este efeito seja provocado por um fator presente na carne ("meat factor") que pode ser tanto aminoácidos ou polipeptídeos liberados na digestão das proteínas, formando quelatos solúveis com o ferro "não heme" da dieta (Conley & Hathcock, 1978, Kroe et al, 1963, Monsen, 1988). Hurrell et al (1988) sugerem que estes produtos de digestão podem ser mais especificamente peptídeos ricos em cisteína. No entanto, vários pesquisadores acreditam que este efeito não é uma propriedade da proteína em si, como descreve Hallberg (1981b) e Morris (1983). Recentemente, Gordon & Godber (1989) demonstraram a influência do "meat factor" em ratos, através da estimativa do Valor Biológico Relativo do ferro (RBV %) do farelo de arroz, que mudou de 46 para 75% quando a lactoalbumina foi substituída por carne (isenta de ferro) como fonte protéica na dieta dos animais. É importante ressaltar ainda que o tecido animal apresenta efeito promotor semelhante tanto na absorção do ferro "não heme" quanto do ferro "heme", visto que a absorção do ferro "heme" pode ser reduzida à 50% na ausência de carne (Hallberg, 1981a).

A Organização Mundial de Saúde (WHO, 1970) reconhece a importância da proteína de origem animal na utilização biológica do ferro quando submete a recomendação deste nutriente à quantidade da referida proteína presente na dieta. Assim, para a mulher adulta, a OMS recomenda o aporte de 28 mg de ferro/dia quando a proteína de origem animal contribuir com menos de 10% das calorias totais da dieta e, apenas 14 mg de ferro/dia quando

mais que 25% das calorias forem derivadas das proteínas de origem animal. No entanto, estas recomendações precisam ser revistas pois sabe-se que somente o tecido animal apresenta o efeito melhorador sobre a absorção do ferro. Outras proteínas de origem animal como albumina sérica e proteínas do ovo, leite e queijo, não demonstram este efeito; ao contrário, comprometem a absorção do ferro (Callender et al, 1970, Hurrell et al, 1988, Stekel et al, 1983).

O efeito melhorador da carne sobre a absorção do ferro "não heme" tem sido comparado com aquele apresentado pelo ácido ascórbico para estimar a biodisponibilidade do ferro de refeições, considerando-se que 100 g de carne equivale a aproximadamente 100 mg de ácido ascórbico (Morris, 1983). Monsen et al (1978), propõem um método de estimativa da biodisponibilidade do ferro baseado nas reservas de ferro do organismo e na ingestão de carne e ácido ascórbico. Assim, quando os estoques de ferro do indivíduo estão totalmente depletados e a ingestão de ácido ascórbico é menor que 25 mg ou de carnes, menor que 30 g, a biodisponibilidade do ferro será de 5%. No entanto, quando a dieta apresenta mais que 75 mg de ácido ascórbico ou mais que 90 g de carnes, o aproveitamento do ferro será bem maior, isto é, cerca de 20%.

Hallberg & Rossander (1984) estudaram a influência da carne e ácido ascórbico na absorção do ferro de uma refeição típica Latinoamericana, composta de milho, arroz e feijão preto. Os resultados obtidos em 49 indivíduos, sob diferentes métodos, revelaram um aumento significativo na absorção do ferro "não heme" que mudou de 0,17 para 0,45 mg quando foi adicionado 75 g de carne e, aumentou para 0,58 mg quando a refeição foi suplementada com couve-flor como fonte de ácido ascórbico (65 mg).

Outros fatores dietéticos tem sido indicados como facilitadores da absorção do ferro "não heme" tais como ácidos orgânicos de baixo peso molecular (ácido cítrico, ácido lático) , frutose e certos aminoácidos (histidina, lisina e cisteína), através da formação de quelatos solúveis com o ferro, tornando-o disponível para as células absorptivas da mucosa intestinal (Hazzell, 1985, Pabón de Rozo et al, 1986, Van Campen, 1973).

A absorção do ferro "não heme" depende também da influência de componentes da dieta que inibem sua absorção através da formação de quelatos insolúveis ou macromoléculas de baixa biodisponibilidade. O efeito das fibras sobre a absorção do ferro tem sido mostrado através de resultados conflitantes - alguns investigadores têm demonstrado um efeito inibidor, enquanto outros não têm constatado efeito algum (Garcia-Lopez & Lee, 1985). Parece que este efeito depende não somente da quantidade de fibra , mas também da fonte e tipo de fibra consumida. Assim, frações de fibras purificadas geralmente não apresentam a mesma ação como no alimento intacto (Morris, 1983). Fernandez & Phillips (1982) constataram que frações de lignina e hemicelulose exibiram uma capacidade de ligação ao ferro do sulfato ferroso muito maior do que a celulose ou pectina. Por outro lado, Gordon & Chao(1984) demonstraram em ratos anêmicos, um aumento significativo da biodisponibilidade do ferro (sulfato ferroso) de uma dieta purificada quando suplementada tanto com celulose, fitato ou oxalato. Portanto, os diferentes relatos de literatura sobre o assunto podem ser explicados também pelo modelo experimental utilizado nas pesquisas "in vivo".

O papel dos fitatos na absorção do ferro "não heme" ainda não está muito bem esclarecido, como no caso das fibras. O

fitato monoférrico, forma em que 60% do ferro é encontrado no trigo, é altamente solúvel sendo este ferro bem absorvido, enquanto o complexo cálcio-ferro-fitato, formado na presença de cálcio, é relativamente insolúvel e seu ferro é pouco biodisponível (Hazel, 1985, Morris & Ellis, 1976). A interação entre fitato e fibras pode explicar o efeito inibidor dos farelos sobre a absorção do ferro (Morris, 1983). No entanto, a forma em que o fitato se encontra nos alimentos, o pH (quanto mais elevado, maior a afinidade dos fitatos pelo ferro) e o modelo experimental utilizado (ratos ou humanos) são alguns dos fatores que podem determinar o modo de ação dos fitatos sobre a absorção do ferro "não heme" (Hallberg et al, 1989).

Os polifenóis, tais como o tanino, apresentam ação inibidora da absorção do ferro "não heme" já bastante comprovada. O chá é um potente inibidor da absorção do ferro, através da formação de quelatos insolúveis de ferro-tanato (Disler et al, 1975). Uma xícara de chá pode reduzir a absorção de ferro nas refeições a cerca de um terço (Hallberg, 1981c). O café, que também contém compostos polifenólicos, inibe a absorção do ferro (Monsen, 1988). Alguns dos alimentos mais ricos em taninos são o sorgo, tamarindo, chá, soja e trigo.

O efeito dos oxalatos sobre a absorção do ferro "não heme" é ainda mais controvertido do que o das fibras ou fitatos. Existem relatos de literatura que o indicam como potente inibidor (Forth & Rummel, 1973), de efeito neutro (Hallberg, 1981b), ou ainda, como um agente promotor da absorção do ferro (Gordon & Chao, 1984). Gordon & Chao questionam a afirmativa de que a baixa biodisponibilidade do ferro do espinafre seja devido ao seu alto conteúdo em oxalatos e recomendam a realização de mais estudos sobre o assunto.

Não somente substâncias como fibras ou fitatos podem reduzir a biodisponibilidade do ferro, mas também certos alimentos tais como farelos de cereais, produtos de soja, ovo e leite de vaca (Callender et al, 1970, Cook et al, 1981, Morris, 1983, Stekel et al, 1983). Com relação aos produtos de soja, este efeito não tem sido comprovado através de estudos a longo prazo (Monsen, 1988). Neste grupo também estão incluídos o chá e o café, conforme já relatado.

Minerais como o cálcio, fósforo, zinco e cobre podem interferir na absorção do ferro, embora de forma limitada, tanto pela competição por ligantes ou pelo mesmo mecanismo de absorção; no entanto, estas interações tem sido pouco estudadas (Amine & Hegsted, 1971, Chausow & Czarnecki-Maulden, 1988, Garcia-Lopez & Lee, 1985, Snedeker et al, 1982). Em relação aos macronutrientes, a proteína é o único que tem efeito significativo comprovado sobre a absorção do ferro "não heme", segundo Cook (1983). Entretanto, tem-se observado em ratos um aumento na biodisponibilidade do ferro em dietas com elevada concentração de gordura e com maior teor de ácidos graxos saturados (Johnson et al, 1987, Mahoney et al, 1980). No caso dos carboidratos, Fritz et al (1978) constataram uma utilização biológica do ferro semelhante em ratos anêmicos alimentados com dietas contendo sacarose e amido ou apenas glicose. A substituição de glicose por frutose ou lactose aumentou a absorção e retenção do ^{59}Fe em ratos anêmicos, conforme relatado por Pabón de Pozo et al (1986).

O balanço metabólico do ferro, ao contrário do que ocorre com outros minerais, é mantido pela regulação da absorção do ferro dietético, devido à capacidade limitada do organismo em excretar este elemento (Björn-Rasmussen, 1983). Assim, o ferro endógeno vai sendo reciclado de tal forma que a excreção é sem

pre mínima (0,6 a 1,0 mg/dia) e a meia vida do ferro hemático é de aproximadamente oito anos. Portanto, a homeostase no metabolismo do ferro depende primariamente da absorção e não da excreção (Underwood, 1977). Isto evidencia a importância do conhecimento dos fatores que determinam a absorção deste nutriente. Os mecanismos de absorção são complexos e o grau em que o ferro pode ser assimilado pelo organismo varia grandemente intra e inter indivíduos (Amine & Hegsted, 1974, Fairweather-Tait, 1987, Olson et al, 1978). Sendo assim, os estudos sobre o assunto envolvem o uso de modelos experimentais difíceis de serem definidos e a interpretação dos resultados é complicada.

A quantidade de ferro a ser absorvido em uma refeição depende da quantidade e natureza química do ferro da dieta, da presença e concentração de fatores dietéticos que melhoram ou inibem sua absorção, e das reservas de ferro do organismo (Halberg, 1981a). Com relação à natureza química do ferro, o "heme" e o "não heme" são absorvidos por caminhos independentes na mucosa intestinal (Finch & Cook, 1984). O ferro "heme" é solúvel nas condições do intestino delgado, sendo absorvido diretamente para dentro do enterócito como um complexo ferro-porfirina intacto. Dentro da célula da mucosa o ferro é liberado pela ação da enzima heme-oxigenase, como ferro iônico, sendo então incorporado ao "pool" do ferro "não heme" (Thannoun et al, 1987). Devido a este mecanismo absorptivo e solubilidade elevada no pH intestinal, o ferro "heme" não é afetado pelo meio químico ou por nenhum dos fatores dietéticos que alteram pronunciadamente a disponibilidade do ferro "não heme" (Bianchi, 1988).

Para ser absorvido o ferro tem que estar em uma forma solúvel (ionizado ou complexado). No meio ácido do estômago os íons ferrosos e férricos estão na forma hidratada. Com a ele

vação do pH no intestino delgado, os íons férricos formam ma cromoléculas de hidróxidos férricos que se precipitam e não são absorvidas (Smith, 1983). Segundo Forth & Rummel (1973) o ferro é absorvido em duas fases - rápida (no duodeno) e lenta (no jeju no e íleo) e sua absorção é regulada por fatores intraluminiais (pH, tipo e concentração de substâncias ligantes), humorais (eritropoietina, transferrina) e por fatores da mucosa (presença e concentração de ligantes na borda em escova e nos espaços intracelulares, presença de agentes redutores e saturação de ferro nos tecidos).

A transferência do ferro do lúmen inestinal para o sangue envolve duas etapas. A primeira compreende a captação do ferro do lúmen e passagem através da borda em escova com consequente absorção do ferro iônico para dentro do enterócito. O ferro (ionizado ou ligado) é captado na mucosa por ligantes que participam do sistema de transporte de ferro, geralmente proteína, e depende de energia (Forth & Rummel, 1973). Segundo Clydesdale (1983) existem dois caminhos diferentes para absorção do ferro "não heme", de acordo com a valência: os íons férricos podem ser solubilizados pela complexação antes de serem absorvidos e os ions ferrosos podem ser absorvidos não complexados. Os ions ferrosos são mais solúveis e mais disponíveis para absorção que os íons férricos. A segunda etapa envolve a transferência de parte do ferro presente no enterócito para o sangue, por um processo que provavelmente não requer energia e envolve ligação à transferrina para transporte no plasma. O ferro remanescente volta ao lúmen quando as células da mucosa são descamadas do vilus (Linder & Munro, 1977). Faltam

esclarecimentos com respeito ao mecanismo de transferência do ferro do lúmen para os espaços intracelulares e corrente sanguínea.

Além da natureza química do ferro ("heme" ou "não heme"), das interações que podem ocorrer entre o ferro "não heme" e ligantes no lúmen intestinal, o "status" de ferro do indivíduo pode determinar grandes variações nas taxas de absorção do ferro. Assim, o organismo depletado em ferro pode absorver de duas a três vezes mais do que o organismo normal, fato bastante comprovado tanto em humanos (Cook, 1977, Layrisse et al, 1968) quanto em ratos (Buchowski et al, 1989, Dallman et al, 1982). O ferro dietético é utilizado em média de 5 a 10%, no caso de indivíduos com estoques regulares de ferro (500 mg) e de 15 a 20% quando o organismo está com baixas reservas de ferro - menos de 100 mg (Herbert, 1987). A absorção do ferro é regulada ao nível da célula da mucosa em resposta à mudanças no "status" de ferro do organismo. No entanto, não se conhece o mecanismo exato pelo qual o enterócito é informado sobre os estoques de ferro (Björn - Rasmussen, 1983). Este é um mecanismo de controle a longo prazo, já que mudanças nas reservas de ferro são relativamente lentas. Wright et al (1989) sugerem que existe um controle da absorção do ferro à nível de mucosa em resposta ao "status" de ferro das células da mucosa, isto é, um mecanismo de controle a curto prazo.

A proporção em que o ferro é absorvido em um alimento ou refeição por vezes tem sido empregada para definir sua biodisponibilidade. Deste modo, considera-se que o ferro absorvido representa o ferro retido no organismo e que as perdas endógenas são insignificantes, visto que o metabolismo deste elemento é regulado pela absorção, como já mencionado. Devido a isto, estudos da influência relativa dos fatores que promovem ou inibem a absorção do ferro são mais relevantes como subsídios para estimar

sua biodisponibilidade, do que as interações que ocorrem com este nutriente a nível metabólico. Sabe-se que o conceito de biodisponibilidade, para todos os nutrientes, é a medida da proporção do total do nutriente consumido que é retido ou utilizado pelo organismo. No caso do ferro, o termo biodisponibilidade tem sido empregado para expressar diferentes medidas tais como absorção verdadeira ou retenção na forma de ferro hematínico (Fairweather - Tait, 1987, Mahoney et al, 1985). Van Campen (1983) revisando as técnicas usadas para estimar a utilização biológica do ferro, relata que não existe conceito universal para biodisponibilidade, isto é, dois procedimentos podem medir coisas completamente diferentes e o resultado de ambos ser expressado como biodisponibilidade.

Desde a década de trinta, têm-se realizado estudos para avaliar a biodisponibilidade do ferro, conforme descrevem Amine & Hegsted (1971). No entanto, as maiores descobertas foram realizadas somente no final da década de sessenta, através de estudos com isótopos radioativos, em humanos (Hallberg, 1981c, Larysse et al, 1968 e 1969). A descoberta mais importante destes trabalhos foi a de que o ferro dos alimentos de origem animal é absorvido em proporções consideravelmente maiores do que o dos vegetais, dando origem aos conceitos de ferro "heme" e ferro "não heme". Outra descoberta relevante foi a de que o ferro radioativo de um alimento marcado intrinsecamente é absorvido na mesma extensão e proporção que o "pool" de ferro "não heme" marcado extrinsecamente, para a maioria dos alimentos. Desde então, têm-se conduzido estudos em humanos, utilizando-se refeições marcadas extrinsecamente com isótopos radioativos do ferro (geralmente ^{55}Fe e ^{59}Fe) sendo a biodisponibilidade do ferro estimada através da contagem da radioatividade total do organismo ("Whole body coun

ter"), da incorporação do isótopo radioativo nos eritrócitos ou da monitorização do ferro radioativo eliminado pelas fezes (Björn Rasmussen et al, 1973, Consaul & Lee, 1983, Cook et al, 1972).

Por outro lado, o rato tem sido tradicionalmente utilizado para predizer a biodisponibilidade do ferro, através de metodologias menos sofisticadas, mais baratas e portanto, de grande significado prático. Neste grupo estão incluídos os trabalhos clássicos de Fritz et al (1970, 1974, 1975, 1978) e Amine & Hegsted (1972 e 1974), que consistem no uso de doses crescentes de ferro na recuperação de ratos anêmicos e os resultados são relatados como Valor Biológico Relativo do ferro (RBV %) da fonte teste em relação a um padrão (geralmente sulfato ferroso). Mais recentemente, tem-se utilizado esta metodologia modificada, com alteração das variáveis envolvidas na estimativa do RBV (Chao & Gordon, 1983, Gordon & Chao, 1984, Gordon & Godber, 1989). Além disso, Mahoney et al (1974, 1980, 1985, 1987) têm preconizado o uso da proporção do ferro ingerido que é retido na forma de ferro hematínico (HRE %), como medida para predizer a biodisponibilidade do ferro, através da recuperação de ratos anêmicos tratados com uma única dose de ferro. Atualmente, este grupo de pesquisadores tem sugerido a utilização do rato como modelo para predizer a biodisponibilidade do ferro em humanos através do uso de metodologias semelhantes àquelas empregadas em estudos com humanos, isto é, utilização de ratos adultos normais, tratados com doses bem elevadas de ferro, marcado extrinsecamente (Buchowski et al, 1989).

Sabe-se que a biodisponibilidade do ferro nos diferentes alimentos varia grandemente, sendo muito mais elevada para o ferro dos alimentos de origem animal (varia de 11 a 22%, para o peixe e carne respectivamente) que para o ferro encontrado nos

vegetais (de 1% para o arroz até 6% para a soja), conforme observado por Layrisse et al (1969). Entretanto, são os alimentos de origem vegetal que contribuem com a maior proporção do aporte de ferro das dietas - cerca de 90% do ferro ingerido nos países desenvolvidos e até 100% naqueles subdesenvolvidos (Hallberg, 1981c, Zhang et al, 1985). Além disso, a anemia ferropriva é mais comum entre as populações que subsistem consumindo alimentos de origem vegetal como cereais e leguminosas, que podem fornecer quantidades moderadas de ferro, porém de baixa disponibilidade (Acosta et al, 1984, Clydesdale, 1983, Fossi et al, 1987). Portanto, conhecer a quantidade e biodisponibilidade do ferro de fontes vegetais tem uma importância prática considerável (House & Welch, 1987).

O feijão é reconhecidamente um alimento fonte de ferro e de consumo generalizado em nosso meio (Desai et al, 1980, Sgarbieri et al, 1979, Sgarbieri, 1989). Segundo Dutra de Oliveira (1973), nos países da América Central e do Sul, as leguminosas (especialmente os feijões comuns) fazem parte da dieta típica destas populações e são consumidas diariamente, em quantidades que variam de 50 a 100 g. De acordo com os dados do inquérito realizado pelo IBGE (1977), o feijão contribuía com cerca de 30% do aporte total de ferro das famílias estudadas, sendo que em algumas regiões do país este índice atingia 36%. No entanto, pouco se conhece sobre a qualidade nutricional do ferro de feijões, especialmente daqueles cultivares mais consumidos no Brasil.

Estudos sobre a biodisponibilidade do ferro de feijões são escassos e geralmente foram conduzidos em humanos, utilizando marcação isotópica, somente com feijões pretos, sendo en

contradas taxas de absorção reduzidas - de 0,84 a 3,2% (Cook et al, 1972, Layrisse et al, 1968 e 1969, Lynch et al, 1984). Layrisse et al (1968) encontraram uma absorção média mais elevada (7,1%), quando utilizaram indivíduos deficientes em ferro. Segundo Lynch et al (1984), a biodisponibilidade do ferro de leguminosas não tem sido estudada suficientemente, com exceção para a soja, sendo escassos os dados sobre outras leguminosas tais como o feijão.

Nas sementes de leguminosas o ferro está distribuído através do cotilédone, com maior concentração na periferia onde há bastante substância protéica. Nos feijões, a maior parte do ferro está presente como formas insolúveis (dois terços), cerca de 30% como ions ferrosos e o restante como ions férricos e ferro complexado (Hazell, 1985). Por outro lado, as sementes de feijões contêm substâncias tais como fibras, polifenóis e fitatos que podem reagir com o ferro, inibindo sua absorção. Todavia, não se conhece exatamente o papel destes compostos sobre a biodisponibilidade do ferro de feijões (Sgarbieri, 1989).

É de fundamental importância, portanto, estudar a utilização biológica do ferro de feijões, uma vez que constitui um alimento básico de nossa dieta e a principal fonte de ferro para as populações de baixa renda, onde a prevalência de anemia ferropriva é mais elevada. Nestas populações ressalta-se uma maior prevalência entre as crianças de até um ano de idade (lactentes). Neste caso, o feijão entra como alimento de desmame e importante fonte de ferro (Brandalise & Matsuda, 1986, Monteiro, 1988). Segundo Saarinen & Siimes (1979), a introdução de alimentos de origem vegetal neste período, reduz a biodisponibilidade do ferro do leite materno.

Considerando estes fatos, decidiu-se trabalhar com ratos anêmicos para estimar a utilização biológica do ferro do feijão, na forma de farinha do feijão integral e farinha da papa do feijão, como usualmente preparada para alimentação de desmame. O cultivar escolhido para este estudo foi o 'Carioca 80 S.H' (sem halo) ou 'I.A.C. Carioca', desenvolvido pelo Instituto Agrônomo de Campinas, proveniente do cruzamento do cultivar 'Carioca' com a variedade 'Cornell 49-242' (Pompeu & Roston, 1988).

Selecionou-se este feijão por apresentar vantagens agronômicas (Pompeu & Roston, 1988), por ser o mais cultivado no Estado de São Paulo e ainda, por demonstrar melhor valor proteico que o de diferentes variedades de feijões consumidas em nosso meio (Tezoto & Sgarbieri, 1990).

2. OBJETIVOS

A presente investigação foi conduzida no sentido de alcançar os seguintes objetivos:

- Estimar o teor de ferro do feijão 'Carioca 80 S.H.' e seu Valor Biológico Relativo, em ratos anêmicos.
- Determinar o conteúdo e Valor Biológico Relativo do ferro da papa de feijão, na forma utilizada como alimento de desmame, e comparar estes resultados com aqueles obtidos para o feijão integral.
- Comparar os valores de utilização biológica do ferro obtidos através de duas metodologias: Valor Biológico Relativo (RBV%), segundo Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1984) e Índice da Eficiência de Regeneração da Hemoglobina (HRE %), preconizado por Mahoney et al (1974).
- Estimar a utilização biológica do ferro do feijão 'Carioca 80 S.H.' ao nível de 36 mg Fe/kg de ração, semelhante aos requisitos deste nutriente para o rato (National Research Council, 1979), e sua eficiência em recuperar a anemia dos animais neste nível.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Animais

Foram utilizados no experimento 130 ratos (*Rattus norvegicus*) machos, linhagem Wistar, var. Albinos (*Rodentia mammalia*), S.P.F. (Specific Pathogen Free), recém desmamados, pesando entre 42 e 55 g, provenientes da criação do Biotério Central do Campus da Universidade Estadual de Campinas. Os 72 animais anêmicos selecionados para a fase de repleção da hemoglobina, apresentavam ao desmame, peso médio de $48,7 \pm 0,5$ g.

3.1.2. Rações

3.1.2.1. Ração basal, pobre em ferro

A ração basal foi formulada segundo as especificações da AOAC (1984, p. 880), modificada por Fritz et al (1978), cuja composição percentual está apresentada na tabela 1.

Nas tabelas 2 e 3 estão contidas as composições da mistura mineral (isenta de ferro) e vitamínica utilizadas na ração basal, conforme recomendações da AOAC (1984, p. 880-881).

Devido ao grande volume de ração basal necessária ao experimento (fase de depleção - 130 ratos mantidos por 35 dias), confeccionou-se esta ração em lotes de 7 kg cada. Após o preparo de cada lote, determinou-se a concentração protéica e o teor de ferro (contaminante).

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DA RAÇÃO BASAL, POBRE EM FERRO (5 - 7 ppm).

INGREDIENTES	QUANTIDADE
	%
Sacarose	46,25
Amido de milho	23,13
Caseína ^{1/}	20,00
Óleo de soja	5,00
Fosfato monossódico	2,00
Carbonato de cálcio	2,00
Cloreto de potássio	0,50
Sal iodado	0,50
Mistura mineral ^{2/}	0,27
Mistura vitamínica ^{3/}	0,10
Cloreto de colina	0,15
dL - Metionina	0,10

1/ Caseína de boa procedência, baixo teor em ferro, teor protéico = 90 %.

2, 3/ Composição das misturas nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DA MISTURA MINERAL (ISENTA DE FERRO)

SAIS	QUANTIDADE
	%
Sulfato de magnésio	73,8160
Sulfato de zinco	19,6570
Sulfato de manganês	5,7330
Sulfato de cobre	0,7315
Iodeto de potássio	0,0625

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DA MISTURA DE VITAMINAS

VITAMINAS	QUANTIDADE
	%
Vitamina A 500.000 UI/g	1,00
Vitamina D ₃ 200.000 UI/g	0,75
Acetato tocoferol	5,00
Menadiona	0,04
Tiamina	0,30
Riboflavina	0,30
Piridoxina	1,00
Pantotenato de cálcio	1,00
Niacina	3,00
Ácido fólico	0,10
Vitamina B ₁₂ 0,1% em gelatina	2,00
Sacarose	85,51

3.1.2.2. Rações padrões: ração basal adicionada de sulfato ferroso

As rações padrões foram elaboradas adicionando sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, grau analítico, recém adquirido no comércio) à dieta basal pronta, em quantidades tais que fornecessem 6 mg, 12 mg, 24 mg e 36 mg de ferro elementar por quilograma de ração. Na tabela 4 está apresentada a composição das rações basal e padrões em g/kg de cada ingrediente utilizado.

Após o preparo das rações padrões, determinou-se os teores de proteína e ferro.

3.1.2.3. Rações experimentais: ração basal adicionada de farinha de feijão integral e de farinha de papa de feijão

As rações experimentais foram preparadas seguindo a mesma composição da ração basal, sendo apenas suplementadas com doses crescentes de ferro na forma de farinha de feijão. As farinhas foram introduzidas nas rações à custa de amido de milho e caseína, de forma a manter a composição química básica das mesmas. Portanto, as rações ficaram isocalóricas, isoprotéicas e apresentavam o mesmo grau de doçura.

O feijão utilizado no experimento foi o cultivar 'Carioca 80 S.H.' (sem halo) (Pompeu & Roston, 1988), proveniente de um mesmo lote de grãos produzidos na Fazenda Experimental Santa Elisa, Instituto Agronômico de Campinas. Após ser adquirido, o feijão foi armazenado sob refrigeração, em local apropriado, até ser utilizado no preparo das farinhas, quando então contava com um

tempo de estocagem pós-colheita de nove meses. O cozimento do feijão foi feito segundo técnicas de Elias & Bressani (1976) e Gómez Brenes et al (1973), como mostra a figura 1. Nesta figura também está apresentado esquematicamente como foi obtida a farinha do feijão e a farinha da papa do feijão. Todos os recipientes e equipamentos utilizados neste processo foram previamente higienizados com água desionizada sendo usado somente aqueles de material plástico, vidro ou aço inoxidável. Toda água necessária à obtenção das farinhas foi destilada e em seguida, desionizada.

As farinhas prontas foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer, até serem utilizadas no preparo das rações experimentais. Determinou-se a composição centesimal e o teor de ferro destas farinhas.

3.1.2.3.1. Rações experimentais com farinha de feijão integral

A partir da farinha do feijão integral, foram então preparadas as rações FI₆, FI₁₂, FI₂₄ e FI₃₆, com a mesma composição da ração basal, substituindo apenas amido de milho pela farinha do feijão, em quantidades tais que fornecessem 6, 12, 24 e 36 mg de ferro por quilograma de ração, respectivamente. A quantidade de caseína utilizada foi aquela necessária para completar o teor de proteína nas rações, de forma que ficassem com o mesmo nível daquele da ração basal (aproximadamente 19 %). Na tabela 5 estão apresentadas as diferentes quantidades (em g/kg) da farinha do feijão integral, caseína e amido de milho, necessárias para atingir os níveis desejados de ferro e proteína em cada ração. Nesta tabela observa-se também que a quantidade de sacarose foi mantida igual para todas as rações,

exceto para a FI₃₆, onde a adição de uma maior quantidade de farinha de feijão foi compensada à custa também de sacarose. O mesmo nível de sacarose desta ração foi utilizado na formulação da ração Padrão 36, para que as duas rações apresentassem o mesmo grau de doçura (tabelas 4 e 5).

3.1.2.3.2. Rações experimentais com farinha de papa de feijão

Utilizou-se a farinha da papa do feijão 'Carioca 80 S.H.' para a confecção das rações FP₆, FP₁₂ e FP₂₄, de modo que a farinha fornecesse os seguintes níveis de ferro: 6, 12 e 24 mg por quilograma de ração, respectivamente. Os níveis de proteína foram corrigidos com a caseína, para atingir teores semelhantes aos da ração basal e, as quantidades de amido suficientes para completar 100 g. As quantidades dos demais ingredientes foram mantidas idênticas às da ração basal, conforme pode ser observado na tabela 5.

Após o preparo das rações experimentais, determinou-se os teores de proteína e ferro.

TABELA 4 - FORMULAÇÃO DAS RAÇÕES BASAL E PADRÕES

INGREDIENTES	BASAL	PADRÕES ^{1/}			
		P ₆	P ₁₂	P ₂₄	P ₃₆
		g/kg			
Sulfato Ferroso Heptahidratado ^{2/}	-	0,0299	0,0597	0,1195	0,1792
Sacarose ^{3/}	462,5	462,5	462,5	462,5	367,2
Amido de milho	231,3	231,3	231,2	231,2	326,4
Caseína ^{4/}	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0
Óleo de soja	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Fosfato monossódico	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Carbonato de cálcio	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Cloreto de potássio	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Sal iodado	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Mistura mineral	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
Mistura vitamínica	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Cloreto de colina	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
dL - Metionina	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

^{1/} Rações padrões com 6, 12, 24 e 36 mg Fe/kg.

^{2/} Sulfato ferroso heptahidratado, grau analítico, Merck.

^{3/} Teor de sacarose igual para todas as rações, com exceção da P₃₆, cuja quantidade é igual à da ração experimental FI₃₆ (tabela 5).

^{4/} Caseína de boa procedência, baixo teor de ferro, com aproximadamente 90% de proteína.

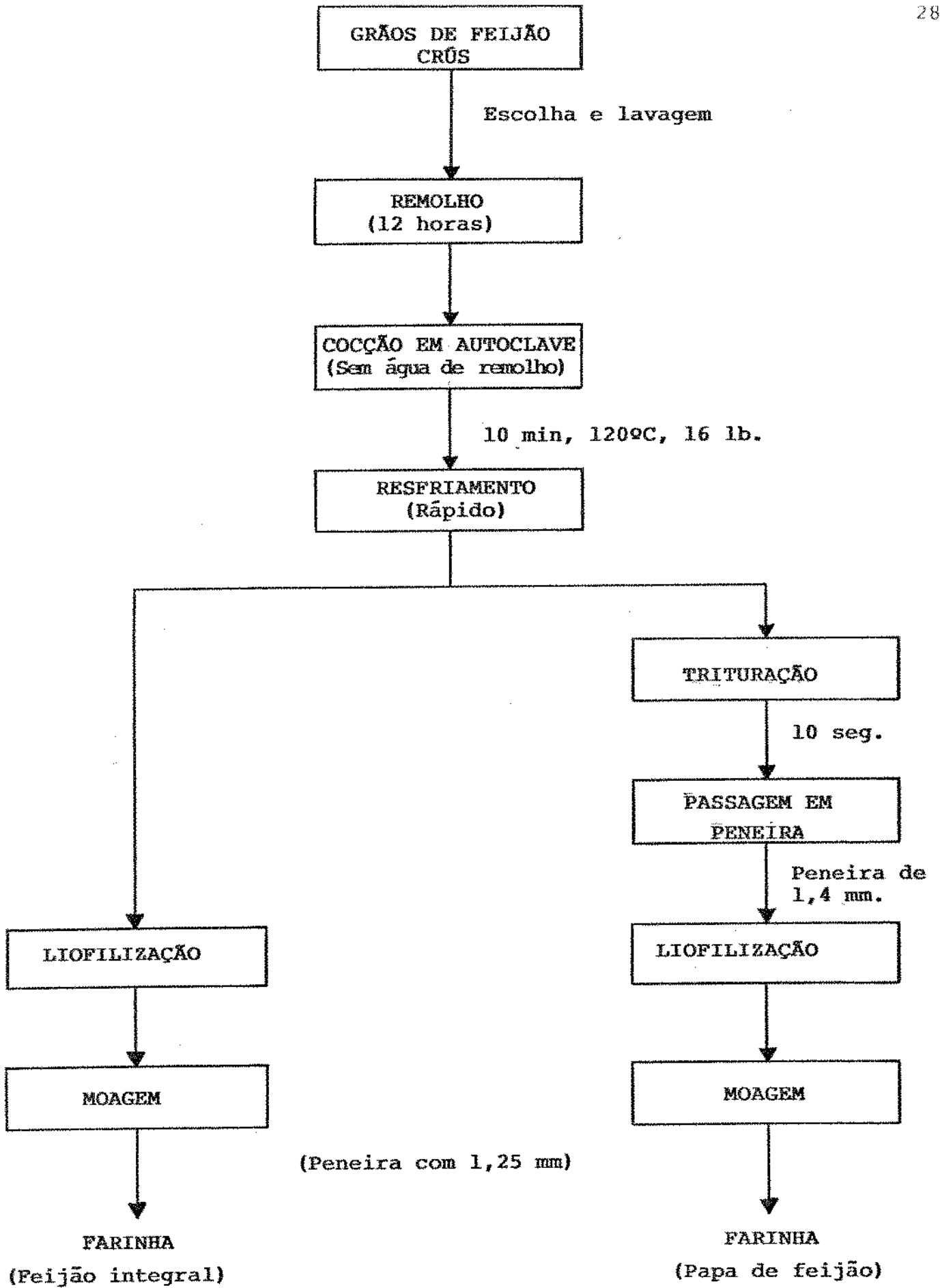


FIGURA 1 - Esquema do processo de obtenção das farinhas do feijão

TABELA 5 - FORMULAÇÃO DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS

INGREDIENTES	FEIJÃO INTEGRAL ^{1/}				PAPA DE FEIJÃO ^{2/}		
	FI ₆	FI ₁₂	FI ₂₄	FI ₃₆	FP ₆	FP ₁₂	FP ₂₄
Sacarose ^{3/}	462,5	462,5	462,5	367,2	462,5	462,5	462,5
Farinha de feijão integral	75,9	151,9	303,8	455,7	-	-	-
Farinha de papa de feijão	-	-	-	-	66,7	133,3	266,7
Amido de milho	177,0	122,4	13,6	-	184,3	137,2	43,2
Caseína ^{4/}	178,4	157,0	113,9	70,9	180,3	160,8	121,4
Óleo de soja	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Fosfato monossódico	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Carbonato de cálcio	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Cloreto de potássio	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Sal iodado	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Mistura mineral	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
Mistura vitamínica	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Cloreto de colina	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
dL - Metionina	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

^{1/} Rações experimentais com farinha de feijão integral (FI) fornecendo 6, 12, 24 e 36 mg Fe/kg de ração, respectivamente.

^{2/} Rações experimentais com farinha de papa de feijão (FP) fornecendo 6, 12 e 24 mgFe/kg de ração, respectivamente.

^{3/} Teor de sacarose igual para todas as rações, com exceção da FI₃₆, onde a adição da farinha de feijão integral não pôde ser feita apenas à custa de amido de milho.

^{4/} Caseína de boa procedência, baixo teor de ferro, com aproximadamente 90% de proteína.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Determinações químicas

A composição centesimal das farinhas do feijão, elaboradas conforme esquema apresentado na figura 1, foi obtida segundo métodos preconizados pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985), com exceção do nitrogênio total. O teor protéico foi determinado também na caseína e nas rações formuladas. Ainda, analisou-se o conteúdo de ferro nas farinhas e nas rações. Para tanto, foram realizadas as seguintes determinações químicas:

3.2.1.1. Umidade ou voláteis a 105°C

A determinação da umidade foi realizada por gravimetria, com secagem em estufa regulada a 105°C, até peso constante (IAL, 1985, p. 21-22).

3.2.1.2. Cinzas ou resíduo mineral fixo

As cinzas foram determinadas por carbonização seguida de incineração da matéria orgânica em mufla a 550°C, por gravimetria (IAL, 1985, p. 27-28).

3.2.1.3. Extrato etéreo (lipídios)

Foram determinados por extração com éter etílico (grau analítico), utilizando extrator intermitente de Soxhlet (IAL, 1985, p. 42 - 43).

3.2.1.4. Nitrogênio total (proteína bruta)

Foi determinado pelo método Kjeldahl, em escala semimicro (AOAC, 1984, p. 156-157), e convertido em proteína bruta usando os fatores 6,38 para a caseína e 6,25 para o feijão.

3.2.1.5. Fibra

Foi determinada por digestão ácida e alcalina, por gravimetria (IAL, 1985, p. 54 - 56).

3.2.1.6. Fração livre de nitrogênio (carboidratos)

O conteúdo de carboidratos foi calculado por diferença, considerando que a soma de todos os componentes do produto corresponde a 100%.

3.2.1.7. Ferro

O teor de ferro foi determinado pelo método de espectrofotometria de absorção atômica. As amostras foram preparadas utilizando digestão lenta com ácido nítrico à frio (5 mL/g de amostra) e à quente (mais 5 mL/g de amostra), e com ácido perclórico (2 mL/g de amostra) à quente e, em seguida, diluição do material digerido a 50 mL com água desionizada, segundo Saruge & Haag (1974). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Perkin-Elmer, mod. 360), equipado com sistema óptico de duplo feixe, lâmpada de catodo oco, com sistema de correção de "background" e calibrado nas seguintes condições: região ultravioleta, comprimento de onda - 248,3 nm, fenda - 0,2 nm, em condições de pressão e fluxo de gases que permitiram obtenção da chama oxidante. Como padrão foi utilizado o sulfato ferroso amoniacal, nas concentrações 0,0 - 20,0 ug/mL. Os resultados foram obtidos em absorbância, em triplicata, e expressos em ppm (mg/kg do produto).

Toda a vidraria e materiais em geral necessários à preparação da amostra e leitura no espectrofotômetro, foram descontaminados cuidadosamente com água destilada, ácido clorídrico a 25%, água desionizada, Na₂ EDTA à 10% em pH 8 e finalmente, com água desionizada.

3.2.2. Preparo das rações

Para a formulação das rações necessárias ao experimento, foram utilizados somente recipientes e outros utensílios de material plástico, vidro ou aço inoxidável. Todo material, antes de ser usado, foi previamente descontaminado com ácido nítrico p.a. à 25% durante um período mínimo de duas horas (este banho era renovado a cada quatro vezes de uso) e em seguida, enxaguados abundantemente com água desionizada e secos à temperatura ambiente, devidamente protegidos contra qualquer contaminação ambiental.

Os ingredientes das rações eram misturados manualmente, em recipiente plástico, tomando-se o cuidado de acrescentar um a um, por ordem crescente de peso. Em seguida, a mistura formada era passada em peneira de plástico, de um recipiente a outro, no mínimo sete vezes. O material que ficava retido na peneira era triturado em graal de porcelana e novamente peneirado. Após acrescentar o óleo vagorosamente, a ração obtida era passada em peneira por mais cinco vezes.

Todos os componentes das rações foram selecionados de modo a apresentarem o mínimo de contaminação com ferro. As rações prontas foram armazenadas em sacos plásticos e conservadas em freezer.

3.2.3. Ensaio biológico: depleção e repleção da hemoglobina

A metodologia empregada para avaliar a utilização biológica do ferro das farinhas do feijão, foi a recomendada pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1984, p. 880-881), conforme Fritz et al (1974), que consiste na recuperação dos níveis de hemoglobina em ratos anêmicos, tratados com doses crescentes de ferro na ração.

Este modelo experimental indicado para estudar a bio-disponibilidade do ferro de alimentos, em ratos, é um modelo curativo e portanto, compreende um ensaio biológico com duas fases: a primeira, a fase de obtenção de ratos anêmicos (depleção) e a segunda, a de reposição dos níveis de hemoglobina dos animais (repleção), conforme delineamento experimental apresentado na figura 2.

3.2.3.1. Primeira fase - depleção da hemoglobina dos ratos

Nesta fase, ratos machos recém-desmamados foram colocados em gaiolas individuais, de aço inoxidável, em condições ambientais controladas: temperatura - 22°C; umidade relativa do ar - em torno de 70%; ciclo de luz - 12 horas no claro e 12 horas no escuro, e com ventilação adequada. Foram alimentados com ração basal, pobre em ferro (5-7 ppm) e água desionizada "ad libitum" durante 35 dias. Diariamente era efetuada a troca de água e ração. A limpeza das gaiolas e do suporte era realizada sempre que necessário. Os ratos foram pesados semanalmente.

Ao final deste período, o sangue de cada animal foi coletado através da secção de um pequeno segmento da cauda, para a determinação da concentração de hemoglobina sanguínea. Os ra

tos foram considerados anêmicos quando o nível de hemoglobina estava ao redor de 6 g/dL de sangue.

3.2.3.2. Segunda fase - repleção da hemoglobina

Na segunda fase, 72 animais depletados (anêmicos), obtidos na primeira fase, foram selecionados para compor 12 grupos de 6 ratos cada um. Devido à grande variabilidade dos parâmetros peso e hemoglobina entre os animais, a distribuição dos ratos por grupo foi efetuada através da formação de blocos casualizados (Pimentel Gomes, 1987, p. 56-76), segundo os dados de peso (g)/hemoglobina (g/dL) de cada rato. Assim, obteve-se a menor variação possível intra e inter grupos, sendo que todos os grupos formados apresentaram valores médios do coeficiente peso/hemoglobina similares ($32,2 \pm 0,4$).

Nesta fase, cada grupo de animal recebeu um tipo diferente de ração (conforme distribuição aleatória) e água de sionizada "ad libitum", durante 14 dias. Deste modo, foram formados os seguintes grupos:

Grupo Controle Negativo: grupo constituído por 6 animais que permaneceram recebendo ração basal (pobre em ferro).

Grupo Padrão: grupo constituído por 24 animais que consumiram ração basal adicionada de sulfato ferroso em diferentes níveis (6, 12, 24 e 36 mg de ferro por quilograma de ração).

Grupo Experimental: grupo constituído por 42 animais que consumiram ração basal contendo as farinhas do feijão como fonte de ferro, em diferentes níveis.

Durante as duas semanas de repleção, diariamente, no período da manhã, realizava-se a limpeza nas gaiolas e su_uporte (se necessário) e, no período da tarde, a troca de água e ração. O consumo de ração foi controlado e os ratos foram pe_usados semanalmente. Todas as pesagens necessárias foram reali_uzadas em balança digital eletrônica (Acatec/Tecnal mod. BEC 1000), com precisão de 0,01g. Após este período, o sangue dos ratos foi coletado da cauda novamente, para a determinação da concentração de hemoglobina.

3.2.4. Dosagem de hemoglobina

No início e final do período de repleção foram co_uletadas amostras de 20 μ l de sangue dos animais, para a deter_uminação da concentração de hemoglobina (grama/dL), conforme o método de cianometahemoglobina (Crosby et al., 1954). O san_ugue foi coletado da cauda dos ratos através da secção do menor segmento possível, a fim de minimizar o "stres" do ani_umal e evitar sangramentos posteriores. Para o sangue fluir com maior facilidade, antes da coleta, a cauda do animal era colo_ucada imersa em água aquecida (em torno de 50°C), durante al_uguns instantes e massageada com algodão embebido em álcool e, se necessário, também com pomada Xilocaína (Lidocaína). Uma vez realizada a coleta, o sangue era transferido rapidamente para um tubo contendo 5 mL de solução de Drabkin (AOAC, 1984, p. 881). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotô_umetro (Incibrás, mod. DF 200), na região do visível, compri_umento de onda - 540 nm. Os resultados obtidos em absorbância fo_uram convertidos em g Hb/dL através do produto da absorbância por um fator, estimado a partir de um padrão de hemoglobina com concentração igual a 10 g/dL.

RATOS MACHOS RECÉM DESMAMADOS
130 RATOS

RAÇÃO BASAL
Pobre em Ferro

D
E
P
L
E
Ç
A
O

35 dias

RATOS ANÊMICOS

14 DIAS

RAÇÃO BASAL
6 ratos

RAÇÕES EXPERIMENTAIS
42 ratos

RAÇÕES PADRÕES (P)
24 ratos

R
E
P
L
E
Ç
A
O

FEIJÃO INTEGRAL (FI)

PAPA DE FEIJÃO (FP)

FI₆
+6 mg
Fe/kg

FI₁₂
+12 mg
Fe/kg

FI₂₄
+24 mg
Fe/kg

FI₃₆
+36 mg
Fe/kg

FP₆
+6 mg
Fe/kg

FP₁₂
+12 mg
Fe/kg

FP₂₄
+24 mg
Fe/kg

P₆
+6 mg
Fe/kg
(FeSO₄)

P₁₂
+12 mg
Fe/kg
(FeSO₄)

P₂₄
+24 mg
Fe/kg
(FeSO₄)

P₃₆
+36 mg
Fe/kg
(FeSO₄)

FIGURA 2 - Delineamento experimental.

3.2.5. Determinação da utilização biológica (Biodisponibilidade %) do ferro

A partir dos dados obtidos no ensaio biológico de terminou-se a biodisponibilidade (%) do ferro, através dos se guintes métodos:

- RBV (%): Valor biológico relativo ou biodisponibilidade relativa, a partir da regressão linear da concentra ção de hemoglobina ao final do período experimental em função do nível de suplementação de ferro, estimado pela taxa de in clinação da reta, conforme descrito por Hegsted et al (1968) e Amine et al (1972). Para tanto, efetuou-se a regressão linear por tratamento, utilizando-se os valores correspondentes aos diferentes níveis de suplementação testados (0, 6, 12 e 24 mg Fe/kg de ração), segundo AOAC (1984, p. 881). RBV, portanto, foi calculado como a taxa de inclinação da curva dose-resposta das rações experimentais em relação à inclinação da curva das rações padrões (sulfato ferroso como referência).

- HRE (%): Eficiência de regeneração da hemoglobi na ou porcentagem de retenção do ferro dietético na forma de ferro hematínico, segundo Mahoney et al (1974). O cálculo des te índice é feito dividindo-se o ganho de ferro hematínico (mg) pelo total de ferro ingerido (mg) durante o período de reple ção e multiplicando-se este quociente por 100. Os valores de HRE foram então calculados para cada animal, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{HRE (\%)} = \frac{\text{mg Hb-Fe (final)} - \text{mg Hb-Fe (inicial)}}{\text{mg Fe ingerido}} \times 100$$

Sendo que Hb-Fe = ferro da hemoglobina ou ferro he matínico, estimado utilizando-se o peso (g) e a concentração

sangüínea de hemoglobina (g/dL) dos animais, no início e final do período de repleção. Para isso, considerou-se que o volume total de sangue do rato corresponde a 6,7% do seu peso corporal e que 1 g de hemoglobina contém 3,35 mg de ferro (Thannoun et al, 1987), conforme o seguinte esquema:

$$\text{mgHb-Fe} = \frac{\text{Peso do rato (g)}}{100} \times \frac{6,7 \text{ mL sangue}}{100 \text{ g de peso}} \times \frac{\text{gHb}}{100 \text{ mL de sangue}} \times \frac{3,5 \text{ mgFe}}{\text{g Hb}}$$

HRE (%) foi determinado para o ferro suplementado ao nível de 24 e 36 mg/kg de ração (P_{24} e P_{36} ; FI_{24} e FI_{36} ; FP_{24}). Determinou-se também a eficiência relativa ou biodisponibilidade relativa ao sulfato ferroso (HRE do $FeSO_4 = 100\%$), para o ferro do feijão integral e da papa do feijão.

3.2.6. Metodologia estatístico-experimental

Na presente investigação, o delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, contendo doze tratamentos e seis repetições, como já mencionado. Os resultados obtidos estão expressos na forma de média \pm erro padrão da média. Quando necessário, os dados foram submetidos à análise de variância e Teste F. Para testar diferenças entre médias utilizou-se o Teste de Tukey. Para verificar a influência da dose de ferro sobre diferentes variáveis estudadas, efetuou-se a análise de regressão linear, pelo método dos quadrados mínimos. No caso da determinação do Valor Biológico Relativo do ferro (RBV %), utilizou-se a inclinação da reta de regressão (b) da

fonte de ferro testada, em relação à inclinação da reta do padrão (FeSO_4). Empregou-se o Teste t para testar a significância dos coeficientes de regressão (b) e compará-los entre si (Pimentel Gomes, 1985, Stell & Torrie, 1960).

4. RESULTADOS

4.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FARINHAS DO FEIJÃO E DAS RAÇÕES

Na tabela 6 estão apresentadas as composições centesimais e os teores de ferro das farinhas de feijão. Como pode ser observado, a composição química das duas farinhas é semelhante, isto é, contêm aproximadamente 24% de proteína; 1,5% de lipídios e cerca de 3% de cinzas. Constatou-se diferenças nos teores de fibra - 3,19 e 2,45%, e de ferro - 7,90 e 9,03 mg/100 g para feijão integral e papa de feijão, respectivamente. Nesta tabela está apresentada também a composição química das farinhas ajustada a valores de umidade igual a 10%, para facilitar a comparação com dados de literatura.

As concentrações protéicas e teores de ferro das rações formuladas estão contidas na tabela 7. Observa-se que todas as rações apresentam teores protéicos semelhantes (cerca de 19%), conforme o esperado, sendo encontrado um valor mínimo de 18,46% (ração FP₆) e máximo de 20,37% (ração FP₁₂).

TABELA 6 - COMPOSIÇÕES CENTESIMAIS E TEORES DE FERRO DAS FARINHAS DO FEIJÃO 'CARIOCA 80 S.H.' (COZIDO E LIOFILIZADO)

COMPONENTES	FEIJÃO INTEGRAL		PAPA DE FEIJÃO	
	MATÉRIA ÚMIDA	BASE 10 ^{1/}	MATÉRIA ÚMIDA	BASE 10
	g%			
Umidade	4,60	10,00	5,10	10,00
Proteínas	24,22	22,85	24,57	23,30
Lipídios	1,41	1,33	1,70	1,61
Fibra	3,19	3,01	2,45	2,32
Cinzas	3,13	2,95	2,89	2,74
Carboidratos	63,45	59,86	63,29	60,03
Ferro (mg/100 g)	7,90	7,45	9,03	8,57

1/ Valores percentuais das amostras ajustados para 10% de umidade.

A ração basal apresentou um conteúdo médio de ferro (contaminante) de 5,7 mg/kg de ração. A composição em ferro (mg/kg) das rações padrões está de acordo com a quantidade de ferro elementar adicionado à ração basal, na forma de sulfato ferroso. Assim, encontrou-se 12,00; 18,70; 31,70 e 41,30 mg Fe/kg para as rações P₆, P₁₂, P₂₄ e P₃₆, respectivamente. Da mesma forma, os teores de ferro das rações experimentais estão dentro dos limites esperados, isto é, níveis de 6, 12, 24 e 36 mg Fe/kg de ração adicionados na forma de farinha de feijão, mais a quantidade de ferro basal - em torno de 5,7 mg/kg. Constatou-se um teor de ferro um pouco menor na ração FI₃₆ em relação ao da ração P₃₆ (40,00 e 41,30 mg Fe/kg, respectivamente), ambas com a mesma quantidade de ferro adicionado, variando ape

nas a fonte - farinha de feijão integral e sulfato ferroso, respectivamente. Por outro lado, as rações FI_{12} e FI_{24} apresentaram um teor de ferro um pouco mais elevado do que daqueles das rações padrões e experimentais (FP) correspondentes, isto é, P_{12} , P_{24} e FP_{12} e FP_{24} , conforme pode ser observado na tabela 7.

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA (PROTEÍNA E FERRO) DAS RAÇÕES UTILIZADAS NO EXPERIMENTO

RAÇÕES	PROTEÍNA	FERRO	
		ADICIONADO	DOSADO
	g %	mg/kg ração	
Basal	19,68	0,00	5,70
Padrões ^{1/}			
P ₆	19,71	6,00	12,00
P ₁₂	19,33	12,00	18,70
P ₂₄	19,53	24,00	31,70
P ₃₆	19,91	36,00	41,30
Feijão integral ^{2/}			
FI ₆	19,36	6,00	11,70
FI ₁₂	19,34	12,00	20,30
FI ₂₄	20,24	24,00	33,70
FI ₃₆	20,15	36,00	40,00
Papa de feijão ^{3/}			
FP ₆	18,46	6,00	12,30
FP ₁₂	20,37	12,00	18,30
FP ₂₄	19,24	24,00	32,00

1/ Rações padrões contendo 6, 12, 24 e 36 mg Fe (FeSO₄)/kg, respectivamente.

2/ Rações experimentais com farinha de feijão integral (FI) fornecendo 6, 12, 24 e 36 mg Fe/kg, respectivamente.

3/ Rações experimentais com farinha de papa de feijão (FP) fornecendo 6, 12 e 24 mg Fe/kg, respectivamente.

4.2. ENSAIO BIOLÓGICO

4.2.1. Fase de depleção

No início do experimento realizou-se determinação da concentração de hemoglobina em uma amostra de 30 ratos recém desmamados, selecionados ao acaso, encontrando-se níveis médios de $13,79 \pm 0,33$ g Hb/dL de sangue.

Os dados de peso, durante a fase de depleção, dos 72 animais selecionados para a segunda fase do experimento, estão contidos na tabela 8. Nesta tabela também se encontram os pesos médios semanais de uma amostra de seis ratos que receberam ração comercial de biotério (ração para ratos Labina, da Purina), durante o mesmo período, mantidos sob as mesmas condições experimentais. Apesar deste grupo de animais não estar incluído no método de depleção e repleção de hemoglobina utilizado na presente investigação, ele foi introduzido para fornecer mais informações sobre a influência do ferro na taxa de crescimento dos ratos e assim, obter-se mais elementos para a discussão dos resultados.

Observa-se na tabela 8, uma diferença entre os pesos médios dos dois grupos já na primeira semana, que vai se intensificando até chegar a ser de 43,4 g ao final do período (diferença significativa para $p \leq 0,05$), quando então os animais se encontravam com aproximadamente 56 dias de idade. As curvas de regressão relativas a estes dados estão apresentadas na figura 3.

4.2.2. Fase de Repleção

Os resultados obtidos no período de recuperação dos níveis de hemoglobina (14 dias) estão apresentados na tabela 9 (peso inicial, final e ganho e, hemoglobinas inicial, final e variação) e na tabela 10, que mostra o consumo de ração e os resultados dos cálculos referentes ao ferro ingerido, ganho de hemoglobina total e de ferro hematínico dos 12 grupos de animais estudados.

Na tabela 9 observa-se que os valores médios de peso e hemoglobina iniciais não apresentaram diferenças significativas entre si ($p \leq 0,05$), com exceção para o peso inicial do grupo padrão 6 ($208,2 \pm 10,8$ g), maior que os do grupo padrão 36 e FI₆ ($168,2 \pm 5,8$ g e $166,2 \pm 7,2$ g, respectivamente), embora essas diferenças não sejam significativas ao nível de 1% de probabilidade. O menor ganho de peso no período foi o do grupo basal ($33,6 \pm 3,1$ g) e o maior foi o do grupo padrão 36- $87,5 \pm 5,0$ g (diferença significativa para $p \leq 0,05$). O peso médio e concentração média de hemoglobina no início do período de regeneração foi de $188,0 \pm 2,8$ g e $5,88 \pm 0,10$ g/dL, respectivamente, para os 72 animais utilizados no experimento. O grupo padrão 36 apresentou um ganho de hemoglobina de $9,41 \pm 0,50$ g (hemoglobina inicial de $5,70 \pm 0,40$ e final de $15,18 \pm 0,70$ g), que é estatisticamente maior que o de todos os demais grupos de ratos ($p \leq 0,05$). O grupo basal apresentou uma redução de $0,63 \pm 0,22$ g/dL nos seus níveis de hemoglobina. Os grupos padrões apresentaram ganhos de hemoglobina maiores do que daqueles dos grupos experimentais, em todos os níveis de suplementação de ferro estudados (diferença significativa somente para o grupo padrão 36, ao nível de 5% de probabilidade). Os ganhos de hemoglobina

foram semelhantes entre os grupos experimentais, para cada dose de ferro testada. Todos os dados de peso e hemoglobina estão expressos graficamente nas figuras 4 e 5, respectivamente.

O consumo médio de ração e de ferro foi maior quanto mais elevada a dose de ferro recebida por cada grupo, conforme pode ser observado na tabela 10, com exceção do grupo FI₃₆ que consumiu menor quantidade de ração do que o grupo FI₂₄ (260,2 ± 5,4 g e 264,0 ± 9,2 g, respectivamente). De acordo com o esperado, constatou-se um menor consumo de ração e de ferro no grupo basal (145,0 ± 5,2 g e 0,83 ± 0,02 mg, respectivamente) e um consumo mais elevado no grupo padrão 36 (315,3 ± 13,3 g e 13,02 ± 0,55 mg, respectivamente). O ferro ingerido foi calculado utilizando-se os dados de consumo de ração e teor de ferro dosado em cada ração (tabela 7). As diferenças observadas na ingestão de ferro em cada tratamento são significativas ($p \leq 0,05$). Os dados de ganho total de hemoglobina foram estimados a partir dos valores de concentração de hemoglobina (g/dL) e do volume total de sangue do rato (6,7% do seu peso corporal), no início e final do período de repleção. A partir destes dados calculou-se o ganho de ferro hematínico no período, considerando-se que 1 g de hemoglobina contém 3,35 mg de ferro. Os valores encontrados para estes cálculos estão contidos na tabela 10. Observa-se que o ganho total de hemoglobina e de ferro hematínico é tanto maior quanto mais elevado o teor de ferro da ração, com exceção do grupo FI₃₆ que, da mesma forma que para o consumo de ração, apresentou um ganho de 1,30 ± 0,06 g Hb e de 4,37 ± 0,20 mg de ferro hematínico, menor do que daquele do grupo FI₂₄ - 1,35 ± 0,11 g Hb e 4,53 ± 0,36 mg Fe hematínico (diferenças não significativas para $p \leq 0,05$). O maior ganho de hemoglobina total

foi de $1,97 \pm 0,15$ g e de ferro hematínico, $6,59 \pm 0,49$ mg, ambos relativos ao grupo padrão 36.

A tabela 11 apresenta os resultados das análises de variância (quadrados médios e coeficientes de variação) para algumas das variáveis encontradas nas tabelas 9 e 10. Observa-se que em todos os casos foram constatadas diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade, para o efeito de tratamentos. O menor coeficiente de variação encontrado foi para o ferro ingerido (9,75%) e o maior para variação na concentração de hemoglobina (27,35 %).

TABELA 8 - PESO MÉDIO (+ ERRO PADRÃO DA MÉDIA) DE ANIMAIS SEGUNDO O TEMPO (SEMANAS) E TIPO DE RAÇÃO CONSUMIDA, DURANTE A FASE DE DEPLEÇÃO

RAÇÃO	Nº DE ANIMAIS	SEMANAS					
		0	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
Basal (pobre em Fe)	72	48,7 _{+0,5}	79,8 _{+0,9}	110,4 _{+1,2}	137,6 _{+1,6}	163,3 _{+2,2}	188,0 _{+2,8} ^a
Comercial	6	48,4 _{+1,2}	82,6 _{+1,9}	121,5 _{+3,3}	153,7 _{+4,0}	193,2 _{+4,7}	231,4 _{+6,6} ^b

a, b) Valores estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

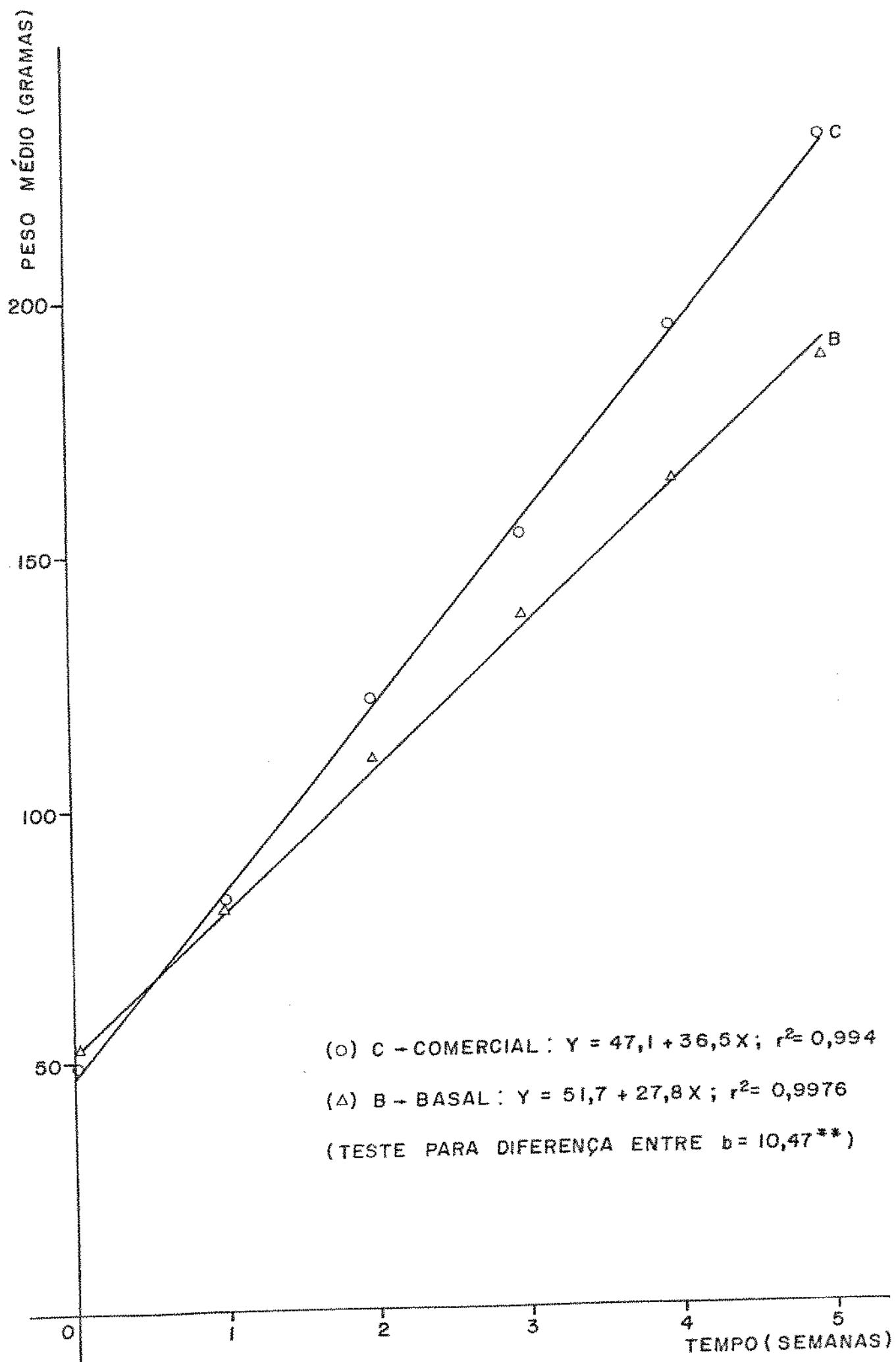


FIGURA 3 - Regressão linear entre o peso médio de ratos (g) e o tempo de experimento (semana) para ração comercial e ração basal (pobre em ferro).

TABELA 9 - PESO E HEMOGLOBINA DE RATOS ANÊMICOS ALIMENTADOS DURANTE A FASE DE REPLEÇÃO (14 DIAS) COM RAÇÕES BASAL (POBRE EM FERRO), PADRÕES - P (SULFATO FERROSO COMO FONTE DE FERRO) E EXPERIMENTAIS CONTENDO FEIJÃO INTEGRAL (FI) OU PAPA DE FEIJÃO (FP) COMO FONTE DE FERRO^{1,2/}

RAÇÕES	PESO			HEMOGLOBINA		
	INICIAL	FINAL	VARIAÇÃO	INICIAL	FINAL	VARIAÇÃO
	g			g/dL		
Basal	201,9±4,5 ^{ab}	235,5±5,8 ^{ab}	33,6±3,1 ^f	6,23±0,48 ^a	5,60±0,28 ^f	-0,63±0,22 ^g
Padrões						
P ₆	208,2±10,8 ^a	251,0±11,7 ^{ab}	42,8±3,8 ^{ef}	6,30±0,39 ^a	8,34±0,38 ^{de}	2,28±0,25 ^{ef}
P ₁₂	205,6±7,1 ^{ab}	257,8±9,7 ^{ab}	52,2±3,6 ^{cde}	6,20±0,34 ^a	10,78±0,41 ^{cd}	4,53±0,45 ^{cd}
P ₂₄	203,2±15,5 ^{ab}	269,8±17,7 ^a	66,7±3,4 ^{bcd}	6,22±0,34 ^a	13,74±0,79 ^{ab}	7,42±0,85 ^{ab}
P ₃₆	168,2±5,8 ^b	255,8±9,4 ^{ab}	87,6±5,0 ^a	5,70±0,40 ^a	15,18±0,70 ^a	9,41±0,50 ^a
Feijão Integral						
FI ₆	166,2±7,2 ^b	216,2±10,6 ^b	50,0±3,9 ^{def}	5,62±0,38 ^a	6,94±0,39 ^{ef}	1,32±0,27 ^{efg}
FI ₁₂	189,0±6,5 ^{ab}	247,9±6,7 ^{ab}	58,9±3,0 ^{bcde}	5,77±0,39 ^a	9,00±0,35 ^{de}	3,23±0,56 ^{de}
FI ₂₄	188,2±6,3 ^{ab}	258,7±4,7 ^{ab}	70,5±2,9 ^{abc}	5,69±0,28 ^a	11,93±0,69 ^{bc}	6,24±0,54 ^{bc}
FI ₃₆	170,3±5,2 ^{ab}	243,0±4,9 ^{ab}	72,6±3,0 ^{ab}	5,67±0,37 ^{2a}	11,99±0,50 ^{bc}	6,32±0,34 ^{bc}
Papa de feijão						
FP ₆	169,3±10,2 ^{ab}	221,0±9,3 ^b	51,7±3,5 ^{def}	5,74±0,40 ^a	6,66±0,42 ^{ef}	0,93±0,20 ^{fg}
FP ₁₂	194,6±5,7 ^{ab}	245,3±7,9 ^{ab}	50,7±4,6 ^{def}	5,77±0,29 ^a	8,33±0,52 ^{de}	2,56±0,30 ^{def}
FP ₂₄	191,1±6,6 ^{ab}	257,5±5,8 ^{ab}	66,4±3,9 ^{bcd}	5,70±0,24 ^a	11,70±0,59 ^{bc}	6,01±0,71 ^{bc}

^{1/} Valores médios ± erro padrão da média para seis animais.

^{2/} Valores em cada coluna seguidos da mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (p ≤ 0,05).

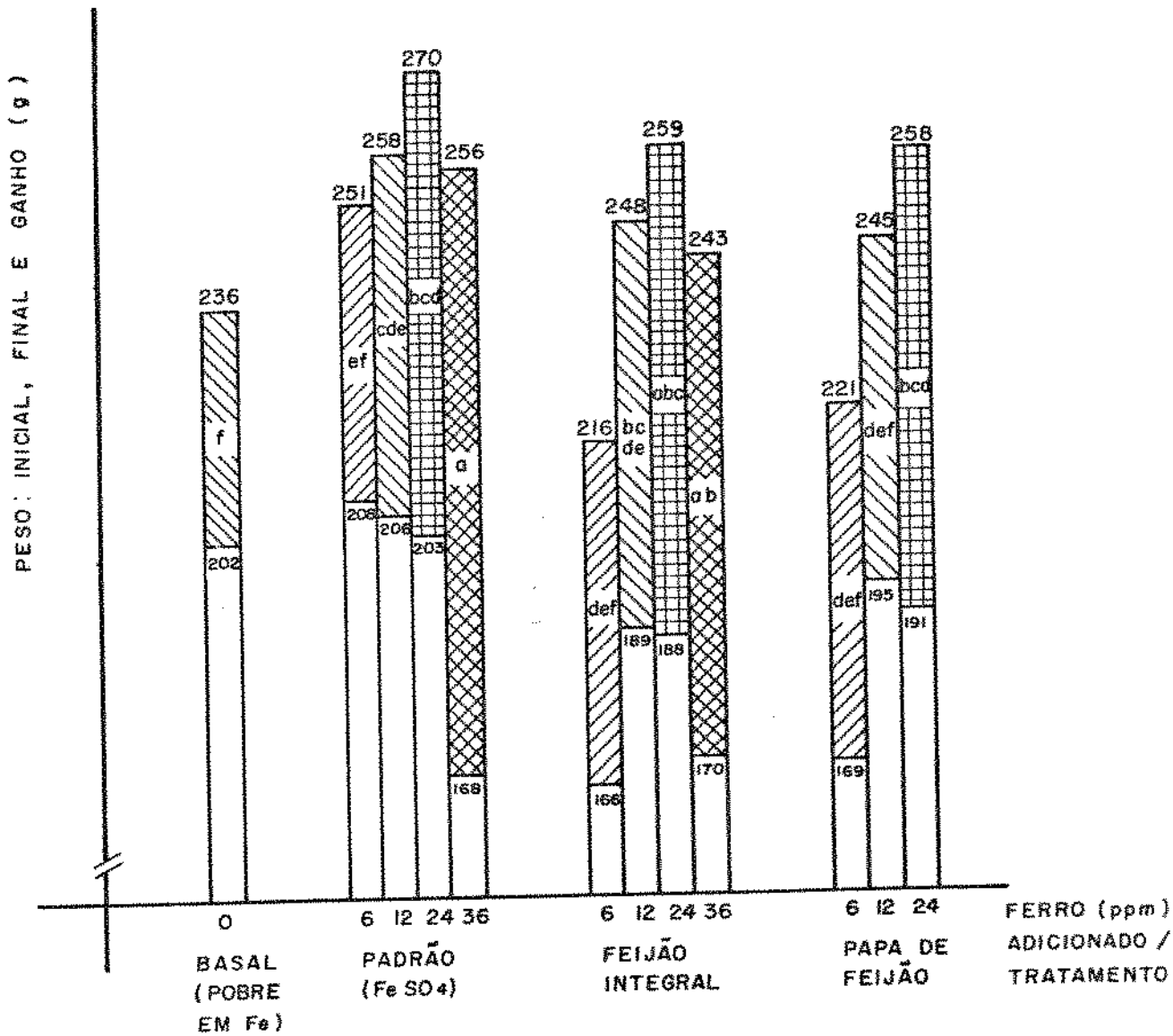


FIGURA 4 - Respostas no crescimento de ratos anêmicos alimentados durante a fase de repleção (14 dias) com ração basal (pobre em ferro) e rações suplementadas com ferro do sulfato ferroso, feijão integral ou papa de feijão. Os pesos iniciais estão na parte inferior de cada barra e os pesos finais, na parte superior (média para 6 animais). Barras contendo a mesma letra representam ganhos de peso que não diferem estatisticamente entre si (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

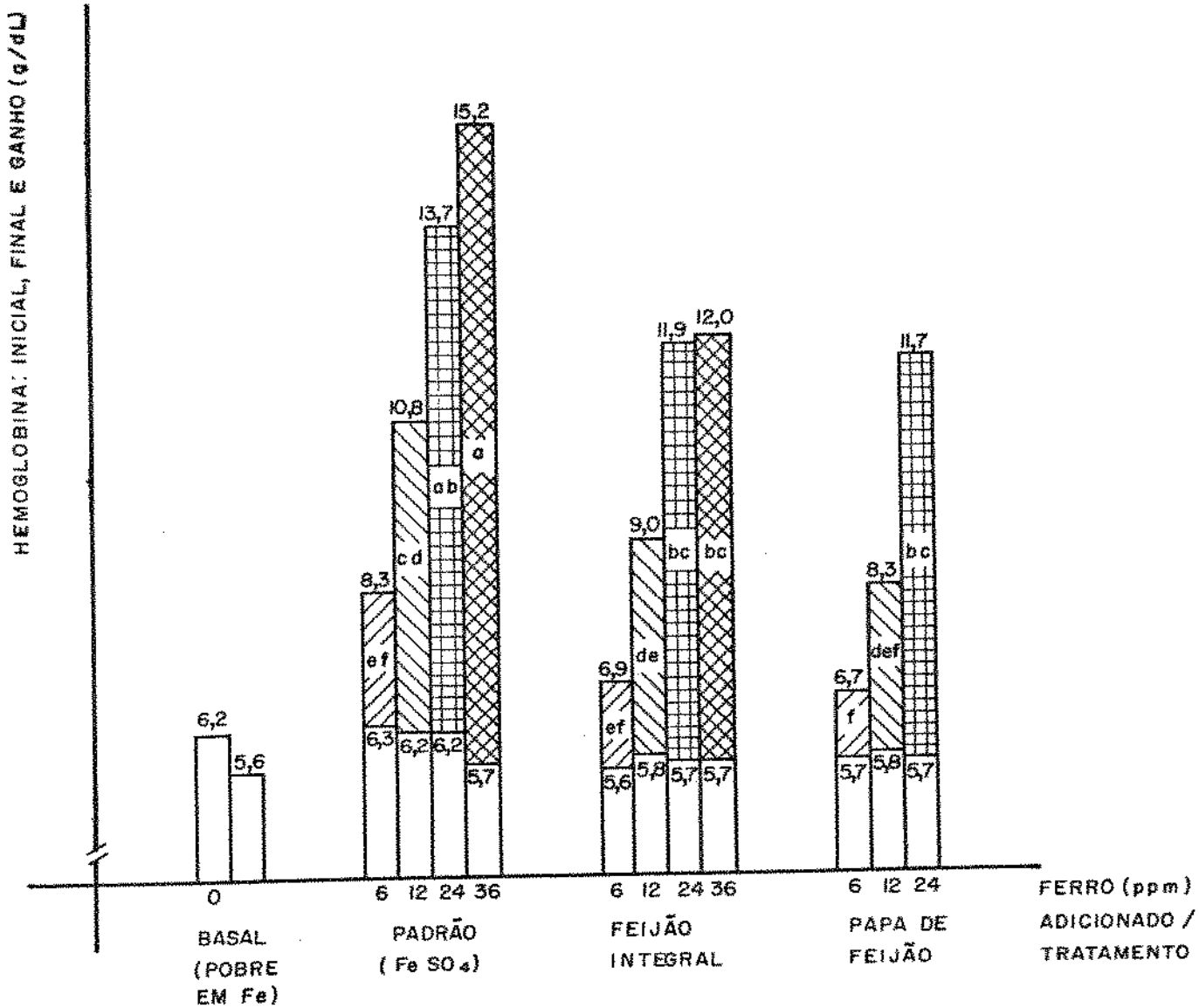


FIGURA 5 - Respostas na concentração de hemoglobina (g/dL) de ratos anêmicos alimentados durante a fase de repleção (14 dias) com ração basal (pobre em ferro) e rações suplementadas com ferro do sulfato ferroso, feijão integral ou papa de feijão. As hemoglobinas iniciais estão na parte inferior de cada barra e as hemoglobinas finais, na parte superior (média para 6 animais). Barras contendo a mesma letra representam ganhos de hemoglobina que não diferem estatisticamente entre si (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$). Para o grupo basal, a primeira barra corresponde à hemoglobina inicial e a segunda, hemoglobina final.

TABELA 10 - CONSUMO DE RAÇÃO, FERRO INGERIDO, VARIACÃO NA HEMOGLOBINA TOTAL E NO FERRO HEMATÍNICO DE RATOS ANÊMICOS ALIMENTADOS DURANTE A FASE DE REPLEÇÃO COM RAÇÕES BASAL (POBRE EM FERRO), PADRÕES (FeSO_4) E EXPERIMENTAIS (FEIJÃO INTEGRAL E PAPA DE FEIJÃO) ^{1,2/}

RAÇÕES	CONSUMO DE RAÇÃO	FERRO INGERIDO	$\Delta\text{Hb TOTAL}$ ^{3/}	$\Delta\text{Hb-Fe}$ ^{4/}
	g	mg	g	mg
Basal	$145,0 \pm 5,2^e$	$0,83 \pm 0,02^f$	$0,12 \pm 0,02^f$	$0,40 \pm 0,07^f$
Padrão (FeSO_4)				
P ₆	$244,6 \pm 6,7^{cd}$	$2,94 \pm 0,08^e$	$0,57 \pm 0,06^{de}$	$1,90 \pm 0,21^{de}$
P ₁₂	$287,6 \pm 4,2^{abc}$	$5,38 \pm 0,08^d$	$1,00 \pm 0,08^{cd}$	$3,36 \pm 0,26^{cd}$
P ₂₄	$295,8 \pm 11,9^{ab}$	$9,38 \pm 0,38^{bc}$	$1,70 \pm 0,21^{ab}$	$5,69 \pm 0,69^{ab}$
P ₃₆	$315,3 \pm 13,3^a$	$13,02 \pm 0,55^a$	$1,97 \pm 0,15^a$	$6,59 \pm 0,49^a$
Feijão Integral				
FI ₆	$230,6 \pm 8,4^d$	$2,70 \pm 0,10^e$	$0,37 \pm 0,03^e$	$1,25 \pm 0,11^e$
FI ₁₂	$241,9 \pm 11,3^d$	$4,91 \pm 0,23^d$	$0,76 \pm 0,09^{de}$	$2,56 \pm 0,29^{de}$
FI ₂₄	$264,0 \pm 9,2^{bcd}$	$8,90 \pm 0,31^c$	$1,35 \pm 0,11^{bc}$	$4,53 \pm 0,36^{bc}$
FI ₃₆	$260,2 \pm 5,4^{bcd}$	$10,41 \pm 0,22^b$	$1,30 \pm 0,06^{bc}$	$4,37 \pm 0,20^{bc}$
Papa de Feijão				
FP ₆	$240,2 \pm 7,3^d$	$2,95 \pm 0,09^e$	$0,34 \pm 0,04^e$	$1,13 \pm 0,12^e$
FP ₁₂	$248,7 \pm 10,0^{cd}$	$4,55 \pm 0,18^d$	$0,61 \pm 0,04^{de}$	$2,05 \pm 0,16^{de}$
FP ₂₄	$259,3 \pm 9,8^{bcd}$	$8,30 \pm 0,31^c$	$1,29 \pm 0,12^{bc}$	$4,34 \pm 0,41^{bc}$

^{1/} Valores são médias \pm erro padrão da média para seis animais.

^{2/} Valores em cada coluna seguidos da mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

^{3/} Variação da hemoglobina total dos animais no período (14 dias).

^{4/} Variação no ferro hematínico.

TABELA 11 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA GANHO DE PESO (g), HEMOGLOBINA FINAL (g/dL), VARIACÃO NA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA (g/dL), VARIACÃO NA HEMOGLOBINA TOTAL (g), FERRO INGERIDO (mg) E VARIACÃO NO FERRO HEMATÍNICO (mg), NA FASE DE REPLEÇÃO (14 dias)

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS					
		Δ PESO	Hb FINAL	Δ Hb	Δ Hb TOTAL	FERRO INGERIDO.	Δ Hb-Fe
Tratamentos	11	1310,44**	52,17**	52,75**	1,70**	71,10**	19,11**
Resíduo	60	84,41	1,57	1,27	0,06	0,43	0,64
Total	71	-	-	-	-	-	-
COEFICIENTE DE VARIACÃO (%)	-	15,66	12,56	27,35	23,40	9,75	23,40

***) Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo Teste F.

4.3. UTILIZAÇÃO BIOLÓGICA DO FERRO

4.3.1. RBV (%) ou valor biológico relativo

Os resultados encontrados para RBV ou biodisponibilidade relativa ao sulfato ferroso (= 100%), estimado a partir do método recomendado pela AOAC (1984), encontram-se na tabela 12. Conforme pode ser observado, o RBV do ferro da papa de feijão é um pouco mais elevado do que o do ferro do feijão integral - $77,1 \pm 4,4\%$ e $73,7 \pm 1,0\%$, respectivamente (diferenças não significativas ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste t). Nesta tabela também estão apresentados os valores dos coeficientes de determinação (r^2) e das inclinações (b) das retas estabelecidas a partir da regressão linear dos dados de hemoglobina final e nível de suplementação de ferro, por tratamento. A representação gráfica destas retas está na figura 6.

4.3.2. HRE (%) ou eficiência de regeneração da hemoglobina

Para estimar a utilização biológica do ferro a partir da eficiência de regeneração da hemoglobina, calculou-se os valores de HRE segundo método preconizado por Mahoney et al' (1974). Nos grupos de animais que receberam suplementação de ferro na ração ao nível de 24 mg/kg, encontrou-se para o padrão, feijão integral e papa de feijão, os seguintes valores: $60,4 \pm 6,5\%$; $50,8 \pm 3,2\%$ e $52,7 \pm 5,7\%$, respectivamente (tabela 13). Conforme constatado também nos resultados de RBV relatados em 4.3.1., o HRE da papa de feijão ficou um pouco mais elevado que o do feijão integral (HRE relativo de $87,3 \pm 9,4\%$ e $84,1 \pm 5,3\%$, respectivamente), embora sejam diferenças não significativas ($p \leq 0,05$). No caso dos grupos suplementados com

36 mg Fe/kg de ração, observou-se uma redução na eficiência de retenção do ferro em relação à daqueles do nível 24, tanto para o padrão quanto para o feijão integral ($50,6 \pm 3,1\%$ e $41,9 \pm 1,4\%$, respectivamente). Embora tenha ocorrido esta redução, o HRE relativo do feijão integral permaneceu semelhante nos dois níveis ($84,1 \pm 5,3\%$ para FI_{24} e $82,8 \pm 2,8\%$ para FI_{36}), como mostra a tabela 13.

TABELA 12 - PARÂMETROS DE REGRESSÃO E VALOR BIOLÓGICO RELATIVO DO FERRO (RBV %) SEGUNDO MÉTODO DA AOAC

FONTE DE FERRO	NÍVEL DE SUPLEMEN- TENTAÇÃO $\bar{x}^{1/}$	Hb FINAL (y)	PARÂMETROS DE REGRESSÃO		RBV ^{2/} %
			COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO (r^2)	INCLINAÇÃO ($b \pm s_b$)	
Basal	0,00	5,60	-	-	-
Padrão (FeSO ₄)					
P ₆	6,30	8,34			
P ₁₂	13,00	10,78	0,9744	0,3077 $\pm 0,0354^a$ ^{3/}	100,0
P ₂₄	26,00	13,74			
Feijão Integral					
FI ₆	6,00	6,94			
FI ₁₂	14,60	9,00	0,9996	0,2268 $\pm 0,0030^a$	73,7 $\pm 1,0$
FI ₂₄	28,00	11,93			
Papa de feijão					
FP ₆	6,60	6,66			
FP ₁₂	12,60	8,33	0,9936	0,2373 $\pm 0,0135^a$	77,1 $\pm 4,4$
FP ₂₄	26,30	11,70			

^{1/} Ferro real adicionado (ferro dosado = tabela 7, menos o ferro basal = 5,7 mg/kg).

^{2/} Taxa de inclinação da reta da fonte de ferro testada (variáveis de regressão = concentração final de hemoglobina/nível de suplementação) relativa à inclinação da reta do padrão (FeSO₄ = 100%).

^{3/} Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si, pelo Teste t ($p \leq 0,05$).

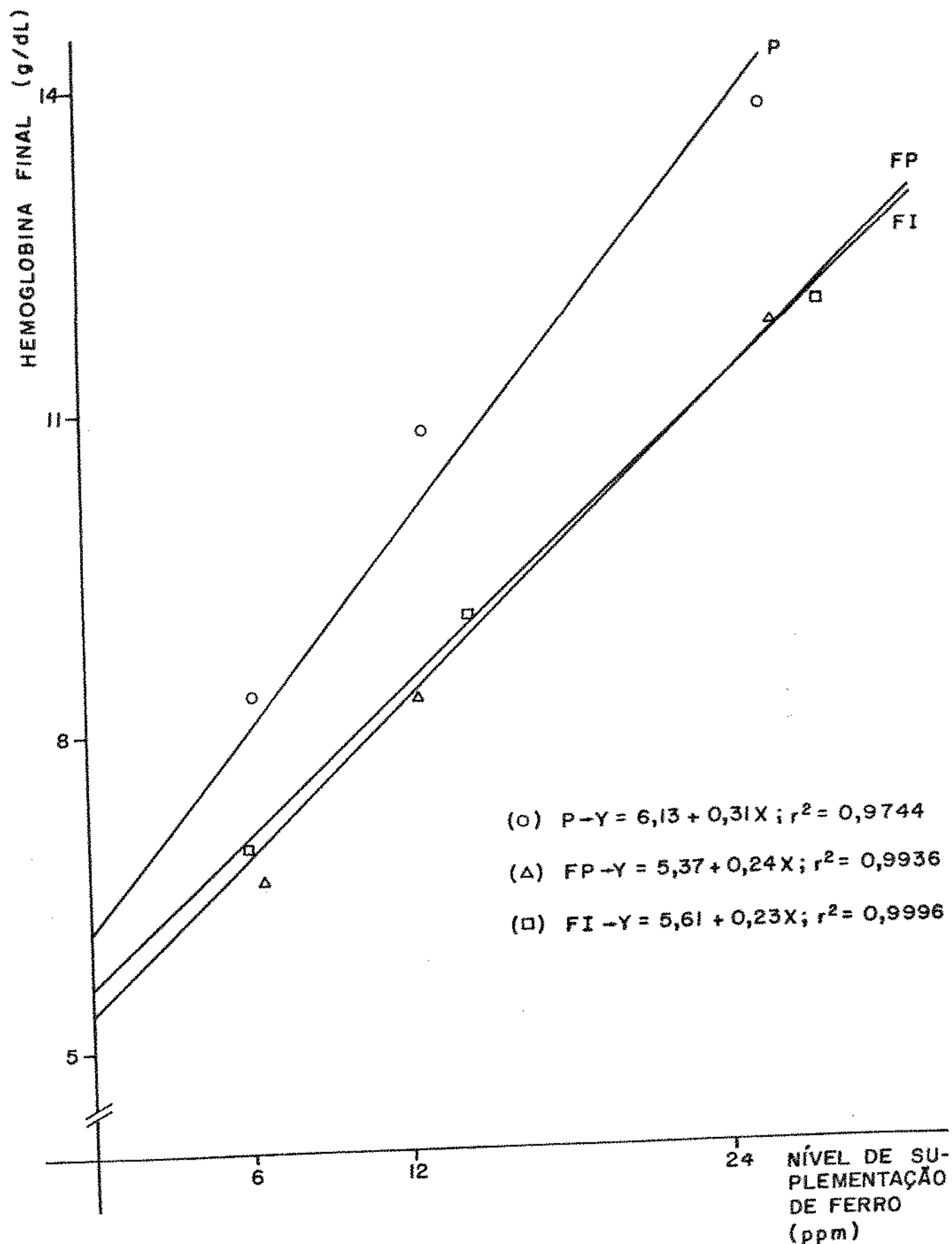


FIGURA 6 - Regressão linear dos dados de concentração de hemoglobina final (g/dL) e nível de suplementação de ferro (ppm), na forma de sulfato ferroso (P); papa de feijão (FP) e feijão integral (FI).

TABELA 13 - FERRO INGERIDO (mg), GANHO DE FERRO HEMATÍNICO (mg) E EFICIÊNCIA DE REGENERAÇÃO DOS NÍVEIS DE HEMOGLOBINA (HRE %) ESTIMADO A PARTIR DO MÉTODO DE MAHONEY et al^{1/} SEGUNDO SUPLEMENTAÇÃO DE 24 E 36 mg Fe/kg DE RAÇÃO^{2/}

FONTE DE Fe- NÍVEL DE SU- PLEMENTAÇÃO.	FERRO INGERIDO	Δ Hb - Fe	HRE ^{3/}	HRE _r ^{4/}
	mg			%
<u>24 mg Fe/kg</u>				
Padrão	9,38±0,38	5,69±0,69	60,4±6,5 ^a	100,0
Feijão integral	8,90±0,31	4,53±0,36	50,8±3,2 ^{ab}	84,1±5,3
Papa de feijão	8,30±0,31	4,34±0,41	52,7±5,7 ^{ab}	87,3±9,4
<u>36 mg Fe/kg</u>				
Padrão	13,02±0,55	6,59±0,49	50,6±3,1 ^{ab}	100,0
Feijão integral	10,41±0,22	4,37±0,20	41,9±1,4 ^b	82,8±2,8

^{1/} HRE% = Δ Hb-Fe/Fe ingerido x 100.

^{2/} Valores são médias \pm erro padrão da média para 6 animais.

^{3/} Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (P \leq 0,05)

^{4/} Eficiência relativa ao sulfato ferroso (HRE do sulfato ferroso = 100 %).

5. DISCUSSÃO

5.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FARINHAS DO FEIJÃO

As diferenças na composição química das duas farinhas utilizadas no experimento são mínimas (tabela 6). No entanto, a farinha da papa de feijão apresenta teores um pouco mais elevados de lipídios e ferro, e concentrações menores de fibra e cinzas, o que pode ser explicado pelo processamento utilizado na elaboração desta farinha. O feijão cozido foi triturado em liquidificador e peneirado para a obtenção da papa, sendo assim desprezada grande parte do tegumento dos grãos, determinando a redução do conteúdo de fibra e cinzas, em comparação ao da farinha do feijão integral. Constatou-se um baixo teor de umidade nas farinhas (4,6 e 5,1 %), em relação à umidade encontrada em farinhas de um modo geral, devido ao processo utilizado para a secagem dos feijões cozidos, isto é, liofilização. Tanto este procedimento quanto as técnicas empregadas para o cozimento do feijão (segundo Elias & Bressani, 1976), foram selecionados com o objetivo de preservar ao máximo o valor nutritivo do produto.

Como pode ser observado na tabela 14, a composição química da farinha do feijão integral é semelhante à de diferen

tes variedades de *Phaseolus vulgaris* descritas na literatura. Nesta tabela destaca-se a composição dos feijões 'Carioca' (Moraes & Angelucci, 1971) e 'Carioca 80' (Tezoto & Sgarbieri, 1990), variedades mais próximas geneticamente do cultivar utilizado na presente investigação. Apesar das diferenças metodológicas que limitam a comparação entre os dados apresentados, o teor de ferro do feijão 'Carioca 80 S.H.' é maior que o dos demais feijões e o conteúdo de fibra bruta é um pouco menor. Isto pode indicar uma provável superioridade deste novo cultivar em relação a outras variedades de feijão consumidas em nosso meio, como fonte de ferro.

TABELA 14 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE DIFERENTES VARIEDADES DE FEIJÕES (*Phaseolus vulgaris*)^{1/}

VARIEDADE E/OU CULTIVAR.	COMPOSIÇÃO QUÍMICA							FONTE
	UMIDADE	PROTEÍNA	LIPÍDIOS	FIBRA	CINZAS	CARBOIDRATOS	FERRO	
			g %				mg/100 g	
Diversos (crus)	11,0 ^{2/} (10,4-11,7)	23,54 (21,5-28,3)	1,12 (0,35-1,99)	4,46 (3,52-5,09)	3,53 (3,20-4,04)	56,35 -	3,55 (2,76-5,76)	(a)
Diversos (crus e cozidos)	11,7 (9,0-18,0)	23,63 (18,12-29,00)	1,46 (0,35-4,30)	4,78 (3,40-7,00)	3,84 (2,30-5,11)	62,83 (47,70-76,18)	5,26 ^{3/} (3,13-6,82)	(b)
Diversos	10,0	-	-	-	-	-	5,26 ^{3/} (2,59-7,14)	(c)
Carioca (cru)	10,6	22,60	1,44	3,52	3,52	58,32	3,44	(d)
Carioca 80	10,0	21,80	1,23	5,20	3,48	-	-	(e)
Carioca 80 S.H.	10,0	22,85	1,33	3,01	2,95	59,86	7,45	(f)

^{1/} Quando não indicado, os dados são relativos a feijões cozidos.

^{2/} Valores médios e limites de variação entre parênteses.

^{3/} Valores originais ajustados para 10% de umidade.

(a) Moraes & Angellucci, 1971.

(c) Sathe et al, 1984.

(e) Tezoto & Sgarbieri, 1990.

(b) Sgarbieri, 1989.

(d) Moraes & Angelucci, 1971.

(f) Presente investigação.

5.2. ENSAIO BIOLÓGICO

5.2.1. Fase de depleção

Nesta fase foram utilizados ratos recém-desmamados com níveis de hemoglobina no sangue em torno de $13,79 \pm 0,33$ g/dL e peso médio de $48,7 \pm 0,5$ g. Os animais foram mantidos por 35 dias consumindo uma ração pobre em ferro e água desionizada. Ao final deste período, os 72 ratos selecionados para a segunda fase (repleção), apresentaram uma concentração de hemoglobina no sangue de $5,88 \pm 0,10$ g/dL (valores entre 4,41 e 7,05 g/dL) e peso médio de $188,0 \pm 2,8$ g. Esta redução drástica nos níveis de hemoglobina, configurando um quadro de anemia severa nos animais, somente foi possível devido aos baixos teores de ferro da ração basal utilizada no experimento (tabela 1). Como já relatado, a ração basal foi formulada em lotes de 7 kg cada, sendo que o conteúdo médio de ferro desses lotes foi de 5,7 mg/kg. Sabe-se que é inviável a formulação de uma ração totalmente isenta de ferro. Segundo Fritz et al (1978), nas condições experimentais preconizadas pelo método de depleção e repleção de hemoglobina da AOAC (1984), é possível provocar anemia severa nos animais com uma ração contendo níveis de ferro em torno de 5 a 7 mg/kg. Os baixos teores de ferro da ração basal foram alcançados devido aos cuidados dispensados na elaboração da mesma e na seleção criteriosa dos reagentes, a fim de evitar ao máximo a presença de ferro contaminante.

A ração basal recomendada pela AOAC contém ingredientes tais como gelatina e farinha de milho desgerminado que não são de uso comum em rações para ratos e podem significar fontes consideráveis de ferro contaminante. Por isso, decidiu-se traba

lhar com uma ração basal semelhante à da AOAC, porém substituindo os itens relacionados acima por amido de milho, e glicose por sacarose. Estas modificações foram propostas por Fritz et al' (1978), que encontraram respostas semelhantes (para peso e hemoglobina) em ratos consumindo esta ração em relação à da AOAC, tanto na fase de depleção quanto na fase de repleção.

A anemia provocada pela ingestão de uma dieta pobre em ferro é relativamente difícil de ser obtida em ratos recém-desmamados (Fritz et al, 1974). Isto se deve principalmente a fatores relacionados com a dieta basal. A caseína comercial pode ser um veículo considerável de ferro contaminante, pois contribue com 20% do peso total da ração (tabela 1). A AOAC recomenda o uso de caseína mais purificada ("vitamin free casein"), o que não foi possível na presente investigação devido a dificuldades de aquisição da mesma em grandes quantidades e devido ao seu custo elevado. Ainda, cuidados na formulação, acondicionamento e armazenamento das dietas são importantes para evitar a contaminação. Por outro lado, devem ser observados uma série de cuidados no manejo com os animais tais como descontaminação adequada do ambiente, gaiolas e demais materiais necessários, que podem evitar a presença e/ou reciclagem de ferro contaminante e portanto, contribuir para o desencadeamento de anemia nos animais.

Mahoney et al (1985, 1987) propõem uma técnica mais simplificada para obtenção de anemia em ratos recém-desmamados, isto é, sangria dos animais associada ao consumo de uma dieta com baixo teor de ferro (entre 10 e 16 mg/kg). Desta forma obtêm-se anemia mais rapidamente (7 a 10 dias), sem dispensar tantos cuidados na formulação das dietas e no manejo com os animais. No entanto, o sangramento representa uma agressão bioquí

mica que pode introduzir variáveis não controláveis ao ensaio (Bianchi, 1988). Flanagan et al (1980) constataram diferenças significativas na absorção do ferro em camundongos anêmicos por sangria ou por ingestão de dieta pobre em ferro e concluem que o consumo de uma dieta deficiente em ferro estimula mais a absorção deste nutriente, sendo que a sangria ativa apenas parcialmente o mecanismo de absorção do ferro.

A anemia severa apresentada pelos animais nesta fase influenciou de forma negativa na taxa de crescimento dos mesmos. Como se observa na tabela 8, os ratos em depleção iniciaram o período com um peso médio semelhante ao do grupo utilizado como controle positivo, isto é, que recebeu ração comercial de biotério durante o mesmo período ($48,7 \pm 0,5$ e $48,4 \pm 1,2$ g, respectivamente). No entanto, após 35 dias de depleção, os animais estavam com $188,0 \pm 2,8$ g, peso estatisticamente menor ($p \leq 0,05$) do que o do grupo controle ($231,4 \pm 6,6$ g). Apesar do comprometimento no ganho de peso dos animais depletados, o crescimento foi linear, em função do tempo, segundo o elevado coeficiente de determinação da reta de regressão estimada a partir destes dados ($r^2 = 0,9976$), como mostra a figura 3. Observa-se que as duas curvas de peso apresentadas nesta figura têm inclinações estatisticamente diferentes ($p \leq 0,01$), determinando uma divergência significativa entre elas no decorrer do experimento, isto é, para cada unidade de tempo considerada (semanas) o ganho de peso estimado foi de 27,8 g para o grupo basal, enquanto que para o grupo controle (ração comercial), foi de 36,5 g.

A constatação do efeito da deficiência de ferro sobre o crescimento dos ratos recém-desmamados nesta fase é importante, tendo em vista o papel fundamental que o ferro desempenha sobre o aumento da volemia e oxigenação dos tecidos.

5.2.2. Fase de repleção

5.2.2.1. Grupo basal (controle negativo)

O grupo de animais que permaneceu consumindo a dieta basal (pobre em ferro) durante a fase de recuperação dos níveis de hemoglobina, serviu como um controle negativo, para assegurar a não contaminação com ferro nesta fase, o que invalidaria os resultados do experimento. Conforme o esperado, o grupo basal não apresentou ganho nos seus níveis de hemoglobina sanguínea, ao contrário, houve uma redução de $0,63 \pm 0,22$ g/dL (hemoglobina inicial de $6,23 \pm 0,48$ e final de $5,60 \pm 0,28$ g/dL), de acordo com tabela 9. Nesta tabela observa-se também que apesar da anemia, estes ratos continuaram crescendo, tendo sido constatado um ganho de peso de $33,6 \pm 3,1$ g durante os 14 dias de repleção, mesmo com a restrição dietética de ferro (consumo médio de apenas $0,06$ mg Fe/dia). O aumento de peso e conseqüente expansão do volume sanguíneo levou a um aumento mínimo na hemoglobina total e ferro hemoglobínico destes animais, isto é, $0,12 \pm 0,02$ g e $0,40 \pm 0,07$ mg, respectivamente (tabela 10).

5.2.2.2. Ganho de peso.

Em todos os tratamentos constatou-se uma relação positiva entre o ganho de peso e nível de suplementação de ferro na ração (tabela 9), sendo que a regressão linear destes dados resultou nos seguintes coeficientes de determinação (r^2) e de regressão (b), respectivamente: Padrão - $0,9928$ e $1,45$; Feijão integral - $0,9604$ e $1,06$ e Papa de feijão - $0,9407$ e $1,13$. Segundo os valores de b, os ratos que consumiram ração padrão cresceram mais, isto é, $1,45$ g para cada ppm de Fe adicionado à ra

ção (do sulfato ferroso), em relação ao crescimento de 1,06 g e 1,13 g/ppm Fe, estimado para os grupos experimentais (diferenças não significativas para $p \leq 0,05$). As diferenças nos ganhos de peso dos grupos de animais estudados podem ser observadas na figura 4, que também mostra a significância estatística das mesmas.

Estes resultados evidenciam a influência da quantidade de ferro ingerido sobre o crescimento dos animais, como também constatado na fase de depleção (tabela 8 e figura 3). No entanto, alterações no peso são determinadas por inúmeras variáveis. Sendo assim, esta medida, por si só, não constitui um parâmetro sensível para estimar a utilização biológica do ferro (Amine et al, 1972).

5.2.2.3. Consumo de ração

Todas as rações utilizadas no experimento foram elaboradas de forma a apresentarem a mesma composição química, variando apenas a fonte e quantidade de ferro adicionado. As rações padrões (P_6 , P_{12} , P_{24} e P_{36}) possuem a mesma formulação da ração basal, com exceção do sulfato ferroso que foi adicionado como fonte de ferro referência. No caso das rações experimentais (FI e FP), a adição das farinhas do feijão como fonte de ferro levou à uma alteração na formulação da ração basal, de forma a assegurar uma composição química idêntica para todas as rações (tabelas 4 e 5). Como pode ser observado na tabela 7, todas as rações apresentaram teores protéicos semelhantes (aproximadamente 19 %), conforme o esperado, visto que as rações foram formuladas de acordo com a concentração de proteína da ração basal, que contém 20% de caseína (AOAC, 1984). A qualidade das proteí

nas das dietas também foi mantida, através da suplementação com metionina, em quantidades suficientes para garantir uma utilização protéica adequada, tanto nas rações contendo somente caseína como fonte de proteína (padrões), quanto naquelas em que as farinhas do feijão também contribuíram no teor protéico das mesmas (experimentais). Tanto a quantidade quanto a qualidade da proteína são fatores que desempenham um papel relevante na utilização biológica do ferro (Araya Araya, 1975, Beard et al, 1984, Cook, 1983, Sherman et al, 1985). Estes fatores foram considerados no presente trabalho, como já mencionado, a fim de não prejudicar o aproveitamento biológico do ferro e assim, permitir comparações entre as respostas obtidas a partir das diferentes fontes e níveis de ferro estudados.

Por outro lado, a quantidade de sacarose foi mantida igual para todas as rações, com a finalidade de não interferir no consumo das mesmas (tabelas 4 e 5). Em todos os tratamentos constatou-se uma relação positiva entre o consumo de ração e a dose de ferro, apesar do ajuste da reta de regressão não explicar em grande parte estes dados, conforme os seguintes valores dos coeficientes de determinação (r^2) encontrados: Padrão = 0,7184; Feijão integral = 0,6740 e Papa de feijão = 0,6039. Esta tendência em consumir maior quantidade de ração a medida que aumentava-se o teor de ferro das mesmas, pode ser explicada em parte, por um instinto do rato em ingerir uma ração mais balanceada e de acordo com suas necessidades. Segundo Mahoney et al (1974), o consumo de ferro pode ser afetado tanto pela aceitabilidade quanto pela concentração de ferro nas rações. No tratamento com feijão integral, o grupo FI₃₆ não consumiu maior quantidade de ração que o grupo FI₂₄, (260,2±5,4 e 264,0±9,2, respectivamente), como observado em todos os demais casos, referi

dos acima. Isto pode ser devido ao fato de que a ração FI₃₆ possui maior quantidade de farinha do feijão integral (cerca de 46%), o que deve ter influenciado negativamente na sua palatabilidade. O consumo de ração padrão foi mais elevado do que o das rações experimentais FI e FP, em todos os níveis de suplementação estudados (diferenças significativas somente para padrão 36 em relação à FI₃₆ ($p \leq 0,05$)). Novamente, estas diferenças podem ser em parte explicadas pela melhor palatabilidade das rações contendo caseína à 20% (padrões) em relação às experimentais, que além de apresentarem teores menores de caseína (cerca de 7 a 18%), foram suplementadas com as farinhas do feijão, em níveis que variaram de aproximadamente 7 a 46% (tabelas 4 e 5).

5.2.2.4. Variação nos parâmetros hematológicos

Os grupos de animais iniciaram a fase de repleção com concentrações médias de hemoglobina entre $5,67 \pm 0,37$ e $6,30 \pm 0,39$, o que demonstra que eles estavam anêmicos (tabela 9). Observa-se que ao final do experimento, todos os grupos apresentaram ganho de hemoglobina, com exceção do grupo basal, conforme já relatado. Considerando-se que as rações padrões têm composição igual a da ração basal, sendo apenas suplementadas com ferro (FeSO_4), pode-se concluir que a anemia produzida nos animais na fase de depleção, foi por deficiência de ferro.

A concentração de hemoglobina final ou o ganho de hemoglobina no período aumentaram em função do nível de suplementação de ferro das rações, embora as diferenças sejam significativas apenas para hemoglobina final quando o teor de ferro das rações aumentou de 12 para 24 mg/kg, em todos os tratamentos. No caso do ganho de hemoglobina, verificou-se diferença'

significativa também quando o nível de ferro aumentou de 6 para 12 mg/kg na ração padrão. As rações padrões determinaram valores de hemoglobina final e ganho de hemoglobina mais elevados do que os das rações experimentais, para todos os níveis de suplementação testados (diferença significativa somente para P₃₆ em relação à FI₃₆), como pode ser observado na figura 5. Estas diferenças provavelmente foram determinadas mais pela qualidade do que pela quantidade de ferro ingerido, visto que não foram constatadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) no ferro ingerido para cada nível de suplementação testado, entre os diferentes tratamentos, com exceção do nível 36, como mostra a tabela 10.

A resposta linear de cada tratamento (na forma de hemoglobina final) em função da dose de ferro suplementado e a melhor utilização do ferro do sulfato ferroso, podem ser observadas na figura 6, através dos elevados coeficientes de determinação (r^2) e das diferenças nas inclinações (b) das retas estabelecidas a partir destes dados. Assim, cada ppm de ferro adicionado na forma de sulfato de ferro determinou um aumento de 0,31 g de hemoglobina/dL, contra 0,24 e 0,23 g/dL para o ferro da papa de feijão e do feijão integral, respectivamente (diferenças não significativas para $p \leq 0,05$)

Os valores de hemoglobina considerados normais para ratos variam de 12 a 17,5 g/dL (média de 14,8 g/dL), verificando-se valores mais próximos do limite superior, com o aumento da idade dos animais (Fritz et al, 1970). Sendo assim, a recuperação plena dos níveis de hemoglobina somente ocorreu nos animais mantidos com ração padrão 24 ($13,74 \pm 0,79$ g Hb/dL) e com padrão 36 ($15,18 \pm 0,70$ g Hb/dL), como pode ser observado na tabela 9. A ração padrão 24 contém uma concentração de ferro inferior à recomendada para ratos (35 mg/kg, segundo o National Research

Council, 1979). No entanto, ela promoveu o restabelecimento dos níveis sanguíneos de hemoglobina dos animais. Isto pode ser o resultado de uma maior capacidade do organismo depletado em utilizar o ferro dietético, associada à qualidade do ferro suplementado na ração (FeSO_4 , Merck, recém adquirido no comércio). O sulfato ferroso geralmente é usado como fonte de ferro referência, pois o ferro nesta forma tem se mostrado mais biodisponível que o de outros sais de ferro, conforme estudos experimentais em ratos (Amine et al, 1972, Amine & Hegsted, 1974, Fritz et al, 1970). Por outro lado, a ração suplementada com ferro do feijão integral ao nível de 36 mg/kg não foi capaz de recuperar totalmente os níveis de hemoglobina dos ratos, sendo encontrado um valor médio de hemoglobina final igual a $11,99 \pm 0,50$ g/dL. Este valor é inferior àquele verificado nos animais ao desmame ($13,79 \pm 0,33$ g/dL) e também não é compatível com a idade dos ratos ao final do experimento (cerca de 70 dias de idade). Neste caso, tanto a quantidade quanto a qualidade do ferro ingerido podem ter prejudicado a recuperação total da anemia. Com relação à quantidade, o grupo FI₃₆ ingeriu em média 0,74 mg Fe/dia, menos que o grupo padrão 36 (0,93 mg/dia), resultado de um menor consumo de ração, com menor teor de ferro ($260,2 \pm 5,4$ g de ração, com 40 mg Fe/kg), em relação ao grupo padrão 36 ($315,3 \pm 13,3$ g com 41,3 mg Fe/kg). As diferenças no consumo de ração e de ferro destes grupos são significativas ao nível de 1% de probabilidade.

As respostas dos diferentes grupos de animais com relação ao ganho de hemoglobina total e de ferro hematínico, demonstraram um comportamento semelhante ao da concentração final de hemoglobina. Assim, constatou-se uma relação positiva en

tre estas medidas e o nível de suplementação de ferro, e valores mais elevados para os animais que consumiram ração padrão, em relação aos grupos experimentais, em todos os níveis de suplementação testados (tabela 10). O comportamento similar verificado para estes parâmetros, em função da fonte e dose de ferro estudados, pode ser explicado pelo fato de que os valores de hemoglobina total foram estimados a partir da concentração de hemoglobina no sangue e do peso dos ratos (inicial e final), o qual não variou significativamente entre os diferentes grupos de animais (tabela 9). O ganho de ferro hematínico, por sua vez, foi estimado a partir dos valores de hemoglobina total (inicial e final), com a finalidade de ser utilizado no cálculo do Índice da Eficiência de Regeneração da Hemoglobina (HRE %).

5.3. UTILIZAÇÃO BIOLÓGICA DO FERRO

O método de depleção e repleção da hemoglobina, recomendado pela AOAC (1984) para estimar a biodisponibilidade de ferro é do tipo curativo e compreende o tratamento de ratos anêmicos com doses críticas de ferro (0, 6, 12 e 24 mg/kg de ração). Estas condições experimentais, associadas ao fato de que os ratos são jovens e portanto, estão em pleno crescimento, determinam o máximo de utilização biológica, favorecendo a discriminação da qualidade nutricional do ferro de diferentes fontes (Buchowski et al, 1989). Na presente investigação, além das doses de ferro preconizadas pela AOAC, a farinha do feijão integral e o sulfato ferroso foram testados ao nível de suplementação de 36 mg Fe/kg de ração. O nível 36 foi introduzido para verificar a utilização do ferro neste nível, semelhante aos requerimentos do rato e para facilitar a comparação com dados

de literatura. Sendo assim, o aproveitamento biológico do ferro do feijão integral e da papa de feijão foi avaliado através de valores relativos ao ferro de referência (método AOAC) e de valores absolutos, segundo a eficiência de retenção na forma de ferro hematínico, estimada a partir de um único nível de suplementação, conforme os índices apresentados a seguir.

5.3.1. Valor Biológico Relativo (RBV %)

Para a estimativa do RBV(%), efetuou-se a regressão linear dos dados de hemoglobina final (variável dependente) e nível de suplementação de ferro (ferro real adicionado), para cada tratamento (sulfato ferroso, feijão integral e papa de feijão). Os valores de RBV foram então calculados a partir das inclinações (b) das retas dos grupos experimentais em relação à inclinação da reta padrão (FeSO_4). Observa-se na tabela 12 que o RBV do ferro da papa de feijão é maior que o do feijão integral, embora a diferença entre esses dois valores seja mínima. Através das equações das retas apresentadas na figura 6, pode-se dizer que para obter uma mesma resposta (y) igual a 13,0 g Hb/dL (nível de repleção satisfatório) é necessário uma suplementação de cerca de 32 mg Fe/kg de ração, a partir do feijão integral e da papa de feijão, e de apenas 22 mg Fe/kg de ração, na forma de sulfato ferroso.

Valores de RBV para ferro de feijão são praticamente inexistentes na literatura. Como já relatado, os estudos disponíveis sobre utilização biológica do ferro de feijão demonstram uma baixa biodisponibilidade deste ferro para humanos (Cook et al., 1972, Layrisse et al., 1968 e 1969, Lynch et al., 1984). No entanto, os valores de RBV para o ferro do feijão en

contrados no presente trabalho são coerentes com dados de literatura para RBV do ferro de outros alimentos de origem vegetal que, como o feijão, são indicados como fontes de ferro pouco biodisponíveis para humanos. Gordon & Chao (1984) utilizando farelo de trigo e espinafre como fonte de ferro suplementado a um nível de 25 mg/kg de ração, encontraram valores de RBV de 112 e 76%, respectivamente, quando usaram o ganho de hemoglobina como variável dependente e, valores de 112 e 67%, respectivamente, quando consideraram o ganho no produto da hemoglobina (g/dL) multiplicado pelo peso como parâmetro de resposta. Em trabalho recente, Gordon & Godber (1989) relatam valores de RBV de 46 e 91% para o farelo de arroz e concentrado protéico de soja, respectivamente, constatando um aumento significativo no RBV do farelo de arroz (75 %), quando lactoalbumina foi substituída por carne (isenta de ferro) como fonte protéica da ração. Para o isolado protéico de soja, Chao & Gordon (1983) encontraram valores de 84 e 81% quando consideraram como critério de resposta o ganho de hemoglobina e ganho no produto da hemoglobina (g/dL) multiplicada pelo peso, respectivamente. Por outro lado, Miller (1977) estudando o valor biológico do ferro de pães à base de farinha de trigo, suplementado em três níveis (6,12 e 18 mg/kg de ração), encontrou valores menores, isto é, 45 e 53% para RBV calculado a partir da concentração de hemoglobina final e do ganho de hemoglobina como parâmetro de resposta, respectivamente. O RBV do resíduo do farelo de trigo (sem fitato) foi de 71%, menor que o do ferro do fitato monoférrico isolado do farelo de trigo, isto é, 99%, conforme relatada Morris & Ellis (1976).

O método oficial da AOAC (1984) para avaliar a biodisponibilidade do ferro pressupõe a utilização de três níveis de suplementação de ferro para cada fonte de ferro testada, e

ainda, o nível zero de suplementação (grupo basal). No entanto, o método não especifica claramente quais as variáveis de dose-resposta a serem consideradas na estimativa do RBV. Fritz et al. (1974), através de um estudo colaborativo, relatam os resultados obtidos em 8 laboratórios diferentes para RBV de sais de ferro, estimado a partir da concentração de hemoglobina final e nível de suplementação (dose de ferro). O protocolo experimental usado neste estudo foi então adotado como o método oficial da AOAC. Em outro trabalho, Fritz et al. (1975) não observaram vantagem no uso do ganho de hemoglobina durante o período de repleção, no lugar da hemoglobina final, como critério de resposta à suplementação de ferro. Outros pesquisadores também têm utilizado a hemoglobina final (Amine et al., 1972, Chawsow & Czarnecki-Maulden, 1988) ou o ganho de hemoglobina no período (Gordon & Chao, 1984, Morris & Ellis, 1976) como variável dependente para a estimativa do RBV. Além disso, Chao & Gordon (1983), Gordon & Chao (1984) e Gordon & Godber (1989) têm proposto o uso da variação no produto do peso multiplicado pela hemoglobina (g/dL) e o ferro ingerido, como medidas de dose-resposta para o cálculo do RBV. Segundo os autores, a inclusão do peso como variável dependente elimina diferenças na hemoglobina total (inicial e final) dos animais, e o ferro ingerido como variável independente, leva em consideração as diferenças no consumo de ração. Ainda, nestes ensaios o RBV é calculado a partir de uma única dose de ferro da fonte teste, através da equação da reta do ferro referência, não sendo necessário utilizar vários níveis de suplementação para cada fonte de ferro testada.

Miller (1977) calculou diversos valores de RBV, a partir da taxa de inclinação da reta construída utilizando

diferentes variáveis como critério de resposta à quantidade de ferro ingerido durante um período de repleção de 3, 7 ou 11 dias de duração. Foi constatada uma melhor resposta e maior precisão nos valores de RBV quando estimado utilizando-se o ganho de hemoglobina total como critério de resposta, durante um período de regeneração de 11 dias. Como pode ser observado, existem muitas diferenças entre os protocolos experimentais, dificultando a interpretação e comparação entre resultados de diferentes relatos de literatura. Diferenças não somente nas variáveis de regressão (qual variável é considerada independente e qual é a variável dependente) como também nos níveis de suplementação de ferro, ou no número de animais por grupo, idade e "status" de ferro dos animais, e ainda variações na duração do período de depleção e/ou repleção, podem levar à alterações significativas nos valores de RBV (Amine & Hegsted, 1974, Miller, 1977).

Em um mesmo experimento, a medida do RBV pode ficar comprometida se o consumo de ração e taxa de crescimento são diferentes entre os grupos experimentais e o padrão, para cada nível de suplementação de ferro testado. Diferenças no consumo de ração e portanto, no ferro ingerido determinam respostas diferentes, independente da qualidade do ferro testado. Variações no ganho de peso, por sua vez, levam à diferenças no volume sanguíneo e conseqüentemente, no ganho de hemoglobina total, causando alterações na capacidade de regeneração dos níveis de hemoglobina dos animais. Miller (1982) revisando os fatores que afetam a estimativa do RBV, propõe uma seleção criteriosa das variáveis consideradas como dose e resposta, de acordo com a ingestão de ferro e taxa de crescimento dos animais, em cada nível de suplementação estudado, e ainda, segundo o erro padrão dos diferentes valores de RBV calculados (RBV com me

nor erro padrão é mais preciso). A autora relata que constatou valores mais elevados de RBV quando utilizou ferro ingerido e não concentração de ferro dietético como variável independente (x) e ainda, quando usou o ganho de hemoglobina e não a concentração de hemoglobina final como variável dependente (y).

No presente trabalho o RBV foi estimado a partir das variáveis concentração final de hemoglobina (y) e nível de suplementação de ferro (x). Selecionou-se estas variáveis por serem aquelas utilizadas no trabalho de Fritz et al (1974), adotado como método oficial da AOAC. Além disso, não foram constatadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nos níveis de hemoglobina inicial (g/dL) e ganho de peso dos animais e nem na ingestão de ferro entre o grupo padrão e os grupos experimentais, para cada nível de suplementação de ferro considerado (6,12 ou 24 mg Fe/kg de ração), conforme tabelas 9 e 10. Ainda, os dados de concentração de hemoglobina final apresentaram pequenas variações intra grupos, resultando em baixos valores de erro padrão das médias (tabela 9) e, o coeficiente de variação desta medida de resposta foi menor que o do ganho de hemoglobina (g/dL) ou do ganho de hemoglobina total (g), como mostra a tabela 11. Sendo assim, estes dados parecem ser bem representativos e confiáveis.

Na tabela 15 estão apresentados os valores de RBV para o feijão integral e papa de feijão, estimados a partir de diferentes pares de variáveis. Observa-se que os valores encontrados quando utilizou-se o ganho de hemoglobina total (ΔHb_{total}) como variável dependente, foram semelhantes aos estimados a partir da concentração de hemoglobina final, como considerado no presente trabalho (tabela 12). No entanto, constatou-se um aumento do RBV quando o ganho de hemoglobina (ΔHb) foi uti

lizado como variável dependente, e valores de RBV ainda mais elevados quando as variáveis de regressão foram ganho de ferro hematínico ($\Delta\text{Hb-Fe}$) e ferro ingerido, como também constatado por Miller (1982). Estas diferenças podem ser melhor visualizadas na figura 7, que inclui os intervalos de confiança de 95 % para cada valor de RBV calculado. Observa-se que em todos os casos, o RBV da papa de feijão foi maior que o do feijão integral, embora essas diferenças sejam mínimas. De acordo com os valores de erro padrão, o RBV mais preciso foi o calculado a partir do ganho de hemoglobina total ($\Delta\text{Hb total}$) e nível de suplementação de ferro para o feijão integral ($73,1 \pm 0,6$), e no caso da papa de feijão foi aquele estimado considerando a variação na concentração de hemoglobina (ΔHb) e nível de ferro suplementado ($84,1 \pm 1,1$).

A seleção das variáveis de regressão para a estimativa do RBV depende, portanto, das condições experimentais de cada estudo. Entretanto, o ganho de hemoglobina total como critério de resposta pode ser mais confiável que a concentração de hemoglobina final, (utilizada no método adotado pela AOAC) porque leva em consideração diferenças na hemoglobina total inicial, bem como no ganho de peso ao longo do experimento. Por outro lado, o nível de suplementação de ferro pode ser usado como variável independente quando não houver diferenças significativas no consumo de ração e, portanto, no consumo de ferro entre o grupo padrão e os grupos experimentais, para cada nível de suplementação de ferro estudado.

TABELA 15 - VALOR BIOLÓGICO RELATIVO - RBV (%) ESTIMADO A PARTIR DE DIFERENTES PARES DE VARIÁVEIS, PARA RAÇÕES CONTENDO FEIJÃO INTEGRAL OU PAPA DE FEIJÃO^{1/}

FONTE DE FERRO	RBV-PARÂMETROS DE REGRESSÃO ^{2/}	PARES DE VARIÁVEIS (y/x)		
		Δ Hb TOTAL/ NÍVEL DE Fe	Δ Hb/ NÍVEL DE Fe	Δ Hb-Fe/ Fe INGERIDO
Padrão	RBV	100,0	100,0	100,0
	b	0,0603 ^{a3/}	0,3018 ^a	0,6132 ^a
	r ²	0,9954	0,9688	0,9982
Feijão Integral	RBV	73,1 \pm 0,6 ^{4/}	79,6 \pm 4,3	84,4 \pm 2,4
	b	0,0441 ^b	0,2403 ^a	0,5178 ^b
	r ²	0,9998	0,9942	0,9984
Papa de Feijão	RBV	75,0 \pm 4,3	84,1 \pm 1,1	87,9 \pm 7,4
	b	0,0452 ^b	0,2538 ^a	0,5390 ^{ab}
	r ²	0,9936	0,9996	0,9862

1/ RBV calculado a partir da inclinação da reta de regressão da fonte de ferro testada em relação à inclinação da reta do padrão (FeSO₄).

2/ Inclinação da reta (b) e coeficiente de determinação (r²).

3/ Valores em cada coluna seguidos da mesma letra não diferem entre si, pelo Teste t (p ≤ 0,05).

4/ RBV \pm erro padrão.

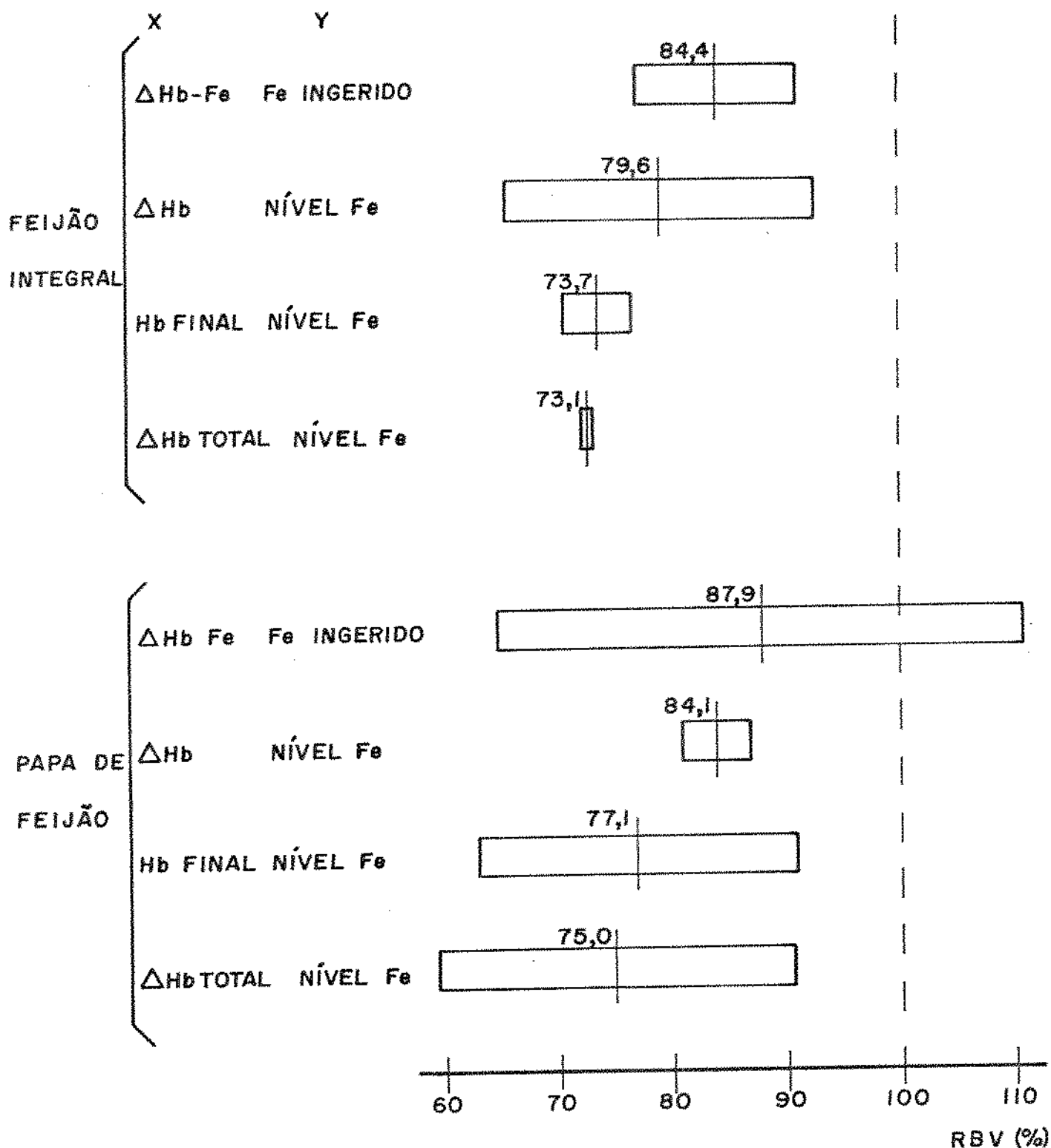


FIGURA 7 - Valor Biológico Relativo do ferro - RBV (%), a partir de diferentes pares de variáveis. RBV está expresso como uma porcentagem do valor biológico do ferro padrão (sulfato ferroso) que é considerado 100%. As linhas verticais representam os valores estimados de RBV e as barras horizontais, os intervalos de confiança de 95%.

5.3.2. Eficiência de Regeneração da Hemoglobina (HRE %)

Para a estimativa da proporção do ferro ingerido que foi retido como ferro hematínico (HRE %), considerou-se os dados dos grupos de animais que receberam ração suplementada ao nível de 24 e 36 mg Fe/kg. Decidiu-se avaliar a retenção nestes dois níveis para facilitar a comparação com dados de literatura, que geralmente estimam HRE utilizando dietas contendo ferro suplementado em torno destes níveis, e porque o nível 36 é semelhante aos requerimentos de ferro para o rato.

A retenção do ferro da papa de feijão suplementado ao nível de 24 mg/kg de ração, foi um pouco mais elevada que a do ferro do feijão integral, embora a diferença seja mínima, conforme os valores de HRE descritos na Tabela 13 ($52,7 \pm 5,7$ e $50,8 \pm 3,2\%$, respectivamente). Por outro lado, a retenção relativa ao sulfato ferroso (HRE relativo) foi de $87,3 \pm 9,4\%$ para a papa de feijão e de $84,1 \pm 5,3\%$ para o feijão integral. Estes valores são mais elevados do que os obtidos através do RBV, isto é, $77,1 \pm 4,4$ e $73,7 \pm 1,0\%$, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado por Forbes et al (1989) que através de um estudo colaborativo, encontraram valores mais elevados de HRE relativo (ao sulfato ferroso), do que de RBV (de acordo com AOAC), para uma mesma fonte de ferro, por exemplo, 86% e 77%, respectivamente, para o ferro eletrolítico.

Os resultados obtidos para a retenção do ferro do sulfato ferroso na forma de HRE, foram de $60,4 \pm 6,5\%$, ao nível de suplementação de 24 mg/kg e de $50,6 \pm 3,1$ para o nível 36. Estes valores são compatíveis com dados de literatura que demonstram, em ratos anêmicos, uma elevada retenção do ferro do sulfato

to ferroso - cerca de 50% a 67% (Mahoney et al , 1974, 1985 e 1987, Thannoun et al , 1987, Zhang et al, 1985). Constatou-se uma relação inversa entre os valores de HRE e o nível de suplementação de ferro ou o ferro ingerido, conforme tabela 13. Isto ocorreu tanto para o padrão - HRE de 60,4%, com uma ingestão de 0,67 mg Fe/dia e de 50,6%, com uma ingestão de 0,93 mg Fe/dia, como também no caso do feijão integral - HRE de 50,8% para a ingestão de 0,64 mg Fe/dia e de 41,9%, para ingestão de 0,74 mg Fe/dia. Buchoviski et al (1989) encontraram resultados semelhantes, isto é, HRE de 71% para o ferro padrão e de 47% para o ferro de uma mistura de fontes vegetais suplementados ao nível de 20 mg/kg de ração, e para as rações contendo 35 mg Fe suplementar/kg, estes valores foram reduzidos à 67% e 27%, respectivamente. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que níveis de suplementação de ferro semelhantes aos requerimentos do rato não representam níveis críticos, onde a eficiência de utilização do ferro é maior, como ocorre no caso dos níveis 20 ou 24.

Bianchi (1988), estudando a biodisponibilidade do ferro de produtos industrializados de soja, em ratos anêmicos mantidos por 14 dias consumindo rações contendo ferro suplementar ao nível de 36 mg/kg, encontrou um valor de 44,9% para o HRE do ferro da farinha de soja (HRE relativo = 85,1%). Estes resultados são similares aos observados na presente investigação para o ferro da farinha do feijão (HRE = 41,9% e HRE relativo = 82,8%), obtidos sob condições experimentais semelhantes, isto é, idade e "status" de ferro dos animais, número de animais por grupo, duração do experimento e nível de suplementação de ferro nas rações. Por outro lado, Dawood & Sgarbieri (1988), em um ensaio preliminar, investigaram a utilização do ferro do feijão 'Carioca 80' em ratos com anemia moderada (concentração de he

moglobina em torno de 8 g/dL), constatando uma retenção (na forma de ferro hematínico) de 34,7%. Este valor de HRE, menor do que o verificado para o feijão 'Carioca 80 S.H.' no presente trabalho, pode ser explicado pelas diferenças no grau de anemia dos animais que, quanto menos severa, menor a eficiência de utilização do ferro.

A literatura sobre a biodisponibilidade do ferro de fontes de origem vegetal, avaliada através da retenção na forma de ferro hematínico (HRE %), é vasta, com exceção para o feijão. Zhang et al (1985) relatam níveis de retenção de 64% para o ferro de ervilhas verdes, 53 % para o do farelo de cereais e 34% para o ferro do espinafre, com valores de HRE relativos de 96%, 79% e 51%, respectivamente. Mahoney et al (1987) avaliam a fortificação de ferro em uma mistura de cereais, encontraram níveis de retenção de 40% e 45% (HRE relativos de 63% e 71%, respectivamente). O ferro do pão de trigo integral se mostrou mais biodisponível que o do pão comum enriquecido (HRE de 53% e 41%, respectivamente) conforme relata Thannoun et al (1987). Nos trabalhos descritos acima, os autores utilizaram ratos em crescimento, anêmicos, tratados com doses de ferro em torno de 20 mg/kg de ração. No entanto, a comparação destes dados com os resultados da presente investigação é limitada devido as divergências das condições experimentais. Em geral, a anemia nestes estudos foi desencadeada mais rapidamente (cerca de 7 dias) através de sangria associada ao consumo de uma dieta pobre em ferro, e além disso, utilizando um período de repleção menor (10 dias). Conseqüentemente, os valores de HRE foram obtidos em ratos bem mais jovens, com demandas de ferro relativamente mais elevadas, configurando situações metabólicas diferentes, o que determina diferenças na eficiência de utilização do ferro pelo organismo.

Segundo Miller (1977), o HRE como medida de utilização de ferro apresenta as seguintes limitações: o cálculo deste índice envolve duas constantes (para estimar o volume de sangue do rato e o ferro hematínico), aumentando as fontes de erro e, os valores de HRE não são alterados (independente do consumo de ração e ganho de peso dos animais), somente para uma ingestão entre 0,12 e 0,5 mg Fe/dia, segundo Mahoney et al (1974). Por outro lado, Buchoviski et al. (1989), investigando a biodisponibilidade do ferro em condições experimentais diferentes daquelas tradicionalmente usadas para a estimativa do HRE, isto é, através de ratos adultos, anêmicos e não anêmicos, tratados com doses elevadas de ferro, constataram valores de HRE semelhantes às taxas de absorção aparente, para uma mesma fonte de ferro, testada em vários níveis de suplementação.

5.4. LIMITAÇÕES DO USO DO RATO COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA PREDIZER A BIODISPONIBILIDADE DO FERRO

Na tabela 16 estão contidas algumas das diferenças na utilização do ferro entre ratos e humanos, conforme dados de literatura. Observa-se que o metabolismo do rato é mantido principalmente pelo ferro dietético, particularmente na forma de ferro "não heme", apresentando maiores perdas basais deste elemento (Björn-Rasmussen, 1983), Dallman et al, 1982). Sendo assim, o rato não absorve o ferro nas mesmas proporções que os humanos e, dependendo do "status" de ferro, essas diferenças podem ser maiores ou menores. De acordo com diversos relatos, essas diferenças são principalmente quantitativas, sendo que a absorção do ferro pelo rato é em média, duas vezes maior que a do homem (Amine & Hegsted, 1974, Gordon & Chao, 1984, Schricker et

al , 1981). No entanto, o rato anêmico, recebendo doses críticas de ferro, pode absorver este nutriente em proporções muito mais elevadas, isto é, cerca de 40 a 70%, de acordo com a fonte de ferro testada, como demonstra Buchoviski et al (1989).

O rato como modelo experimental para avaliar a biodisponibilidade do ferro é geralmente empregado em condições metabólicas de máxima utilização (fase de crescimento, anêmico , tratado com pequenas doses de ferro), revelando taxas de absorção do ferro "não heme" de aproximadamente 50%, como constatado através dos valores de HRE obtidos no presente trabalho. No entanto, os estudos em humanos são conduzidos em condições experimentais totalmente diferentes, isto é, utilizam-se indivíduos adultos, eutróficos, recebendo doses de ferro muito acima de seus requerimentos. Isto determina grandes diferenças entre as taxas de absorção de ferro obtidas a partir de cada um destes modelos experimentais. Sabe-se que o organismo humano normal absorve em média 10% do ferro dietético, podendo utilizar até 35% do ferro "heme" e 20% do ferro "não heme", dependendo dos estoques de ferro e de fatores da dieta que promovem ou inibem a absorção do ferro "não heme" (Monsen et al , 1978). Estas taxas podem ser ainda mais elevadas se o indivíduo estiver em fase de crescimento (Saarinen & Siimes, 1979). Buchoviski et al (1989) sugerem que, para obter resultados de absorção do ferro em ratos, similares à absorção em humanos, é necessário utilizar condições experimentais semelhantes, isto é, ratos adultos, não anêmicos, ingerindo doses elevadas de ferro (bem acima dos requerimentos).

Apesar das diferenças na proporção do ferro ingerido que é absorvido pelo rato e pelo homem, o rato tem se mostrado como um bom modelo para prever a biodisponibilidade do ferro

de diferentes fontes, através de dados relativos à utilização de uma fonte de ferro referência, geralmente o sulfato ferroso (Mahoney & Hendricks, 1984, Miller, 1982, Schricker et al, 1981). Forbes et al (1989) através de um trabalho colaborativo, compararam a utilização biológica do ferro de uma mesma fonte, avaliada através de métodos "in vitro", em ratos (RBV% e HRE%) e em humanos (marcação extrínica dupla). Os autores constataram valores de RBV (relativo ao sulfato ferroso) obtidos em ratos (método da AOAC) semelhantes àqueles obtidos em humanos e recomendam o método de depleção e repleção da AOAC para prever a biodisponibilidade do ferro em alimentos.

Por outro lado, o modelo curativo (depleção e repleção de hemoglobina) tem se revelado mais eficiente para estimar a biodisponibilidade do ferro em ratos, do que o ensaio profilático (Amine & Hegsted, 1974, Miller, 1982). No entanto, modificações nos protocolos experimentais dificultam a comparação entre diferentes relatos de literatura. Estas modificações incluem: idade dos animais ao início do experimento, duração do período de depleção (e método de obtenção de anemia) e do período de repleção, variáveis dietéticas (formulação da dieta basal e níveis de suplementação de ferro), parâmetros utilizados para expressar a biodisponibilidade do ferro, entre outras. Sendo assim, a avaliação crítica das diferenças nas condições experimentais é fundamental para a interpretação e comparação dos dados de literatura. Segundo Van Campen (1983), nenhuma técnica ou sistema é perfeito, cada um tem seu potencial para somar informações sobre a biodisponibilidade do ferro, desde que conduzido propriamente e interpretado cuidadosamente.

TABELA 16 - DIFERENÇAS NA UTILIZAÇÃO DO FERRO PELO HOMEM E PELO RATO

FATORES	HOMEM	RATO	REFERÊNCIA
1. Maior fonte de ferro para metabolismo.	Ferro endógeno	Ferro dietético	Dallman et al , 1982 Flanagam et al , 1980
2. Perdas basais de ferro	Menores	Maiores	Björn-Rasmussen, 1983
3. Absorção do ferro "heme"	Maior	Menor	Forth & Rummel, 1973 Fritz et al , 1970
4. Absorção do ferro "não heme"	Menor	Maior	Gordon & Godber, 1989
5. Absorção dos ions ferrosos em relação aos ions férricos	Diferente	Igual	Fritz et al , 1970
6. Efeito da carne e ácido ascórbico sobre a absorção do ferro "não heme":	Aumenta	Nenhum efeito	Schricker et al, 1981 Chao & Gordon, 1983 Gordon & Godber, 1989
7. Efeito de fitatos e taninos na absorção do ferro "não heme"	Diminue	Aumenta	Gordon & Chao, 1984 Morris & Ellis, 1976 Diminue
8. Absorção do ferro no organismo depletado (com anemia)	Aumenta até 3 vezes	Aumenta até 7 vezes	Mahoney & Hendricks, 1984 Buchowski et al , 1989

5.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A farinha da papa de feijão foi processada de forma a conter menor quantidade de tegumento do que a farinha do feijão integral. Isto poderia determinar uma melhor utilização do ferro da papa em relação ao do feijão integral, visto que o tegumento do feijão é rico em fibras e compostos polifenólicos. No entanto, não foi constatado diferenças significativas na biodisponibilidade do ferro das duas farinhas, conforme os valores de RBV e HRE descritos no presente trabalho.

O ferro das farinhas do feijão foi bem utilizado pelos ratos, isto é, cerca de 74 a 77% (pelo método da AOAC) e de 83 a 87% (pelo método de Mahoney et al), em relação ao aproveitamento do ferro do sulfato ferroso. De acordo com os dados de HRE %, aproximadamente a metade do ferro consumido pelos ratos alimentados com rações suplementadas com as farinhas do feijão, foi utilizado para a síntese de hemoglobina. Estes dados têm valor relativo importante na discriminação da qualidade nutricional de diferentes fontes de ferro de origem vegetal. No entanto, são necessários estudos para investigar a utilização do ferro deste novo cultivar de feijão em refeições contendo alimentos de consumo rotineiro em nosso meio, bem como testá-lo como alimento de desmame e compará-lo com outras variedades de feijões, como fonte de ferro.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, podem ser estabelecidas as seguintes conclusões:

- O feijão 'Carioca 80 S.H.' na forma de farinha do feijão integral e de farinha da papa do feijão (cozido e liofilizado) apresentaram um conteúdo de 7,45 e 8,57 mg Fe/100 g, respectivamente, valores compatíveis com dados de literatura para feijões com cerca de 10% de umidade.

- O valor Biológico Relativo (RBV %) do ferro do feijão 'Carioca 80 S.H.' foi de 73,7% para o feijão integral e de 77,1% para a papa de feijão.

- A utilização biológica do ferro das farinhas do feijão em relação ao sulfato ferroso, estimada através do índice da Eficiência de Regeneração da Hemoglobina (HRE %) foi de 84,1% para o feijão integral e de 87,3% para a papa de feijão, valores um pouco mais elevados do que os obtidos através da metodologia preconizada pela AOAC (RBV %).

- Não foram constatadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na utilização biológica do ferro do feijão integral em relação ao da papa de feijão, tanto na forma de RBV% ou de HRE %.

- O feijão 'Carioca 80 S.H.' como fonte de ferro, su
plementado na ração basal ao nível das recomendações de ingesta
deste nutriente para o rato (36 mg/kg), não foi capaz de recupe
rar totalmente a anemia dos animais, durante os 14 dias de expe
rimento.

7. RESUMO

A anemia por deficiência de ferro permanece como o maior problema nutricional em todo o mundo, atingindo particularmente crianças entre seis meses e três anos de idade. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a utilização do ferro de um novo cultivar de feijão, 'Carioca 80 S.H.', na forma de farinha do feijão integral e da papa do feijão, como usualmente preparada para alimentação de desmame.

A biodisponibilidade do ferro foi avaliada através do método de depleção e repleção de hemoglobina (AOAC, 1984). Para isso foram utilizados ratos machos albinos, Wistar, recém desmamados que foram mantidos com uma ração basal, pobre em ferro durante 35 dias (fase de depleção). Após este período, os ratos anêmicos (hemoglobina ao redor de 6 g/dL) foram divididos em 12 grupos de 6 animais cada. O sulfato ferroso (ferro referência) e a farinha do feijão integral foram suplementados à ração basal ao nível de 6, 12, 24 e 36 mg Fe/kg e a farinha da papa do feijão, ao nível de 6, 12 e 24 mg Fe/kg de ração. Um grupo de animais permaneceu durante a fase de repleção (14 dias) com ração basal (controle negativo). A biodisponibilidade do ferro foi estimada através do Valor Biológico Relativo ou RBV % (AOAC), a par

tir da taxa de inclinação da curva dose-resposta (concentração final de hemoglobina/nível de suplementação de ferro), e através do Índice da Eficiência de Regeneração da Hemoglobina (HRE %), de acordo com Mahoney et al (1974).

Foram encontrados valores de 73,7% e 77,1% para o RBV do ferro do feijão integral e da papa de feijão, respectivamente. Os valores de HRE relativos foram um pouco mais elevados - 84,1 % para o feijão integral e 87,3% para a papa de feijão. Não foram constatadas diferenças significativas entre o RBV% ou HRE% do feijão integral em relação à papa de feijão.

8. SUMMARY

Iron deficiency anemia remain as a major nutritional problem around the world affecting mainly children in the age range of six months to three years of age. The objective of the present work was to evaluate iron bioavailability in a new cultivar of bean ('Carioca 80' S.H.) in the form of integral flour and of a partially decorticated flour after passage through a nylon sieve.

Iron bioavailability was determined with rats by the method of depletion and repletion of hemoglobin (AOAC, 1984). Male weanling rats of the Wistar strain were kept on a basal ration very poor in iron for 35 days (depletion phase). Then the anemic rats (6 g/dL hemoglobin) were divided into 12 groups each of six animals. Basal ration was supplemented with ferrous sulfate (reference iron) and with integral bean flour to provide iron to the levels of 6, 12, 24 and 36 mg Fe/kg of ration. A group of animals remained throughout the repletion phase (14 days) on the basal ration (negative control). The bioavailability of iron by this procedure known as Relative Biological Value (RBV %) was calculated by the slope of the dose-response line obtained with the bean flour iron (plot of hemoglobin concentration x iron supplementation level) relative to slope of dose-response line generated by the ferrous sulfate iron. Iron utilization was also estimated

by the Hemoglobin Regeneration Efficiency Index (HRE %) according to Mahoney et al (1974).

Encountered RBV values were 73.7% and 77.1% for the integral flour and partially decorticated bean flour iron, respectively. The HRE values relative to ferrous sulfate were 84.1% for the integral flour iron and 87.3% for the partially decorticated flour iron. No significant differences could be demonstrated between the RBV % or HRE % for the rat utilization of iron from the two types of bean flours.

9. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

01. ACOSTA, A., AMAR, M., CORNBLUTH-SZARFARC, S.C. et al. Iron absorption from typical Latin American diets. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 39, n. 6, p. 953-962, June, 1984.
02. AMINE, Ezzat K., HEGSTED, D. Mark. Biological assessment of available iron in food products. *J. Agr. Food Chem.*, Washington, v. 22, n. 3, p. 470-476, May/June, 1974.
03. AMINE, Ezzart K., HEGSTED, D. Mark. Effect of diet on iron absorption in iron-deficient rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v.101, n. 7, p. 927-936, July 1971.
04. AMINE, Ezzat K., NEFF, Raymond, HEGSTED, D. Mark. Biological estimation of available iron using chicks or rats. *J. Agr. Food Chem.*, Washington, v. 20, n. 2, p. 246-251, Mar./Apr. 1972.
05. ANDERSON, Arnold, S., PURVIS, George A., CHOPRA, Joginger, G. The introduction of mixed feeding in infancy. In: *Pediatric Nutrition Handbook*. Evanston: American Academy of Pediatrics, 1979. p. 139-152.

*) As referências bibliográficas, bem como as citações das mesmas no texto deste trabalho, estão dispostas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1988-1989).

06. ARAUJO, Rocival L., ARAUJO, M. Beatriz D.G., MACHADO, Rosan-
gela D. P. et al. Evaluation of a program to overcome vi-
tamin A and iron deficiencies in areas of poverty in Mi-
nas Gerais, Brasil. *Archivos Latinoamericanos de Nutri-
ción.*, Guatemala, v. 37, n. 1, p. 9-22, ene. 1987.
07. ARAYA ARAYA, Júlia. Metabolismo del hierro durante la recu-
peración de la rata desnutrida. *Archivos Latinoamericanos
de Nutrición.*, Caracas, v. 25, n. 3, p.261-272, set. 1975.
08. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official me-
thods of analysis.* 14. ed. Arlington: Sidney Williams ,
1985. 1141 p.
09. BAILEY, Lynn B., CERDA, James J. Iron and folato nutriture
during life cycle. *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, Basel, v. 56 ,
p. 56-92, 1988.
10. BAKER, S.J., DEMAeyer, E.M. Nutritional anemia: its unders-
tanding and control with special reference to the work of
the World Health Organization. *Am. J. Clin. Nutr.*, Be-
thesda, v. 32, n. 2, p. 368-417, Feb. 1979.
11. BEARD, John L., HUEBERS, Helmut, A., FINCH, Clement A. Pro-
tein depletion and iron deficiency in rats. *J. Nutr.*, Be-
thesda, v. 114, n. 8, p. 1396-1401, Aug. 1984.
12. BEATON, George H., COREY, Paul N., STEELE, Cathy. Conceptu-
al and methodological issues regarding the epidemiology of
iron deficiency and their implications for studies of the
funcional consequences of iron deficiency. *Am. J. Clin.
Nutr.*, Bethesda, v. 50, n. 3, p. 575-588, Sept. 1989.
13. BIANCHI, Maria de Lourdes Pires. Biodisponibilidade de fer-
ro em produtos industriaizados de soja. Dissertação (Dou-
torado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, USP, 1988.

14. BJÖRN-RASMUSSEM, Erik. Iron absorption: present knowledge and controversies. *Lancet*, London, v. 1, n. 8330, p. 914-916, Apr. 1983.
15. BJÖRN-RASMUSSEM, Erik, HALBERG, Leif, WALKER, Richard B. Food iron absorption in man. II. Isotopic exchange of iron between labeled foods and between a food and an iron salt. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 26, n. 12, p.1311-1319, Dec. 1973.
16. BRANDALISE, Silvia R., MATSUDA; Eduardo. Anemias carenciais. In: NOBREGA; Fernando José de. *Desnutrição: intra uterina e pós natal*. 2. ed. São Paulo: Panamed, 1986. p. 427-437.
17. BUCHOWSKI, Maciej S., MAHONEY, Arthur W., KALPALATHIKA, Mrudula P.V. Nonheme iron absorption, apparent iron absorption and hemoglobin regeneration efficiency in anemic and normal rats fed with dietary heme and nonheme iron at various levels. *Nutr. Res.*, New York, v. 9, n. 7, p. 773-783 July 1989.
18. CALLENDER, Sheila T., MARNEY JR., S.R., WARNER, G.T. Eggs and iron absorption. *Brit. J. Haematol.*, Oxford, v. 19, n. 6, p. 657-665, Dec. 1970.
19. CHAO, Lucia S., GORDON, Dennis T. Influence of fish on the bioavailability of plant iron in the anemic rat. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 113, n. 8, p. 1643-1652, Aug. 1983.
20. CHAUSOW, Daniel G., CZARNECKI-MAULDEN, Gail L. The relative bioavailability of iron from feedstuff of plant and animal origin to the chick. *Nutr. Res.*, New York, v. 8, n.2 p. 175-185, Feb. 1988.
21. CLYDESDALE, Fergus M. Physicochemical determinants of iron bioavailability. *Food Tech.*, Chicago, v. 37, n. 10, p. 133-144, Oct. 1983.

22. CONLEY, Maureen C., HATHCOCK, John N. Effects of dietary protein and amino acids on iron utilization by iron-depleted rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 108, n. 3, p. 475-480, Mar. 1978.
23. CONSAUL, James Ross, LEE, Ken. Extrinsic tagging in iron bioavailability research: a critical review. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 31, n. 4, p. 684-689, July / Aug. 1983.
24. COOK, James D. Determinants of nonheme iron absorption in man. *Food Tech.*, Chicago, v. 37, n. 10, p. 124-126, Oct. 1983.
25. COOK, James D. Absorption of food iron. *Fed. Proc.*, Bethesda, v. 36, n. 7, p. 2028-2032, June 1977.
26. COOK, James D., LAYRISSE, Miguel, MARTÍNEZ-TORRES, Carlos et al. Food iron absorption measured by an extrinsic tag. *J. Clin. Invest.*, New York, v. 51, n. 4, p. 805-815, Apr. 1972.
27. COOK, James D., MONSEN, Elaine R. Vitamin C the common cold and iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 30 n. 2, p. 235-241, Feb. 1977.
28. COOK, James D., MORCH, T.A., LYNCH, Sean R. The inhibitory effect of soy products on nonhaem iron absorption in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 34, n. 12, p. 2622-2629, Dec. 1981.
29. CROSBY, William H., MUNN, S.I., FURTH, F.W. Standardized method for clinical hemoglobinometry. *U.S. Armed Forces Med. J.*, Washington, v. 51, p. 693-703, 1954.
30. DALLMAN, Peter R., REFINO, Canio, YLAND, Marc J. Sequence of development of iron deficiency in the rat. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 35, n. 4, p. 671-677, Apr. 1982.

31. DAWOOD, Liana C., SGARBIERI, Valdemiro C. Biodisponibilidade de ferro do feijão 'Carioca 80' (*Phaseolus vulgaris*, L.) Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1988. (dados não publicados).
32. DESAI, I.D., TAVARES, M. L. G., DUTRA DE OLIVEIRA, B.S. et al. Food habits and nutritional status of agricultural migrant workers in Southern Brasil. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 33, n. 3, p. 702-714, Mar. 1980.
33. DISLER, P.B., LYNCH, Sean R., TORRANCE, J. O. et al. The mechanism of the inhibition of iron absorption by tea. *S. Afri. J. Med. Sci.*, Johannesburg, v. 40, n. 4, p.109-116, Apr. 1975.
34. DUTRA DE OLIVEIRA, José Eduardo. Studies on the nutritive value of beans. In: JAFFÉ, Werner G., DUTRA DE OLIVEIRA, José Eduardo. *Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods*. Caracas, Latin American Nutrition Society, 1973. p.13-26.
35. ELIAS, Luiz G., BRESSANI, Ricardo. Métodos biológicos para la evaluacion de leguminosas de grano. In: REUNIÓN DE LA SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE NUTRICIÓN, 4., 1976, Caracas. *Anais...* Caracas: SLAN, 1976. p. 139-143.
36. FAIRWEATHER-TAIT, Susan J. The concept of bioavalilability as it relates to iron nutrition. *Nutr. Res.*, New York, v. 7, n. 3, p. 319 - 325, Mar. 1987.
37. FERNANDEZ, Roger, PHILLIPS, S.F. Components of fiber bind iron "in vitro". *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 35, n. 1., p. 100-106, Jan. 1982.
38. FINCH, Clement A, COOK, James D. Iron deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 39, n. 3, p. 471-477, Mar.1984.
39. FLANAGAN, Peter R., HAIST, James, VALBERG, Leslie S. Comparative effects of iron deficiency induced by bleeding and a low - iron diet on the intestinal absorptive interactions of iron, cobalt, manganese, zinc, lead and cadmium. *J.Nutr.*, Bethesda, v.110, n. 9. p. 1754-1763, Sept.1980.

40. FLORENTINO, Rodolfo F, GUIRRIEC, Romualda M. Prevalence of nutritional anemia in infancy and childhood with emphasis on developing countries. In: STEKEL, Abraham. Iron nutrition in infancy and childhood. New York: Raven Press, 1984. p. 61-73.
41. FORBES, Allan L., ADAMS, Catherine E., ARNAUD, Maurice J. et al. Comparison of in vitro, animal, and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutritional Anemia Consultive Group Task Force report on iron bioavailability. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v. 49, n. 2, p. 225-238, Feb. 1989.
42. FORTH, W., RUMMEL, W. Iron absorption. Physiol. Rev., Bethesda, v. 53, n. 3, p. 724-792, Mar. 1973.
43. FOSSI, Marlene, MÉNDEZ-CASTELLANO, Hernán, JAFFÉ, Werner G. et al. Perfil hematológico y absorción del hierro de dietas que consume la población de estrato socioeconómico bajo de los estados de Venezuela. Archivos Latinoamericanos de Nutrición., Guatemala, v. 37, n. 1, p. 23-35, ene.1987.
44. FRITZ, James C., PLA, Gwendolyn W., HARRISON, Bertha N. et al. Collaborative study of the rat hemoglobin repletion test for bioavailability of iron. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, v. 57, n. 3, p. 513-517, May 1974.
45. FRITZ, James C., PLA, Gwendolyn, W., HARRISON, Bertha N. et al. Estimation of bioavailability of iron. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, v. 58, n. 5, p. 902-905, Sept. 1975.
46. FRITZ, James C., PLA, Gwendolyn W., HARRISON, Bertha N. et al. Measurement of the bioavailability of iron, using the rat hemoglobin repletion test. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, v. 61, n. 3, p. 709-714, May 1978.
47. FRITZ, James C., PLA, Gwendolyn W., ROBERTS, Talmadge et al. Biological availability in animals of iron from common dietary sources. J. Agr. Food Chem., Washington, v. 18, n. 4. p. 647-651, July /Aug. 1970.

48. GARCIA-LOPEZ, J. Salvador, LEE, Ken. Iron binding by fiber is influenced by competing minerals. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 50, n. 2, p. 424-425, p. 428, Mar./Apr. 1985.
49. GÓMEZ BRENES, Roberto, ELÍAS, Luiz G., MOLINA, M. R. et al. Changes in chemical composition and nutritive value of common beans and other legumes during house cooking. In: JAFFÉ, Werner G., DUTRA DE OLIVEIRA, José Eduardo. *Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods*. Caracas, Latin American Nutritional Society, 1973. p. 13-26.
50. GORDON, Dennis T., CHAO, Lucia S. Relationship of components in wheat bran and spinach to iron bioavailability in the anemic rat. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 114, n. 3, p. 526-535, Mar. 1984.
51. GORDON, Dennis T., GODBER, J. Samuel. The enhancement of nonheme iron bioavailability by beef protein in the rat. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 119, n. 3, p. 446-452, Mar. 1989.
52. HALLBERG, Leif. Bioavailable nutrient density: a new concept applied in the interpretation of food iron absorption data. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 34, n. 10, p. 2242-2247, Oct. 1981a.
53. HALLBERG, Leif. Bioavailability of dietary iron in man. *Ann. Rev. Nutr.*, Palo Alto, CA, v. 1, n. 1, p. 123-147, Jan. 1981 b.
54. HALLBERG, Leif. Combatendo a anemia. *Receita: Informativo sobre Nutrição Humana*. São Paulo: Roche, 1981c. 28 p. (Edição especial, 1).
55. HALLBERG, Leif, BRUNE, M., ROSSANDER, Lena. Iron absorption in man: ascorbic acid and dose dependent inhibition by phytate. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 49, n. 1, p. 140-144, Jan. 1989.

56. HALLBERG, Leif, ROSSANDER, Lena. Improvement of iron nutrition in developing countries: comparison of adding meat, soy protein, ascorbic acid, citric acid, and ferrous sulphate on iron absorption from a simple Latin American type of meal. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 39, n. 4, p. 577-583, Apr. 1984.
57. HAZELL, Terence. Minerals in foods: dietary sources, chemical forms interactions, bioavailability. *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, Basel, v. 46, p. 1-123, 1985.
58. HEGSTED, D. Mark, NEEF, Raymond, WORCESTER, Jane. Determination of the relative nutritive value of proteins. *J. Agr. Food Chem.*, Washington, v. 16, n. 2, p. 190-195, Mar./Apr. 1968.
59. HERBERT, Victor. Recommended dietary intakes (R.D.I.) of iron in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 45, n. 4, p. 679-686, Apr. 1987.
60. HOUSE, William A., WELCH, Ross M. Bioavailability to rats of iron in six varieties of wheat grain intrinsically labeled with radioiron. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 117, n. 3, p. 476-480, Mar. 1987.
61. HURRELL, Richard F., LYNCH, Sean R., TRINIDAD, Trinidad P. et al. Iron absorption in humans: bovine serum albumin compared with beef muscle and egg white. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 47, n. 1, p. 102-107, Jan. 1988.
62. IBGE. Estudo Nacional da Despesa Familiar (ENDEF): Consumo alimentar - Antropometria. Rio de Janeiro, 1977. 7 fasc.
63. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3. ed. São Paulo, 1985. v. 1. 533 p.
64. INSTITUTO NACIONAL DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO. Projeto de combate às carências nutricionais específicas. Brasília, 1984.

65. JOHNSON, Phyllis E., LUKASKI, Henry C., BROWMAN; Thad D. Effects of level and saturation of fat and iron level and type in the diet on iron absorption and utilization by the rat. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 117, n. 3, p. 501-507, Mar. 1987.
66. KROE, Donald, KINNEY, Thomas D, KAUFMAN, Nathan et al. The influence of amino acids on iron absorption. *Blood*, New York, v. 21, n. 5, p. 546-552, May 1963.
67. KUVIBIDILA, Solo. Iron deficiency, cell-mediated immunity and resistance against infections: present knowledge and controversies. *Nutr. Res.*, New York, v. 7, n. 9, p. 989-1003, Sept. 1987.
68. LAYRISSE, Miguel, COOK, James D., MARTÍNEZ-TORRES, Carlos et al. Food iron absorption: a comparison of vegetable and animal foods. *Blood*, New York, v.33, n. 3, p. 430-443, Mar. 1969.
69. LAYRISSE, Miguel, MARTÍNEZ-TORRES, Carlos, ROCHE, Marcel. Effect of interaction of various foods on iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 21, n. 10, p. 1175 - 1183, Oct. 1968.
70. LEE, Kenneth, CLYDESDALE, Fergus M. Quantitative determination of the elemental, ferrous, ferric, soluble, and complexed iron in foods. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 44, n. 2, p. 549-554, Mar. 1979.
71. LINDER, M. C., MUNRO, Hamish N. The mechanism of iron absorption and its regulation. *Fed. Proc.*, Bethesda, v. 36 n. 7, p. 2017-2022, June 1977.
72. LYNCH, Sean R., BEARD, John, L., DASSENKO, Sandra A. et al. Iron absorption from legumes in human. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 40, n. 1, p. 42-47, July 1984.
73. LYNCH, Sean R., COOK, James D. Interaction of vitamin C and iron. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 355, n. 1, p. 32-35, Jan. 1980.

74. MAHONEY, Arthur W., HENDRICKS, Deloy G. Potencial of the rat as model for predicting iron bioavailability for humans. *Nutr. Res.*, New York, v. 4, n. 5, p. 913-922, Sept. Oct. 1984.
75. MAHONEY, Arthur, W., FARMER, Bonnie R., HENDRICKS, Deloy G. Effects of level and source of dietary fat on the bioavailability of iron from turkey meat for the anemic rat. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 110, n. 8, p. 1703-1708, Aug. 1980.
76. MAHONEY, Arthur W., VAN ORDEN, Claudia C., HENDRICKS, Deloy G. Efficiency of converting food iron into hemoglobin by the anemic rat. *Nutr. Metabol.*, Basel, v. 17, n. 2, p. 223-230, Feb. 1974.
77. MAHONEY, Arthur W., WHITTAKER, Paul, FARMER, Bonnie R. et al. Iron bioavailability in an anemic rat model: effect of food iron restriction. *Nutr. Rep. Intern.*, Los Altos, v. 31, n. 2, p. 457-463, Feb. 1985.
78. MAHONEY, Arthur W., WHITTAKER, Paul, PARK, Young W. et al. Iron bioavailability of breakfast cereals supplemented with different iron sources. *Nutr. Rep. Intern.*, Los Altos, v. 35, n. 2, p. 251-258, Feb. 1987.
79. MARGO, Geoffrey, BARONI, Yvonne, GREEN, Ralph et al. Anemia in urban underprivileged children. Iron, folate, and vitamin B₁₂ nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 30, n. 6, p. 947-954, June 1977.
80. MILLER, Josephine. Factors affecting evaluation of relative biological value of dietary iron for rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 112, n. 12, p. 2381-2385, Dec. 1982.
81. MILLER, Josephine. Study of experimental conditions for most reliable estimates for relative biological value of iron in bread. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 25, n. 1, p. 154-158, Jan./Feb. 1977.

82. MONSEN; Elaine R. Iron nutrition and absorption: dietary factors which impact iron bioavailability. *J. Am. Diet. Assoc.*, Chicago, v. 88, n. 7, p. 786-790, July 1988.
83. MONSEN, Elaine R., HALLBERG, Leif, LAYRISSE, Miguel et al. Estimation of available dietary iron. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 31, n. 1, p. 134-141, Jan. 1978.
84. MONTEIRO, Carlos Augusto. *Saúde e nutrição das crianças de São Paulo*. São Paulo: HUCITEC/EDUSP, 1988. 165 p.
85. MORAES, Roberto M. de, ANGELUCCI, Eidiomar. Chemical composition and amino acid contents of Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.*, Chicago, v. 36, n. 3, p. 493-494, Apr. 1971.
86. MORRIS; Eugene R. An overview of current information on bioavailability of dietary iron to humans. *Fed. Proc.*, Bethesda, v. 42, n. 6, p. 1716-1720, Apr. 1983.
87. MORRIS; Eugene R., ELLIS, Rex. Isolation of monoferric phytate from wheat bran and its biological value as an iron source to the rat. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 106, n. 6, p. 753-760, June 1976.
88. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Control of diets in laboratory animal experimentation. *Nutr. Abs. Rev.: Sér. B*, London, v. 49, n. 11, p. 413-419, Nov. 1979.
89. OHIRA, Y., KOZIOL, B.J., EDGERTON, V.R. et al. Oxygen consumption and work capacity in iron-deficient anemic rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 111, n. 1, p. 17-25, Jan. 1981.
90. OLSZON, Elizabeth, ISAKSSON, Björn, NORRBY, Anders et al. Food iron absorption in iron deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 31, n. 1, p. 106-111, Jan. 1978.
91. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Lucha contra la anemia nutricional, especialmente contra la carencia de hierro. Ginebra, 1975. 57 p. (Série de Informes Técnicos, 580).

92. PABÓN DE ROZO, Martha, VAN CAMPEN, Darrell, MILLER, Dennis D. Effects of some carbohydrates on iron absorption. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Guatemala, v. 36, n. 4, p. 688-700, dic. 1986.
93. PAULETTO, Maria Corália. Biodisponibilidade do ferro em alimentos no desmame. Dissertação (Mestrado em Pediatria) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 1984.
94. PIMENTEL GOMES, Frederico. Curso de estatística experimental. 12. ed. Piracicaba: Nobel, 1987. 467 p.
95. POMPEU, Antonio S., ROSTON, Antonio J. Feijoeiro: Carioca 80 (sem halo). São Paulo: Secretaria da Agricultura, 1988 (Comunicado Técnico, 74).
96. RONCADA, Maria José, SZARFARC, Sophia Cornblüth. Hipovitaminose A e anemia ferropriva em gestantes de duas comunidades do Vale do Ribeira (Estado de São Paulo, Brasil). *Rev. Saúde Públ.*, São Paulo, v. 9, n. 2, p.99-106, jun. 1975.
97. SAARINEN, Ulla M., SIIMES, Martti A. Iron absorption from breast milk, cow's milk and iron - supplemented formula: an opportunistic use of changes in total body iron determined by hemoglobin, ferritin, and body weight in 132 infants. *Pediat. Res.*, v. 13, n. 3, p. 143-147, Mar. 1979.
98. SARRUGE; J. R., HAAG, H.P. Análise química em plantas. Piracicaba: ESALQ-USP, 1974. 56 p.
99. SATHE, Shridhar K., DESHPANDE, S.S., SALUNKLE, D.K. Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part 2. Chemical composition: carbohydrates, fiber, minerals, vitamins, and lipids. *CRC Crit. Rev. Food Sci.*, Cleveland, v. 21, n. 1, p. 41-93, Jan. 1984.
100. SCHRICKER, Brian R., MILLER, Dennis D., RASMUSSEN, Roberto R. et al. A comparison of "in vivo" and "in vitro" methods for determining availability of iron from meals. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 34, n. 10, p. 2257-2263, Oct. 1981.

101. SGARBIERI, Valdemiro C. Composition and nutritive value of beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, Basel, v. 60, p. 132-198, 1989.
102. SGARBIERI, Valdemiro C., ANTUNES, Pedro L., ALMEIDA, Luiz D. Nutritional evaluation of four varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *J. Food Sci.*, Chicago, v. 44, n. 5, p. 1306-1308, Sept./Oct. 1979.
103. SHERMAN, Adria R., HELYAR, Lesley, WOLINSKY, Ira. Effects of dietary protein concentration on trace mineral (copper, iron and zinc) in rat tissues at different ages. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 115, n. 5, p. 607-614, May 1985.
104. SIGULEM, Dirce M., TUDISCO, Eliete Salomon, GOLDENBERG, Paulete et al. Anemia ferropriva em crianças do município de São Paulo. *Rev. Saúde Publ.*, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 168-178, jun. 1978.
105. SMITH, K. T. Effects of chemical environment on iron bioavailability measurements. *Food Tech.*, Chicago, v. 37, n. 10, p. 115-120, Oct. 1983.
106. SNEDEKER, Suzanne M., SMITH, Sylvia A., GREGER, J.L. Effect of dietary calcium and phosphorus levels on the utilization of iron, copper, and zinc by adult males. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 112, n. 1, p. 136-143, Jan. 1982.
107. STEEL, Robert G. D., TORRIE, James H. *Principles and procedures of statistics*. New York: McGraw-Hill, 1960. 481 p.
108. STEKEL, Abraham, AMAR, Mirna, CALVO, Elvira et al. Nutritional significance of interactions between iron and food components. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Guatemala, v. 33, n. 1, p. 33-41, mar. 1983.
109. SZARFARC, Sophia Cornblith. Diagnóstico de deficiência de ferro na infância. *Rev. Saúde Publ.*, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 278-284, jun. 1985.

110. TEZOTO, Sueli S., SGARBIERI, Valdemiro C. Protein nutritive value of a new cultivar of bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 38, n. 4, p. 1152-1156, July/Aug. 1990.
111. THANNOUN, Abdullah M., MAHONEY, Arthur W., HENDRICKS, Deloy G. et al. Effect of meat-bread mixtures on bioavailability of total dietary iron for anemic rats. *Cereal Chem.*, St. Paul, v. 64, n. 6, p. 399-403, Nov./Dec., 1987.
112. UNDERWOOD, E.J. Iron. In: ——— Trace elements in human and animal nutrition. 4. ed. New York: Academic Press, 1977. p. 13-55.
113. VAN CAMPEN, Darrell. Iron bioavailability techniques: an overview. *Food Tech.*, Chicago, v. 37, n. 10, p. 127-132, Oct. 1983.
114. VAN CAMPEN, Darrell. Enhancement of iron absorption from ligated segments of rat intestine by histidine, cysteine, and lysine: effects of removing ionizing groups and of stereoisomerism. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 103, n. 1, p. 139-142, Jan. 1973.
115. VYAS, Devhuti, CHANDRA, R.K. Functional implications of iron deficiency. In: STEKEL, Abraham. *Iron nutrition in infancy and childhood*. New York: Raven Press, 1984. p. 45-59.
116. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Requirements of ascorbic acid, vitamin D, vitamin B, folate and iron. Geneva, 1970 (WHO Tech. Rpt. Ser., 452).
117. WRIGHT, Anthony J.A., SOUTHON, Susan, FAIRWEATHER-TAIT, Susan J. Measurement of non-haem iron absorption in non-anemic rats using ^{59}Fe : can the Fe content of duodenal mucosal cells cause lumen or mucosal radioisotope dilution, or both, thus resulting in the underestimation of Fe absorption? *Brit. J. Nutr.*, London, v. 62, n. 3, p. 719-727, Nov. 1989.