

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por HILDA ROSA TORIN e aprovada pela Comissão Julgadora em 12 de abril de 1996.

Campinas, 12 de abril de 1996


PROF. DR. JAIME AMAYA FARFÁN

Presidente da Banca

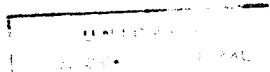
DIETAS A BASE DE FARELO DE ARROZ. EFEITO NA COMPOSIÇÃO
MINERAL DO FÊMUR DE RATO, AVALIADO POR PROCESSAMENTO DA
IMAGEM RADIOGRÁFICA

HILDA ROSA TORIN
Bióloga

PROF. DR. JAIME AMAYA-FARFÁN.
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor
em Ciência da Nutrição.

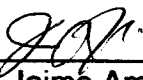
1996



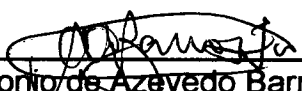
UNIDADE	BC
CODINHA:	TIUNICAMP
	T632d
V	Fe
1	27761
2	667/96
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
0	
1	
2	
3	
4	
5	

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese defendida e aprovada, em 12 de Abril de 1996, pela banca examinadora constituída por:



Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
Orientador



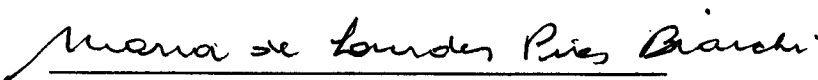
Prof. Dr. Antonio de Azevedo Barros Filho
Membro

Prof. Dr. João Francisco Marques Neto
Membro

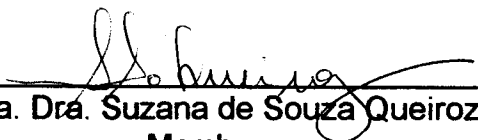


Prof. Dr. Livio Nanni
Membro

Profa. Dra. Maria Antonia Martins Galeazzi
Membro



Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi
Membro



Profa. Dra. Suzana de Souza Queiroz
Membro

*A minha maravilhosa família e
à Dra. Dinah Sharon de Seidl
pelo seu apoio e estímulo permanente
durante a minha formação profissional.*

*Não há sonho que alcance,
nem voz que se faça forte,
nem esperança que aguente,
não há um só projeto que sirva,
nem um lugar na terra
onde ser feliz.*

*Nem sobrevive o sol
nem brilha mais uma estrela,
nem me acalma teu amor
nem o sorriso dos meus filhos.
Se aqui perto de mim
há crianças com fome
que acariciam a morte.*

*Só ha uma maneira possível:
parar-se de frente à justiça,
abrir as mãos, pôr
o coração para cima
e sair à vida
com toda a vida dentro.*

María Teresa DiFalco

Agradecimentos

Ao Dr. Jaime Amaya-Farfán pela sua valiosa orientação, confiança e amizade.

À Indústria Riograndense de Óleos Vegetais Ltda. (IRGOVEL), pelo fornecimento do farelo de arroz.

À Sra. Eliethe de Carvalho quem sempre colaborou com a sua experiência profissional e dedicação no trabalho do Laboratório de Ensaaios Biológicos.

À Prof. Rita Elaine Franciscato Corte do Centro de Engenharia Biomédica da UNICAMP pela assessoria na realização das exposições radiográficas e digitalização das imagens.

À SDC Engenharia, Sistemas, Eletrônica, Importações e Exportações Ltda. pelo fornecimento do equipamento óptico e software, indispensáveis para a realização deste trabalho. Em especial, aos Srs. Aquiles Ferreira Nobre e Flávio Hirata pela assessoria no uso dos equipamentos.

Ao Dr. Livio Nanni e ao pessoal do Serviço de Radiologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP pela ajuda na realização dos testes para a padronização das exposições radiográficas.

Ao Centro de Assistência Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da UNICAMP, em especial à Sra. Guiomar Chagas, pela colaboração na utilização do aparelho de mamografia para as exposições radiográficas.

À Dra. Maria Antonia Martins Galeazzi Diretora do Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação (NEPA) da Universidade Estadual de Campinas pelo acesso às suas instalações para a realização de parte das análises.

À Dra. Diulza Mantovani e Marcelo Morgano do Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas (ITAL), assim como ao Dr. Takashi Muraoka e Dra. Maria Fernanda Gine Rosias do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo, pela colaboração na análise dos minerais.

Ao Laboratório de Cereais do Dpto. de Tecnologia de Alimentos da FEA, pela possibilidade de utilização dos seus equipamentos, em especial aos Srs. Waldeci Pereira dos Santos e Nilo Marques pela ajuda na sua operação.

À Sra. Yara F. Honório pela sua ajuda com as imagens fotográficas.

Ao Dr. José Michel Kalaf da Casa de Saúde de Campinas, pela atenção dispensada para a realização dos testes de densitometria óssea.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Bolsa de Estudos concedida para a realização do curso.

Ao "Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas" (CONICIT), Caracas-Venezuela, pelo apoio financeiro cedido para a culminação do curso.

Ao Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (FAEP) pelo auxílio financeiro concedido.

A Cristiane Alfredo e Margareth Randi Moraes da Secretaria de Pós-graduação da FEA pela colaboração constante e eficiente.

Aos amigos, Caroline, Paula, Margareth, Ricardo, Liliana, Márcio, Manuel, Erna, Mabel, Rosa, Dalton. Claudia, Mara, Pilar, Nelson e Conceição que durante estes anos fizeram mais grata a minha passagem por esta terra tão querida hoje.

À minha grande amiga, Semíramis pelo seu carinho, paciência, e ombro amigo durante todos estes anos, e por ter sido, junto com César, Marina e César Filho, a minha segunda família.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FOTOGRAFIAS	xv
LISTA DE RADIOGRAFIAS	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Fração mineral do farelo de arroz	5
2.2. Tecido ósseo	7
2.3. Fatores nutricionais relacionados com o tecido ósseo	11
2.3.1. Vitamina D	11
2.3.2. Cálcio e fósforo	13
2.3.3. Zinco e cobre	15
2.4. Métodos de avaliação mineral óssea	18
3. OBJETIVOS	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Material	22
4.1.1. Ingredientes e dietas	22
4.1.1.1. Ingredientes	22
4.1.1.2. Dietas	22

4.1.2. Animais.....	25
4.2. Métodos.....	25
4.2.1. Análises químicas.....	25
4.2.2. Ensaio biológico.....	25
4.2.2.1. Tratamentos.....	25
4.2.2.2. Tecidos.....	27
4.2.2.3. Exposições radiográficas.....	27
4.2.2.4. Medida indireta do conteúdo mineral ósseo.....	28
4.2.3. Análise estatística.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1. Análises químicas.....	32
5.1.1. Composição química.....	32
5.1.2. Inibidores de tripsina.....	37
5.1.3. Ácido fítico.....	37
5.2. Ensaio biológico.....	37
5.2.1. Deposição mineral óssea.....	37
5.2.2. Determinações físicas.....	49
5.2.3. Fotodensitometria.....	54
6. CONCLUSÕES.....	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ácido fítico ou mioinositol hexafosfato ($C_6H_{18}O_{24}P_6$).....	6
Figura 2. Representação da estrutura do tecido ósseo.....	8
Figura 3. Ativação da vitamina D_3 e sua função no controle da concentração plasmática de cálcio	12
Figura 4. Elementos utilizados para a realização das exposições radiográficas e o seu posicionamento	29
Figura 5. Esquema do equipamento óptico utilizado na digitalização de imagens	31
Figura 6. Composição química do farelo de arroz (g/100g).....	33
Figura 7. Conteúdo em cinzas (%) dos fêmures do Bloco 1.....	39
Figura 8. Equivalentes em massa de alumínio total dos fêmures do Bloco 1.....	55
Figura 9. Regressões lineares entre equivalentes de alumínio (EqAl) do Bloco 1 e os seguintes indicadores: 1: teor de cinzas no fêmur (%). 2: peso do fêmur (g)	63
Figura 10. Regressão linear entre os equivalentes de alumínio (EqAl) e o conteúdo em cálcio dos fêmures dos ratos do Bloco 1	64

Figura 11. Regressão linear entre os equivalentes de massa de alumínio (EqAl) dos côndilos e fêmures dos animais submetidos aos diferentes tratamentos alimentares	66
Figura 12. Regressões lineares entre equivalentes de massa de alumínio (EqAl) do Bloco A e os seguintes indicadores: 1: peso do fêmur (g). 2: conteúdo em cinzas do fêmur (%)	70
Figura 13. Regressões lineares entre equivalentes de massa de alumínio (EqAl) do Bloco B e os seguintes indicadores: 1: peso do fêmur (g). 2: conteúdo em cinzas do fêmur (%)	71
Figura 14. Regressões lineares entre equivalentes de massa de alumínio (EqAl) do Bloco C e os seguintes indicadores: 1: peso do fêmur (g). 2: conteúdo em cinzas do fêmur (%)	72
Figura 15. Regressões lineares entre equivalentes de massa de alumínio (EqAl) do Bloco D e os seguintes indicadores: 1: peso do fêmur (g). 2: conteúdo em cinzas do fêmur (%)	73
Figura 16. Regressões lineares entre equivalentes de massa de alumínio (EqAl) do Bloco A e o conteúdo dos seguintes minerais no fêmur: 1: cálcio (mg). 2: fósforo (mg). 3: cobre (µg). 4: zinco (µg)	75
Figura 17. Regressões lineares entre equivalentes de massa de alumínio (EqAl) do Bloco B e o conteúdo dos seguintes minerais no fêmur: 1: cálcio (mg). 2: fósforo (mg). 3: cobre (µg). 4: zinco (µg)	76
Figura 18. Regressões lineares entre equivalentes de massa de alumínio (EqAl) do Bloco C e o conteúdo dos seguintes minerais no fêmur: 1: cálcio (mg). 2: fósforo (mg). 3: cobre (µg). 4: zinco (µg)	77

Figura 19. Regressões lineares entre equivalentes de massa de alumínio (EqAl) do Bloco D e o conteúdo dos seguintes minerais no fêmur: **1:** cálcio (mg). **2:** fósforo (mg). **3:** cobre (μg). **4:** zinco (μg) 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da dieta Basal.....	23
Tabela 2 . Protocolo dos tratamentos com os quatro minerais.....	24
Tabela 3. Composição em zinco, cálcio, cobre, ferro e fósforo do farelo de arroz.....	34
Tabela 4. Composição química das dietas experimentais (g/100g).....	35
Tabela 5. Composição em zinco, cálcio, cobre, ferro e fósforo das dietas experimentais.....	36
Tabela 6. Conteúdo de cinzas (%) e deposição de zinco, cálcio, cobre e fósforo dos fêmures dos animais submetidos aos diferentes tratamentos alimentares.....	40
Tabela 7. Conteúdo de cinzas (%) e deposição de zinco, cálcio, cobre e fósforo dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco A.....	41
Tabela 8. Conteúdo de cinzas (%) e deposição de zinco, cálcio, cobre e fósforo dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco B.....	42
Tabela 9. Conteúdo de cinzas (%) e deposição de zinco, cálcio, cobre e fósforo dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco C.....	43

Tabela 10. Conteúdo de cinzas (%) e deposição de zinco, cálcio, cobre e fósforo dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco D.....	45
Tabela 11. Conteúdo de cinzas (%) e deposição de zinco, cálcio, cobre e fósforo dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco E.....	48
Tabela 12. Peso corporal, peso, diâmetro e comprimento dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco A.....	49
Tabela 13. Peso corporal, peso, diâmetro e comprimento dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco B.....	51
Tabela 14. Peso corporal, peso, diâmetro e comprimento dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco C.....	52
Tabela 15. Peso corporal, peso, diâmetro e comprimento dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco D.....	53
Tabela 16. Equivalentes de massa de alumínio (EqAl) dos fêmures e côndilos dos animais submetidos aos diferentes tratamentos alimentares.....	65
Tabela 17. Equivalentes de massa de alumínio (EqAl) dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco A.....	67
Tabela 18. Equivalentes de massa de alumínio (EqAl) dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco B.....	68

Tabela 19. Equivalentes de massa de alumínio (EqAl) dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco C.....	68
Tabela 20. Equivalentes de massa de alumínio (EqAl) dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco D.....	69

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1.- Fêmur de rato do grupo Zero.....	56
Fotografia 2.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Basal.....	56
Fotografia 3.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Ca-50.....	57
Fotografia 4.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Ca-100.....	57
Fotografia 5.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Comp.....	58
Fotografia 6.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Cas.....	58

LISTA DE RADIOGRAFIAS

Radiografia 1.- Fêmur de rato do grupo Zero.....	59
Radiografia 2.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Basal.....	59
Radiografia 3.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Ca-50.....	60
Radiografia 4.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Ca-100.....	60
Radiografia 5.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Comp.....	61
Radiografia 6.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Cas.....	61

RESUMO

A avaliação do conteúdo mineral ósseo é geralmente feita por meio de técnicas densitométricas. Contudo, a aplicação destas técnicas em estudos experimentais é cara e pouco acessível. Este trabalho propõe o uso do processamento de imagens radiográficas na determinação comparativa da mineralização óssea de animais alimentados com dietas à base farelo de arroz industrial, subproduto rico em sais do ácido fítico, agente quelante capaz de impedir a deposição de cálcio no fêmur. A avaliação dos efeitos deste subproduto como fonte mineral sobre a mineralização óssea, contudo, ainda não encontra suficiente embasamento científico, e o emprego de técnicas de processamento de imagens aparece como uma possível forma de diagnóstico nutricional.

A deposição de cálcio, zinco, cobre e fósforo no fêmur de ratos em crescimento mostrou, em função da dieta, ser uma forma de avaliar a utilização destes minerais, já a medida de densidade óptica das radiografias apresentou forte correlação com os indicadores teor de cinzas do fêmur, massa seca e conteúdo de cálcio, fósforo e cobre, os quais responderam ao melhoramento da qualidade da dieta mediante suplementação do farelo de arroz com cálcio, zinco e cobre. Entretanto, a suplementação com zinco não apresentou correlação com os parâmetros acima.

ABSTRACT

Evaluation of bone mineral content is generally done by means of densitometric techniques. Implementation of such techniques in experimental studies, however, is often expensive or inaccessible. This work proposes the use of radiographic image processing for the comparative determination of bone mineralization in animals fed rice-bran diets, which are rich in phytic acid salts. Such salts are, in turn, powerful chelating agents capable of interfering with calcium deposition in the bone. Evaluation of the effects of feeding this industrial by-product as a source of mineral still requires scientific experimentation and the application of new techniques such as radiographic image could contribute to a better nutritional assessment.

Deposition of calcium, zinc, copper and phosphorus in the femur of the growing rats, as a function of the quality of the diet, proved to be a viable approach to assess the utilization of such elements. Measurement of the optical density of radiographic plates, however, showed strong, positive correlation with indicators such as total ash content, dry mass, calcium, phosphorus and copper contents, which in turn, responded well to quality improvement of the diet obtained by supplementing the bran diet with calcium, zinc and copper. Supplementation with zinc alone, however, did not correlate with the above parameters.

1. INTRODUÇÃO

O beneficiamento do arroz gera o farelo, subproduto cujo alto conteúdo de nutrientes tem estimulado a realização de estudos para avaliar seu potencial como alimento para seres humanos (BARBER, 1971; BARBER & BENEDITO DE BARBER, 1973; GUERRA & JAFFÉ, 1975; TORTOSA & BENEDITO DE BARBER, 1978; SAUNDERS, 1990; WARREN & FARRELL, 1990). Estudos realizados nesta instituição (TORIN, 1991) mostraram, contudo, que o farelo de arroz não evidencia um bom valor nutritivo *in vivo*, o que contraria as expectativas em torno de sua indicação como suplemento alimentar. O mesmo estudo indicou a hipótese de que esta limitação estaria associada ao seu conteúdo em ácido fítico e à ação desse agente quelante sobre a fração mineral. A verificação desta hipótese, entretanto deveria ser objeto de novos estudos.

Dos elementos que compõem a fração mineral do farelo de arroz, destacam-se o zinco, o cobre e o ferro, por sua elevada concentração quando comparados a outras fontes de minerais. Chama a atenção também, por seu baixo teor, o cálcio (ADAYR, 1972; JULIANO, 1980; SAUNDERS, 1990; WARREN & FARRELL, 1990).

Diferentes métodos têm sido usados para medir a biodisponibilidade de minerais, dentre os quais estão os que utilizam o ganho de peso (em especial para o zinco) a incorporação do elemento em tecidos, como o fêmur (MOMCILOVIC *et al.*, 1975; FRANZ *et al.*, 1980a; FRANZ *et al.*, 1980b; SHAH *et al.*, 1991). No caso da determinação da biodisponibilidade de zinco medido no fêmur, o critério utilizado justifica-se pela alta correlação observada entre as reservas deste mineral e a sua disponibilidade nutricional. Morris e Ellis (1980), encontraram em alguns experimentos que altos níveis de fitato

alimentar são capazes de diminuir o acúmulo de zinco no fêmur, sem afetar o crescimento do animal. Eles consideraram, portanto, a determinação de zinco no fêmur como um bom indicador.

Informações já existentes justificam a inclusão de cálcio e cobre, além do zinco, neste estudo. Para o cálcio, é clássico o estudo de sua deposição nos ossos, uma vez que este tecido concentra 99% da quantidade total deste mineral no organismo (SOWERS, 1990). Já foi descrita a interferência exercida pelo cálcio da dieta sobre a absorção de zinco, principalmente na presença do ácido fítico (ELLIS *et al.*, 1987; XU, 1992). O cobre é também um dos minerais pelos quais o fitato apresenta grande afinidade (REDDY *et al.*, 1989) e mereceria, portanto ser considerado; outras interações de minerais assumem importância nutricional, como entre o zinco, o cobre e o ferro, (SHERMAN & TISSUE, 1981; OESTREICHER & COUSINS, 1985; STOREY & GREGER, 1987).

Assim, o teor em minerais de um alimento, obtido por análise espectrométrica, é apenas um indicativo bruto do valor nutritivo máximo desta fração, sendo necessário conhecer a forma química e físico-química do elemento a fim de apreciar a sua real utilização, o que se tem buscado com metodologias que empregam o modelo animal e a concentração de minerais em seus tecidos.

Sabe-se hoje que o sistema ósseo desempenha múltiplas funções relacionadas com o estado nutricional do animal (AMAYA-FARFÁN, 1994). Os ossos são classificados em dois tipos, cortical e trabecular, o primeiro é composto de camadas de colágeno mineralizado, densamente compactadas fornecendo rigidez ao osso e é o principal componente do osso tubular, o segundo é esponjoso em aparência, dando resistência e elasticidade, constitui a principal porção do esqueleto axial (ARNAUD & SANCHEZ, 1990). As células do tecido ósseo são divididas em : osteócitos (células maduras, que se situam em cavidades no interior da matriz), osteoblastos (produtores da parte

orgânica da matriz) e osteoclastos (relacionadas com a reabsorção do tecido ósseo). A parte orgânica representa aproximadamente 50 % do peso da matriz óssea. Sendo que os íons mais abundantes são o fosfato e o cálcio, encontrando-se também, zinco, cobre, magnésio, potássio e sódio entre outros. O balanço homeostático entre a deposição osteoblástica e a reabsorção osteoclástica do osso é uma parte importante do metabolismo do cálcio no corpo (EVANS, 1976; ARNAUD & SANCHEZ, 1990; AMAYA-FARFÁN, 1994).

Os estudos das técnicas para avaliação do conteúdo mineral ósseo, além da dosagem química, têm apontado para o emprego de metodologias baseadas no processamento de imagens (STEVENSON, 1989; TOTHILL, 1989; OMI *et al.*, 1992). Entre estas metodologias, está a fotodensitometria radiográfica (“radiographic photodensitometry”, ou “radiographic absorptiometry”), que se baseia na medida da densidade óptica de filmes com exposições de ossos aos Raios-X (TOTHILL, 1989). Estes estudos podem ter grande aplicação social, dada a crescente preocupação com o consumo de dietas pobres em cálcio, e sua possível relação com a elevada incidência de doenças ósseas, como a osteoporose, que acomete 1/3 da população feminina nos EUA (WHO, 1990). A osteoporose é uma condição caracterizada pela diminuição significativa da massa mineral óssea, com a conseqüente fragilização do osso (BRONNER, 1994).

Por outro lado, a mudança de hábitos alimentares constatada em populações urbanas nos últimos 50 anos, tem motivado o aumento do consumo de fontes ricas em fibra (KAHLON *et al.*, 1990; KAHLON *et al.*, 1992; KAHLON *et al.*, 1994), dentre as quais estão o farelo de arroz. A avaliação dos efeitos provocados pela ingestão deste subproduto como fonte mineral sobre a mineralização óssea, contudo, ainda requer maior experimentação. É particularmente no estudo da ingestão de alimentos e seu

impacto na composição do sistema ósseo que as técnicas de processamento de imagens radiográficas aparecem como possível forma de diagnóstico nutricional.

2. REVISÃO DA LITERATURA.

2.1. Fração mineral do farelo de arroz.

O farelo de arroz é um sub-produto industrial com uma concentração mineral relativamente elevada, como demonstrado por vários autores que relatam valores variando segundo o grau de polimento do arroz integral, no processamento, nas seguintes faixas: para o cálcio, 140-1310 mg/kg; ferro, 130-530 mg/kg; magnésio 8650-12300 mg/kg; manganês 110-877 mg/kg; fósforo 14800-28680 mg/kg; potássio 13650-23960 mg/kg; sódio 0-29 mg/kg; zinco 80 mg/kg, cobre 0,37 mg/kg (McCALL *et al.*, 1953; FERRETI & LEVANDER, 1974; JULIANO, 1980; TORIN, 1991). Destacam-se dentre estes valores o cálcio por ser o único elemento considerado como deficiente entre todos os minerais, e o conteúdo em zinco e cobre por estarem bastante elevados. Sob o ponto de vista do presente trabalho, estes três elementos são de importância vital por estarem relacionados direta e indiretamente com a estrutura óssea. Outro elemento em destaque é o fósforo que se apresenta como o maior constituinte mineral do farelo de arroz. Não obstante, McCall *et al.* (1953), encontraram que 90 % deste fósforo faz parte do ácido fítico, forma na qual não se considera biologicamente disponível (CLARKE *et al.*, 1977).

O ácido fítico ou mioinositol hexafosfato ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) (REDDY *et al.*, 1989) é um fator antinutricional de grande importância em sementes, devido à sua interferência na biodisponibilidade de alguns minerais. O mecanismo desta interferência pode ser explicado pela própria estrutura do ácido fítico apresentada na Figura 1, onde é mostrado como uma estrutura de cargas fortemente negativas, o que lhe confere um grande potencial para complexar ou ligar moléculas carregadas positivamente, como cátions inorgânicos e proteínas. É na presença e no posicionamento dos múltiplos grupos fosfato do ácido fítico que reside o poder de complexar um cátion com um grupo fosfato, ou entre dois grupos fosfato de

uma molécula ou entre grupos fosfato de diferentes moléculas de ácido fítico (CHERYAN, 1980).

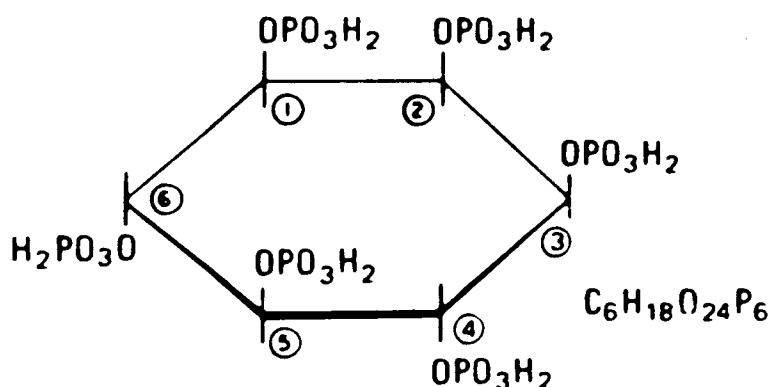


Figura 1. Estrutura química do ácido fítico ou mioinositol hexafosfato ($\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$).

Adaptado de Cheryan, 1980.

Vários autores têm relatado o efeito inibidor do fitato sobre a absorção de zinco, cálcio, magnésio, fósforo, ferro e níquel pela mencionada formação de complexos, que apresentam insolubilidades ou estabilidades relativas que podem ser classificadas segundo a ordem de magnitude das constantes de dissociação (VOHRA *et al.*, 1965; RANHOTRA, 1974; CHERYAN, 1980; YOSHIDA, 1983; CHAMPAGNE *et al.*, 1985; FRØLICH & ASP, 1985; HEANEY *et al.*, 1991; FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 1992; HAN *et al.*, 1994). Outros pesquisadores apontam o zinco e o cobre como os íons que formam complexos de maior estabilidade (MADDAIAH *et al.*, 1964; VOHRA *et al.*, 1965; OBERLEAS & HARLAND, 1981).

O'Dell e Savage, em 1960 (*apud* DAVIES & NIGHTINGALE, 1975), foram os primeiros a sugerir que a presença de fitatos nos produtos vegetais poderia reduzir a biodisponibilidade do zinco. Apesar de alguns autores

apontarem a pouca interferência do fitato sobre a absorção do cálcio (HARLAND *et al.*, 1987), existem estudos que discutem a possível interação do cálcio na formação dos complexos com o zinco, diminuindo ainda mais a absorção deste último (DAVIES & NIGHTINGALE, 1975; MORRIS & ELLIS, 1980; ERDMAN & PONEROS-SCHZNEIER, 1989). Por outro lado existem trabalhos que mostram a possível aplicação dessa capacidade do fitato do farelo de arroz de agir como agente quelante para reduzir a excreção renal de cálcio em pacientes com hipercalcúria (OHKAWA *et al.*, 1984; EBISUNO *et al.*, 1991; JAHNEN *et al.*, 1992; SLAVIN & LAMPE, 1992).

Finalmente, há algumas controversias em relação à interferência das fibras alimentares na utilização dos minerais. Alguns autores sugerem que as fibras podem diminuir os níveis séricos de cálcio e ferro, assim como nitrogênio e minerais em geral, quando ingeridas em elevadas quantidades (KELSAY, 1978). Drews *et al.* (1979), trabalhando sobre as possíveis alterações que diferentes tipos de fibra poderiam produzir na utilização de minerais, encontraram que a suplementação da dieta de adolescentes com hemicelulose incrementava significativamente a excreção fecal de cobre, zinco e magnésio, fenômeno que não foi observado na suplementação com pectina. Stasse *et al.* (1979), obtiveram resultados semelhantes para sódio, potássio, cálcio e magnésio. Já Franz *et al.* (1980b), e Morris & Ellis (1980), em experimentos com ratos, não encontram relação entre o consumo de fibra e a diminuição da biodisponibilidade de zinco.

2.2. Tecido ósseo.

O esqueleto tem entre suas funções principais o suporte, movimento, formação de células sangüíneas na medula óssea, proteção de alguns órgãos como cérebro, coração e pulmões, e o armazenamento de minerais.

A unidade básica da estrutura do tecido ósseo é o ósteon, que está constituído de minerais e outras substâncias inorgânicas dispostas em

camadas concêntricas ou lamelas, no centro de cada ósteon há um canal chamado canal central ou Harvesiano, através do qual passam vasos linfáticos, sangue e nervos. As células maduras ou osteócitos estão localizadas em pequenas cavidades entre as lamelas do ósteon chamadas de lacunas. Diminutos canais (canalículos) encontram-se distribuídos ao longo do osso, conectando lacunas adjacentes entre si e com o canal central. Estes canalículos são formados por extensões citoplasmáticas das células maduras, chamadas de osteoblastos (EVANS, 1976), (Figura 2).

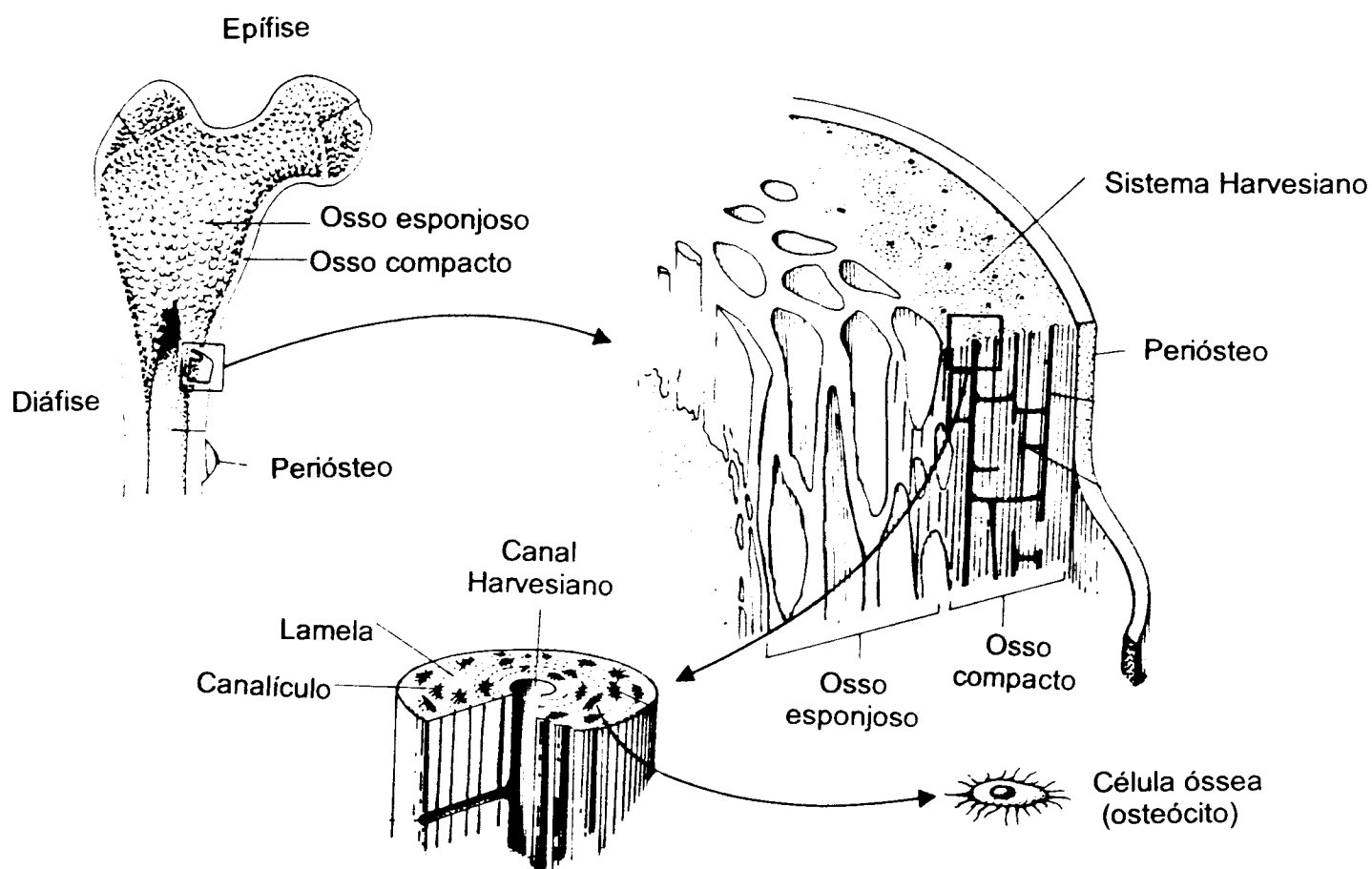


Figura 2. Representação da estrutura do tecido ósseo (EVANS, 1976).

A secreção de colágeno e substância fundamental pelos osteoblastos dá início à produção óssea. O colágeno polimeriza formando fibras colágenas, e o tecido resultante torna-se osteóide, estrutura similar à cartilagem, com a diferença de que os sais de cálcio precipitam nela. À medida que o osteóide é formado alguns osteoblastos ficam envolvidos no seu interior e são chamados de osteócitos. O osso está sendo continuamente depositado pelos osteoblastos e absorvido por células multinucleadas localizadas nas cavidades do osso, as quais são chamadas de osteoclastos. O balanço homeostático entre a deposição osteoblástica e a reabsorção osteoclástica do osso é parte importante do metabolismo de cálcio no corpo (EVANS, 1976; GUYTON, 1978). Os processos de formação e destruição do osso são normalmente regulados por um mecanismo acoplado entre o acréscimo e a reabsorção. Se este balanço é interrompido, ocorrerá uma perda contínua do mineral ósseo (TOTHILL, 1989).

Na estrutura do osso encontram-se basicamente dois tipos de tecidos, o osso trabecular, encontrado principalmente no esqueleto axial, constituído por tecido esponjoso, e o osso cortical, que é bastante compacto e se encontra principalmente no esqueleto apendicular. Este tipo de tecido está composto por camadas de colágeno mineralizado e cimentadas entre si (MUNIR, 1989; AMAYA-FARFAN, 1994).

Ossos longos como o fêmur podem ser considerados como ossos "típicos", tendo a sua estrutura formada por uma armação de material rígido (matriz óssea), coberta por uma membrana de células e fibras (periósteo); há tecido cartilaginoso recobrendo juntas ou em regiões de crescimento, nervos e vasos sanguíneos permeando toda a estrutura. Um osso como o fêmur está formado por extremos alargados ou epífises, principalmente de tecido esponjoso e uma porção comprida, ou diáfise, formada por osso compacto. A membrana interna do osso é chamada de endóstio e a externa de perióstio, que contém as células formadoras de osso ou osteoblastos (Figura 2).

O tecido ósseo é composto de minerais (aproximadamente 60-65 % do peso do osso), proteína, água e lípidos. O colágeno é a proteína principal da matriz óssea, sobre a qual a hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ é depositada (ÅKESSON *et al.*, 1994), também existem outras proteínas não colagenosas, que são principalmente sintetizadas por células do tecido conectivo, a análise química dos minerais das matrizes calcificadas indicam que outros íons além do cálcio e fósforo, estão presentes nestes tecidos. Alguns deles (magnésio, ferro, sódio e cloreto) são absorvidos na superfície dos cristais de hidroxiapatita e firmemente sequestrados, enquanto outros (zinco, estrôncio, flúor e carbonato) são incorporados como parte da fase mineral e facilmente liberados pelo osso (GUO *et al.*, 1988; BOSKEY, 1988 apud PETERSON *et al.*, 1992).

Existem duas doenças nutricionais de importância, relacionadas com o esqueleto, a osteoporose e osteomalácia. Osteoporose é definida como uma diminuição na massa óssea, com perda de minerais e proteínas, como consequência de um desequilíbrio entre a formação e reabsorção do osso, principalmente da porção trabecular. A osteomalácia é caracterizada por uma inadequada mineralização ou excessiva reabsorção do osso (SOWERS, 1990; AMAYA-FARFÁN, 1994). Funcionalmente, um osso osteoporótico apresenta uma grande fragilidade e é mais propenso a fraturas espontâneas ou por traumas mínimos (SANDERS & ALBRIGHT, 1987; BRONNER, 1994).

A osteoporose tem se convertido em problema de saúde pública nos Estados Unidos, afetando 25 milhões de americanos (STRAUSE *et al.*, 1994), com uma série de implicações de ordem econômica, médica e o que é mais importante, uma diminuição na qualidade de vida dos pacientes com esta doença (SAHA, 1990). Prevenção é provavelmente a melhor forma de combate às seqüelas produzidas pela doença. Existem algumas evidências do efeito positivo da ingestão de cálcio sobre a formação máxima da massa óssea, tanto em humanos quanto em animais (MATROVIC *et al.*, 1979; MATROVIC *et al.*,

1990; HEANEY, 1991; ABRAMS & STUFF, 1994). Sowers *et al.*, (1985) encontraram que um consumo maior de cálcio estava associado com uma massa óssea máxima em mulheres entre 20 e 35 anos; Sandler *et al.* (1985), trabalhando com mulheres pós-menopáusicas, determinaram a massa óssea encontrando valores maiores naquelas que consumiram leite durante a infância e adolescência comparados com os das que somente consumiram leite durante a infância. Linhares *et al.* (1986), em trabalho realizado com crianças brasileiras de diferentes classes socioeconômicas, concluíram que as crianças com deficiências nutricionais pertencentes às camadas menos privilegiadas da população apresentaram alto risco de sofrer problemas relacionados com a formação do esqueleto e maturação sexual.

2.3. Fatores nutricionais relacionados com o tecido ósseo.

A má nutrição mineral, vitamínica ou protéica, prejudica significativamente o crescimento, desenvolvimento do esqueleto e maturação óssea. Alguns dos principais fatores que afetam a mineralização dos ossos são a deficiência de vitamina D, cálcio, fósforo, zinco e cobre (ROOT, 1990), os quais serão comentados a seguir:

2.3.1. Vitamina D

A vitamina D exerce função na absorção de cálcio pelo trato intestinal e nos mecanismos de deposição e reabsorção na matriz óssea. A forma ativa da vitamina D é o 1,25-diidroxicolecalciferol que participa do controle da concentração de cálcio no plasma como pode ser visto na Figura 3. Inicialmente o colecalciferol é convertido no fígado em 25-hidroxicolecalciferol, o qual é convertido nos rins para a forma ativa da vitamina D₃, o 1,25-diidroxicolecalciferol. Para esta reação é necessária a presença do paratormônio (PTH). O 1.25-diidroxicolecalciferol estimula a produção de uma proteína fixadora de cálcio no citoplasma das células epiteliais do intestino.

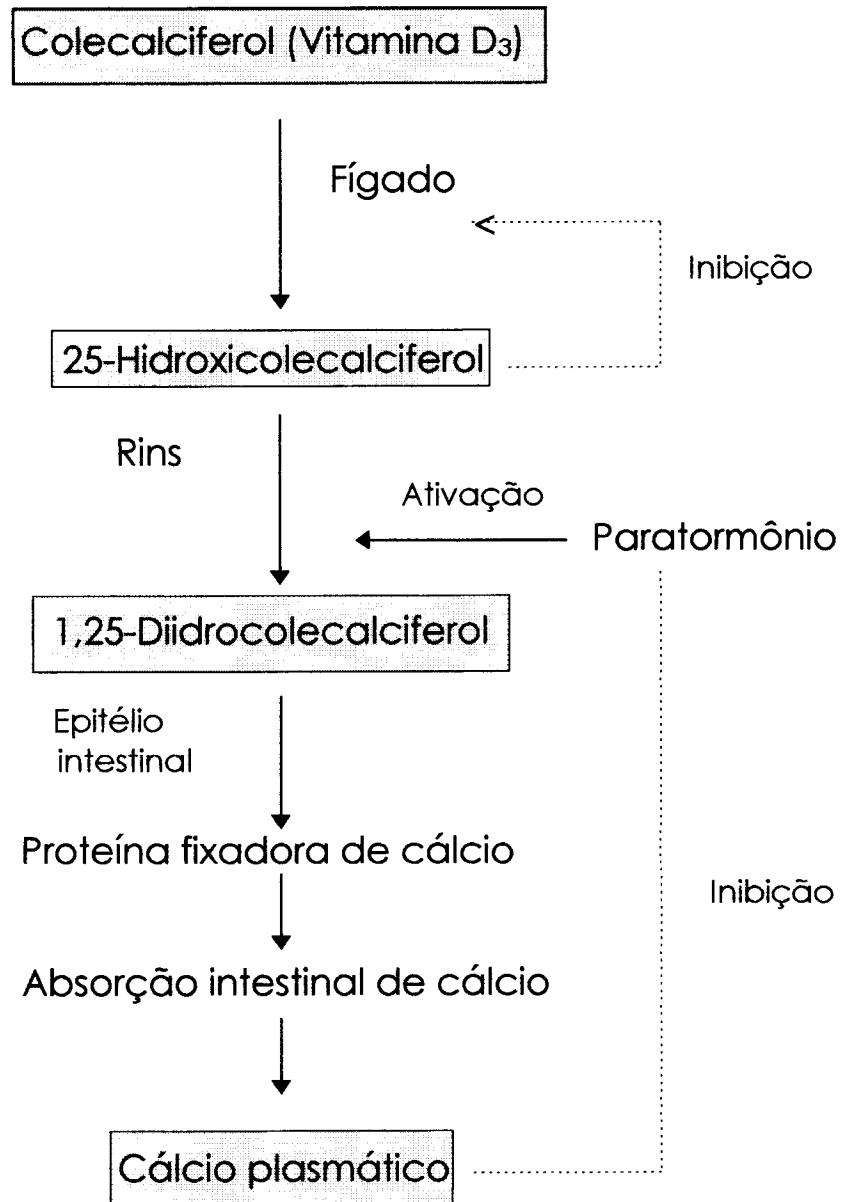


Figura 3. Ativação da vitamina D₃ e sua função no controle da concentração plasmática de cálcio.

Adaptado de Guyton, 1978.

Na Figura 3 também pode ser observada a existência de um mecanismo de retroalimentação negativa onde o aumento da concentração de cálcio no plasma, produz uma inibição da secreção de paratormônio, controlando dessa forma tanto a concentração plasmática de 1,25- diidroxicolecalciferol quanto a de cálcio (GUYTON, 1978), sendo que este aumento na concentração de cálcio estimula o processo de mineralização óssea (ROOT, 1990). O distúrbio esquelético mais característico da deficiência de vitamina D é a osteomalácia, que pode produzir deformidades no osso do adulto e raquitismo durante a infância. Em adultos a osteomalácia é menos grave, sendo que defeitos na mineralização devem estar presentes por muitos anos para produzir manifestações clínicas (TENENHOUSE, 1990). A diminuição no cálcio ou fosfato do líquido extracelular, causada pela deficiência de vitamina D, aumenta a secreção do paratormônio para proteger o corpo da hipocalcemia, estimulando assim a reabsorção óssea para restaurar o nível sérico de cálcio, (GUYTON, 1978; TENENHOUSE, 1990; WEAVER, 1990).

2.3.2. Cálcio e fósforo

O cálcio é o mineral mais abundante do corpo humano. Noventa e nove por cento do cálcio no corpo encontra-se nos ossos, sendo um dos principais constituintes da fase mineral (CHAN, 1991). Os sais que são depositados na matriz orgânica do osso são compostos principalmente de cálcio e fosfato.

O controle da concentração sanguínea de cálcio ($2,2-2,4 \mu\text{mol/dl}$) é feito por um sistema homeostático complexo que regula a absorção intestinal, a reabsorção óssea e a excreção urinária. O paratormônio (PTH), a calcitonina do intestino, 1,25-diidroxicolecalciferol, assim como os níveis de fosfato e magnésio, fazem parte desse sistema. Aumento no nível de fosfato estimula a secreção do PTH, devido a queda na concentração relativa de cálcio, reduzindo assim a reabsorção renal de fosfato; isto é, aumentando a sua excreção urinária. Esta redução de fósforo no soro se traduz em aumento da

concentração relativa de cálcio o que por sua vez resulta em inibição da produção do PTH e retorno à reabsorção normal de fosfato. Por outro lado esse aumento nos níveis de cálcio também promove a secreção do hormônio calcitonina que inibe a liberação de cálcio pelos ossos (GUYTON, 1978; ALLEN 1982; SGARBIERI, 1987).

Contrariamente ao que ocorre com o cálcio, o papel do fósforo da dieta em limitar a formação do pico de massa óssea, está relacionado com o excesso deste elemento na dieta. Consumo de grandes quantidades de fósforo quando a ingestão de cálcio é adequada ou baixa, poderá ocasionar um hiperparatiroidismo secundário e perda progressiva de massa óssea (KRISHNARAO & DRAPER, 1972; CALVO, 1993). Os requerimentos nutricionais destes elementos são geralmente expressos em termos absolutos e guardando uma relação de cálcio para fósforo, que em ratos é de 2:1 (DRAPER *et al.*, 1972). Tylavsky & Anderson (1988), em experimento com mulheres lacto-ovovegetarianas em idade pós-menopáusia, encontraram que a ingestão de fósforo causou efeitos negativos sobre o conteúdo mineral e densidade óssea. Existe controversia em relação ao efeito do fósforo na osteoporose. Consumo elevado deste elemento tem sido relacionado com a indução de hiperparatiroidismo e perda de massa óssea em camundongos, coelhos, cavalos e porcos, entre outros (SCHRYVER *et al.*, 1971; ANDERSON & DRAPER, 1972; DRAPER *et al.*, 1972; BELL *et al.*, 1980). No entanto, estudos *in vitro* sobre metabolismo celular, encontram que altas concentrações de fósforo inibem a reabsorção óssea e aumentam a mineralização e síntese de colágeno (RAISZ & LORENZO, 1980 apud CALVO, 1993). Yates *et al.* (1991), demonstraram que a inibição da reabsorção óssea por fosfato orgânico, em níveis fisiológicos, é mediada por redução na formação de osteoclastos e diminuição da atividade dos osteoclastos maduros.

O paratormônio é o regulador mais importante do 1,25-diidroxicolecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$); Portale *et al.* demonstraram em diversos

estudos (1986, 1987 e 1989) que o fósforo da dieta pode regular a produção e concentração sérica do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em homens normais.

Populações com elevados requerimentos de cálcio , como crianças e adolescentes podem ter comprometimento na sua formação óssea por causa de desequilíbrios entre os nutrientes, como é o elevado consumo de fósforo juntamente com baixa ingestão de cálcio (MASSEY, 1993).

2.3.3. zinco e cobre.

O zinco é um nutriente essencial para o crescimento, desenvolvimento e replicação celular Este elemento faz parte de mais de 70 metaloenzimas envolvidas nas principais rotas metabólicas, tais como a desidrogenase alcoólica, superóxido-dismutase, RNA e DNA polimerases, anidrase carbônica, fosfatase alcalina, frutose 1,6-bifosfatase, aminopeptidase, carboxipeptidase e collagenase (DANFORD, 1989). Em função da importância do zinco nos diferentes processos metabólicos, a sua deficiência será manifestada principalmente nos tecidos em processo de divisão celular e de crescimento.

Estudando a distribuição do zinco no osso por intermédio de técnicas histoquímicas e microradiográficas, Haumont (1961, apud CALHOUN *et al.*, 1974) encontrou que o zinco se encontra localizado nas proximidades dos locais de calcificação, o que sugere a importância do zinco na osteogênese. Durante o processo de mineralização do osso, o zinco é progressivamente incorporado e permanece no tecido totalmente calcificado, do qual é removido somente por reabsorção óssea (HAMBIDGE *et al.*, 1986). A mobilização do zinco do osso em estados de deficiência deste elemento tem sido motivo de controvérsias entre diversos autores; alguns sugerem que o zinco é liberado do osso lentamente e redistribuído a outros tecidos para suportar o crescimento em períodos de deficiência de zinco na dieta, indicando que o esqueleto serve como uma reserva de zinco (BROWN *et al.*, 1978; COLHOUN

et al., 1978; GIUGLIANO & MILLWARD, 1984). No entanto, outros estudos em ratos com deficiência de zinco encontraram que a mobilização de zinco do esqueleto é baixa, a não ser que exista uma deficiência simultânea de cálcio (HURLEY & SWENERTON, 1971; TAO & HURLEY, 1975; MASTERS *et al.*, 1986). Diminuição do conteúdo de zinco em ossos de ratos com deficiência profunda de zinco, com e sem deficiência de cálcio, foi explicada por Murray & Messer (1981) como sendo consequência de uma queda na deposição de zinco e não como um aumento na reabsorção, sendo que a disponibilidade de zinco para o esqueleto é dependente da taxa de reabsorção e não do "status" em zinco; entendendo-se assim o esqueleto como um sequestrador de zinco e não como um reservatório. Esses autores encontraram que a relação Zn/Ca depositada no osso de ratos, com e sem deficiência de zinco, aumentava com a deficiência de cálcio, sugerindo que existe substituição parcial do zinco pelo cálcio na fase mineral durante períodos de depleção de cálcio. Por outro lado, a deficiência de zinco na dieta produziu poucas mudanças no conteúdo em cálcio do osso.

Em adição, e como foi mencionado anteriormente o zinco está envolvido na atividade da anidrase carbônica e collagenase, enzimas zinco-dependentes, que têm um papel importante nos processos de reabsorção e remodelação óssea (WALLWORK & SANDSTEAD, 1990). Tem sido demonstrado que deficiência de zinco em ratos diminui a síntese de colágeno.

A essencialidade do zinco em sistemas biológicos foi demonstrada pela primeira vez em *Aspergillus niger* em 1869. Posteriormente, em 1926 a mesma foi estabelecida para plantas superiores e, em 1934, para ratos em crescimento (PRASAD, 1989). Em humanos foi detectada deficiência de zinco pela primeira vez por Prasad *et al.* (1961, 1963a;1963b), em populações do Irã e Egito com retardo no crescimento, desenvolvimento sexual e problemas na pele. Os pacientes estudados consumiam somente pão de trigo sem qualquer ingestão de proteína animal e praticavam a geofagia.

Reinhold *et al.* (1973), demonstraram que em dietas contendo adequada concentração de zinco, determinada por análise química, a presença de fitato, inibia a absorção de zinco, fato que foi corroborado para farelo de arroz (TORIN *et al.*, 1993). A concentração de cálcio na dieta também tem sido apontada por diversos autores, como responsável por alterar o requerimento deste mineral em animais (FORBES, 1960, 1964; MORRIS & ELLIS, 1980; ELLIS *et al.*, 1987; XU, 1992). O ácido fítico é considerado como sendo o fator mais importante na limitação da biodisponibilidade de zinco. Ele está presente em muitos produtos de origem vegetal, principalmente em grãos integrais e leguminosas (SANDSTEAD, 1991). Os primeiros trabalhos que descreveram os efeitos inibitórios do fitato e cálcio foram realizados por O'dell & Savage em 1960 (*apud* DAVIES & NIGHTINGALE, 1975), e Oberleas *et al.* (1966), usando frangos e ratos. Solomons *et al.* (1979) apontaram que o ácido fítico e outras substâncias ligantes de zinco presentes nos alimentos consumidos principalmente por populações mais pobres, podem produzir efeitos significativos sobre a retenção deste micronutriente.

O cobre é um elemento essencial para a função de várias enzimas, como a citocromo C oxidase, superóxido dismutase, tirosinase, β -hidroxilase da dopamina, lisil oxidase e ceruloplasmina (DANKS, 1988 *apud* NOGARA, 1994).

Nos animais superiores, a principal proteína estrutural do tecido conectivo e ósseo é o colágeno, sendo que a matriz orgânica do osso contém 95 % de fibras de colágeno. A síntese desta proteína requer a enzima lisil oxidase, a qual precisa de cobre como cofator (SIEGEL *et al.*, 1970; CARNES, 1971; MILLS, 1992). Problemas no processo de osteogênese e deformidades ósseas foram encontrados em animais com deficiência de cobre (BAXTER, 1951; WILSON *et al.*, 1981). Tanaka *et al.* (1980), observaram em imagens radiográficas de ossos de crianças com deficiência nutricional de cobre uma osteoporose geral, que pode ser recuperada com suplementação de cobre.

Vários fatores são conhecidos por afetar a disponibilidade do cobre, como é o caso da frutose, que aumenta o requerimento do mineral (FIELDS *et al.*, 1986; KOH *et al.*, 1989), altos níveis de zinco na dieta, que afetam a absorção e transporte do Cu (FESTA *et al.*, 1985; KOH *et al.*, 1989), e a presença de ácido fítico (VANCAMPEN & SCAIFE, 1967; DAVIES & NIGHTINGALE, 1975; GREGER *et al.*, 1978; FISHER *et al.*, 1981).

2.4. Métodos de avaliação mineral óssea.

A tentativa de estabelecer técnicas adequadas para medir ou avaliar a biodisponibilidade de minerais tem levado à busca de indicadores de fácil aplicação, precisão, segurança e baixo custo. Entre os métodos conhecidos para a avaliação do conteúdo mineral ósseo, com especial referência ao cálcio, podem ser mencionados:

Radiogrametria, fotodensitometria radiográfica, absorção simples e dupla de energia de raios X (SXA, "single energy x-ray absorptiometry" e DEXA ou DXA, "dual-energy x-ray absorptiometry"), absorção de fótons mono e bienergéticos (SPA, "single-photon absorptiometry" e DPA, "dual-photon absorptiometry"), tomografia computadorizada, análise por ativação de nêutrons e histomorfometria (MUNIR, 1989; TOTHILL, 1989; WEAVER, 1990; PRENTICE *et al.*, 1994; PETERSON *et al.*, 1992).

A radiogrametria foi introduzida por Barnett & Nordin (1960) e Virtama & Mähönen (1960). O método baseia-se em medidas morfométricas do osso cortical, é aplicável somente aos ossos do esqueleto apendicular. Apesar de ser simples, não reflete com segurança o conteúdo mineral absoluto e não mede a porosidade intercortical do osso (TOTHILL, 1989; MUNIR, 1989).

A fotodensitometria radiográfica é um dos métodos mais antigos para medição do mineral ósseo, depende fundamentalmente da medida de

densidade óptica de filmes de raios X de ossos. O grau de branqueamento da imagem no filme é medido por um fotodensitômetro, dando uma medida indireta do conteúdo mineral ósseo (MUNIR, 1989). Esta técnica requer o uso de uma referência que idealmente deveria ter o mesmo número atômico e gravidade específica do mineral ósseo. Soluções de sais de cálcio ou potássio, metais pesados e outros têm sido utilizados para tal fim, mas o alumínio é considerado como o mais reprodutível, e com acessibilidade para seu uso. A densidade óptica da imagem da referência é comparada com a da leitura feita no osso de interesse e, mediante interpolação, pode ser determinado o conteúdo mineral do osso que será expresso em equivalentes de alumínio no caso de ser esta a composição da referência.

As técnicas que usam medição por absorção como o SPA e SXA, são específicas para ossos do esqueleto apendicular. Com o SPA mede-se a intensidade de um feixe de radiação de fótons monoenergéticos, transmitido através do osso com um contador de cintilação, o que permite a quantificação do mineral ósseo. Já o SXA é análogo ao SPA, com a diferença de que a fonte radioativa utilizada com este último é substituída por uma fonte de raios X. (OSTEOMETER, 1995). Os métodos que envolvem 2 raios de diferente energia como o DPA e DEXA são usados para medições em qualquer parte do corpo. Todos estes métodos que usam técnicas de medidas de absorção "absorptiometry" baseiam-se na atenuação da energia que ocorre quando há penetração de raios γ ou raios X através da região de interesse (TOTHILL, 1989), a atenuação cumulativa entre os limites do osso é convertida em massa do mineral ósseo pelo uso de materiais de calibração ou de referência. Prentice *et al.* (1994), esclarecem que estes resultados são também expressos como densidade mineral óssea (BMD, "bone mineral density"), sendo que esta é uma medida irreal de densidade já que vem dada em g/cm^2 , ou seja o resultado de dividir o conteúdo mineral ósseo (g/cm) pela largura do osso em

estudo. No caso dos métodos de energia simples e nos casos de energia dupla, o valor se origina dividindo o conteúdo mineral ósseo (g) pela área do osso (cm^2). Os mesmos autores sugerem que apesar da expressão densidade mineral óssea não ser ajustada aos valores reais obtidos com estas diferentes técnicas, esta seria a melhor forma de padronização para diferenças entre tamanhos de ossos, facilitando assim a comparação entre indivíduos com uma população referência.

Na tomografia computadorizada, é obtida a imagem de uma fina fatia transversal do corpo a qual pode ser quantificada gerando uma distribuição dos coeficientes de atenuação e portanto algumas medidas da densidade mineral óssea (TOTHILL, 1989). A tomografia computadorizada não é muito utilizada devido, principalmente, à alta exposição à radiação, alto custo e pouca precisão (WEAVER, 1990; OSTEOMETER, 1995).

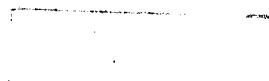
A análise por ativação de nêutrons considera o fato de que 99 % do cálcio corporal está no esqueleto, assim quando o corpo é irradiado com nêutrons, muitos dos seus elementos constituintes tornam-se radioativos e podem ser identificados e quantificados examinando as características da emissão dos raios gama (TOTHILL, 1989). Weaver (1990) considera que a aplicação desta técnica não é viável, exceto para propósitos de pesquisa, em função do custo elevado e exposição a altas doses de radiação direta.

A histomorfometria é um método que permite a análise da estrutura, padrão e avaliação da qualidade do osso. Esta técnica também possibilita a medição de índices como formação e reabsorção óssea (MENUIER, 1988). A histomorfometria tem como desvantagens o custo, tempo de execução e treinamento de pessoal especializado para a sua realização; portanto não é prática para estudos de rotina sobre biodisponibilidade mineral (PETERSON *et al.*, 1992).

3. OBJETIVOS.

O presente trabalho tem como objetivos principais estudar:

1. o efeito de dietas a base de farelo de arroz, na composição do fêmur de rato em crescimento, em termos de cinza total, cálcio, fósforo, zinco e cobre.
2. as conseqüências de suplementar a dieta basal com Ca, Zn, Cu e Fe, de forma simples e combinada, no que se refere à deposição de cálcio, fósforo, zinco e cobre.
3. a possível correlação entre a deposição de zinco, cálcio e cinzas totais e a densitometria óssea, expressa em equivalentes de massa de alumínio, medidos no fêmur de ratos alimentados com dietas formuladas a base de farelo de arroz.



4. MATERIAL E MÉTODOS.

4.1. Material

4.1.1. Ingredientes e dietas.

4.1.1.1. Ingredientes.

Foram preparados 17 tipos de dietas não purificadas utilizando os seguintes ingredientes:

Farelo de arroz estabilizado e desengordurado fornecido em forma de pellets, pela Indústria Riograndense de Óleos Vegetais Ltda. (IRGOVEL, Pelotas-RS). O farelo foi posteriormente moído em um moinho de facas (Máquinas Renard, MFC-180-71-01).

A caseína comercial utilizada continha 12,8 g N/100g. Todas as dietas foram elaboradas para conter 10% de proteína

Óleo: na preparação das dietas foi empregado óleo comercial de milho (Mazola, Refinações de Milho, Brasil), para atingir 8% de lípides.

Mistura vitamínica: foi utilizada mistura vitamínica recomendada pelo American Institute of Nutrition (1977, AIN-76).

Minerais: Os minerais utilizados para a preparação das dietas seguiram os valores de requerimentos segundo AIN-76.

4.1.1.2. Dietas.

Foram elaboradas utilizando um misturador SIAM-TWEEDY TW 70 N° 204 para garantir a sua homogeneidade. A formulação das dietas com farelo de arroz foi feita de forma que elas se apresentassem isocalóricas ($203,89 \pm 4,6$ kcal/100g) e isoprotéicas ($10,24 \pm 0,25$ g/100g). Os minerais Zn, Ca, Cu e

Fe ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CuCO_3 e citrato férrico) foram acrescentados a uma dieta Basal (Tabela 1) de farelo de arroz, óleo de milho e mistura vitamínica, às expensas dos carboidratos, para fornecer 2 níveis de Zn e Ca (50 e 100%), baseados nos requerimentos destes íons (AIN-76), assim como combinações com Cu e Fe, no nível de 100%. Paralelamente foi elaborada uma dieta de farelo com acréscimo de mistura mineral completa (Comp) e outra utilizando caseína como fonte protéica (Cas). Na Tabela 2 apresenta-se o protocolo dos diferentes tratamentos, para a formulação mineral das dietas.

Tabela 1. Composição da dieta Basal.

<i>Ingredientes</i>	<i>Quantidade</i>
	<i>(g)</i>
Farelo de arroz	879
Mistura vitamínica ¹	20
Óleo vegetal ²	47
Amido de milho ³	54

¹ AIN-76

² Óleo de milho Mazola, Refinações de Milho, Brasil.

³ Maizena, Refinações de Milho, Brasil.

Tabela 2 . Protocolo dos tratamentos com os quatro minerais.

<i>Dietas</i>	<i>Farelo</i>	<i>Caseína</i>	<i>Zinco</i>	<i>Cálcio</i>	<i>Cobre</i>	<i>Ferro</i>	<i>Mistura Comp.¹</i>
Basal	X	--	--	--	--	--	--
Comp	X	--	--	--	--	--	X
Cas	--	X	--	--	--	--	X
Zn-50	X	--	(50%)	--	--	--	--
Zn-100	X	--	(100%)	--	--	--	--
Ca-50	X	--	--	(50%)	--	--	--
Ca-100	X	--	--	(100%)	--	--	--
Zn-Ca	X	--	(100%)	(100%)	--	--	--
Zn-Cu	X	--	(100%)	--	(100%)	--	--
Zn-Fe	X	--	(100%)	--	--	(100%)	--
Ca-Cu	X	--	--	(100%)	(100%)	--	--
Ca-Fe	X	--	--	(100%)	--	(100%)	--
Zn-Ca-Cu	X	--	(100%)	(100%)	(100%)	--	--
Zn-Ca-Fe	X	--	(100%)	(100%)	--	(100%)	--
Zn-Ca-Cu-Fe	X	--	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	--
Zn-Cu-Fe	X	--	(100%)	--	(100%)	(100%)	--
Ca-Cu-Fe	X	--	--	(100%)	(100%)	(100%)	--

¹ AIN-76

4.1.2. Animais.

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem Wistar, com 21 dias de nascidos e peso médio de $59,56 \pm 9,16$ g; provenientes do CEMIB-UNICAMP.

4.2. Métodos.

4.2.1. Análises químicas.

O farelo de arroz e as dietas foram submetidos às seguintes determinações analíticas:

Umidade, proteína e cinzas (A.A.C.C., 1983).

Lípides (BLIGH & DYER, 1959).

Fibra alimentar solúvel e insolúvel (ASP *et al.*, 1983).

Inibidores de tripsina (KAKADE *et al.*, 1969)

Ácido fítico (HARLAND & OBERLEAS, 1977; LATTA & ESKIN, 1980).

Minerais (Zn, Ca, Cu, Fe e P): Foram determinados por espectrometria de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado (ICP-AES); BAIRD ICP 2000, após a destruição da matéria orgânica por incineração das amostras a 500°C e adição de ácido nítrico concentrado (Merck), que foi evaporado até *secura* em placa aquecedora (Corning, DC-351). As cinzas foram diluídas com ácido nítrico a 2,5% para a preparação das soluções utilizadas no espectrômetro.

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico.

4.2.2. Ensaios biológicos.

4.2.2.1. Tratamentos.

Para todos os tratamentos do ensaio, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 17 grupos de 6 ratos cada, e mantidos em gaiolas

individuais de aço inoxidável por períodos de 21 dias (com 2 dias de adaptação prévia) em ambiente com controle de temperatura e iluminação (ciclos de luz-escuridão alternados a cada 12 horas). Também foi montado um grupo de 6 animais recém desmamados (grupo Zero) que foram sacrificados no início do trabalho com a finalidade de obter os parâmetros iniciais sem nenhum tipo de tratamento.

O controle de peso e ingesta foi feito duas vezes por semana. As dietas e água deionizada estavam disponíveis em todos os horários. Todos os materiais que poderiam estar em contato direto com os animais ou dietas eram de aço inoxidável, vidro ou plástico para minimizar qualquer tipo de contaminação mineral e foram rotineiramente submetidos a descontaminação mediante sucessivas lavagens com ácido nítrico (10 %) e água deionizada. No final dos ensaios os animais foram sacrificados com éter etílico para a dissecação do fêmur esquerdo.

Com a finalidade de facilitar o estudo das várias interações emergentes do tratamento estatístico, os 17 grupos experimentais, foram segregados em cinco Blocos (A a E). Os grupos integrantes de cada Bloco foram selecionados de acordo com a expectativa de possíveis interações, da seguinte forma:

- O primeiro Bloco (A) foi formado por 5 dietas a saber: dieta Basal de farelo de arroz, as dietas Ca-50 e Ca-100 (dieta Basal + cálcio a 50 e 100% do requerimento), a dieta Comp (dieta Basal + mistura mineral completa) e uma dieta referência, Cas, igual à anterior mas substituindo o farelo de arroz por caseína como fonte protéica.
- O segundo Bloco (B) além das dietas Basal, Ca-50, Ca-100 e Comp, incluiu as dietas Zn-50, Zn-100 (Basal + zinco a 50 e 100% do requerimento), e Zn-Ca (Basal + zinco e cálcio a 100% do requerimento).
- O terceiro Bloco (C) compreendia, além das dietas Basal, Comp, Ca-100 e Zn-Ca, as dietas Ca-Cu (Basal + cálcio e cobre ambos a 100% do

requerimento) e Ca-Cu-Zn (Basal + cálcio, cobre e zinco, todos a 100% do requerimento).

- O quarto Bloco (D) era formado pelas dietas Basal, Zn-100, Comp, Zn-Ca, Ca-Cu-Zn descritas anteriormente mais a dieta Zn-Cu (Basal + zinco e cobre, ambos a 100% do requerimento).

- O quinto Bloco (E) estava composto pelas dietas Basal, Comp e Fe-Zn (Basal + ferro e zinco a 100% do requerimento), Fe-Ca (Basal + ferro e cálcio, ambos a 100% do requerimento); Fe-Zn-Ca (Fe-Zn + cálcio a 100% do requerimento); Fe-Zn-Cu igual à anterior, substituindo o cálcio pelo cobre; a dieta Fe-Ca-Cu (Fe-Ca + cobre a 100% do requerimento) e, finalmente a combinação dos 4 minerais na dieta Fe-Zn-Ca-Cu, todos a 100% do requerimento.

Foi ainda definido um Bloco especial (Bloco 1) composto de todos os grupos do Bloco A, mais o grupo Zero

4.2.2.2. Tecidos.

Foi feita a remoção cuidadosa dos músculos e tecidos conectivos dos fêmures coletados utilizando pequenos besouros chamados dermestídes (CASEZ *et al.*, 1994) , para a sua posterior secagem em estufa a 65 °C durante 24 horas. Seguidamente foi realizada a pesagem dos ossos, assim como as diferentes medições e exposições radiográficas. Os fêmures foram finalmente calcinados e as cinzas obtidas em mufla a 500 °C durante 24 h. Após a pesagem, as dimensões de diâmetro e comprimento foram obtidas. utilizando paquímetro (Somet) com sensibilidade de 0,0025 mm.

4.2.2.3. Exposições radiográficas.

A fim de padronizar as condições operacionais para a exposição do material ósseo à irradiação, foram feitos testes utilizando uma referência de densidade conhecida (Al, $\rho = 2,69 \text{ g/cm}^3$), variando a tensão e a corrente do

tubo de raios X, bem como empregando diferentes tipos de filmes radiográficos. Findo este período de padronização, foi escolhida como referência uma escala de alumínio com 4 níveis de 0,3; 0,6; 0,9 e 1,2 mm de espessura; construíram-se (CEB-UNICAMP) 4 escalas iguais, as quais foram posicionadas ao redor do campo contendo os ossos de cada grupo a ser radiografado (cada grupo composto por 6 ossos). Isto permitiu avaliar se houve variação no campo de exposição e minimizar as possíveis interferências introduzidas por fatores como a qualidade do filme, revelação e oscilações de voltagem. Com a finalidade de manter constante a região a ser radiografada entre as diferentes dietas utilizou-se uma máscara de alumínio que foi colocada ao redor do campo, sempre na mesma posição (Figura 4).

Para a realização das exposições radiográficas foi utilizado o equipamento para mamografia CGR modelo Senographe-500t, com os seguintes parâmetros de exposição: tensão= 25 kVp, corrente x tempo= 16 mAs, e foco fino. O filme selecionado foi o da Kodak (Diagnostic film, MRM-1, 18x24 cm), e para a revelação utilizou-se o processador de filmes Kodak (RP X-OMAT Processor).

4.2.2.4. Medida indireta do conteúdo mineral ósseo.

As imagens obtidas a partir das exposições radiográficas foram processadas, para se obter medidas da densidade óptica dos ossos e côndilos (grau de branqueamento das imagens). Mediante equipamento óptico, constituído por uma câmera monocromática com dispositivo de imagem CCD (diodo de carga acoplada, Hitachi KP-M1/KP-M1EK) e uma fonte de luz fluorescente homogênea com difusor acrílico, os sinais analógicos da câmera foram convertidos em digitais pelo hardware "Frame Graver" instalado em computador convencional gerenciado por um software de processamento de imagem (Global Lab., versão 2.10). O equipamento óptico assim como a

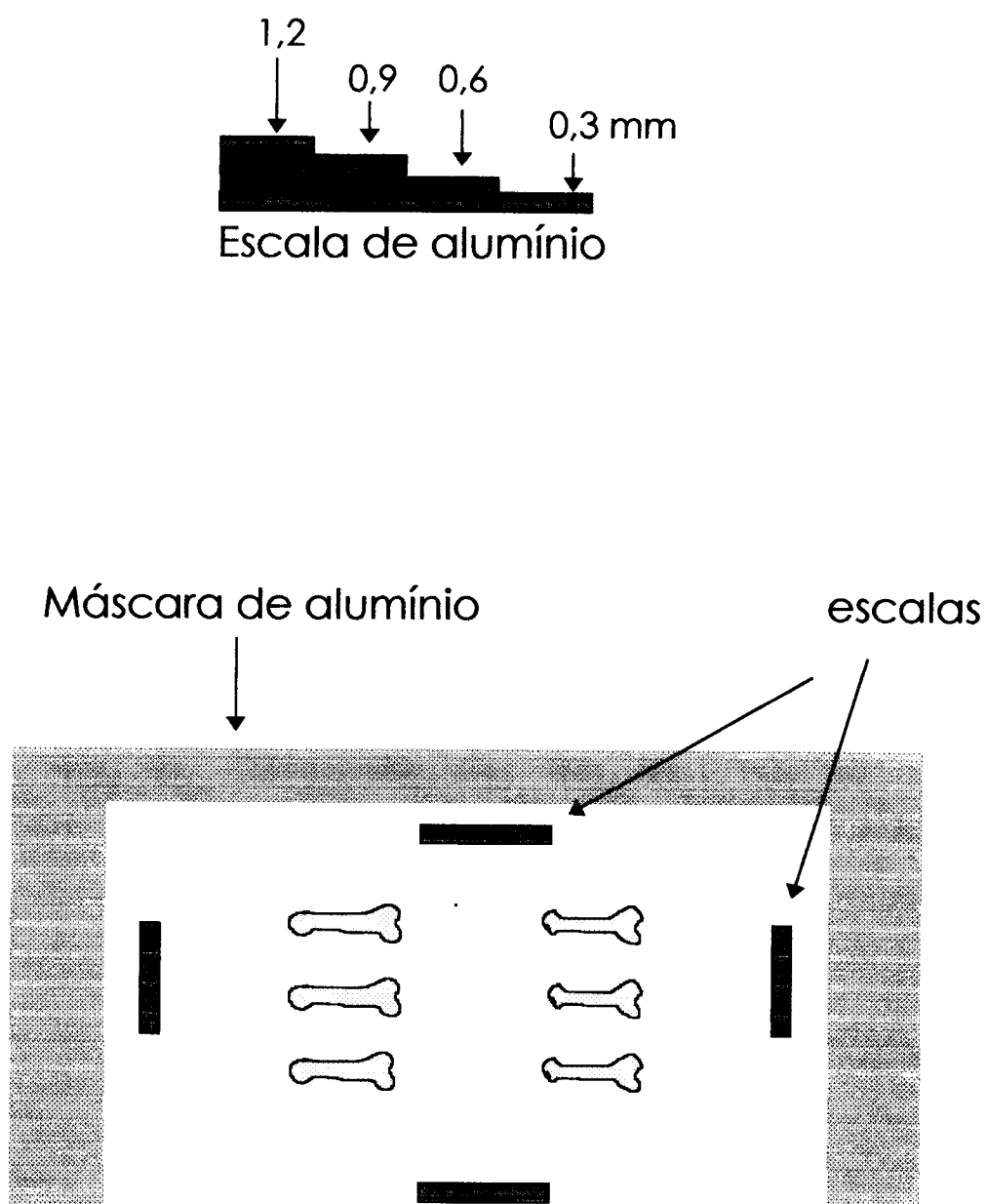


Figura 4. Elementos utilizados para a realização das exposições radiográficas e o seu posicionamento.

assessoria para a utilização do mesmo foram fornecidos pela SDC Engenharia, Sistemas, Eletrônica, Importações e Exportações Ltda., São Paulo. O esquema do equipamento óptico utilizado pode ser visualizado na Figura 5.

Utilizando uma escala de tons de cinza para as imagens radiográficas dos ossos e referências (escalas de alumínio), se fez a avaliação do conteúdo mineral ósseo, estimado em equivalentes de massa de alumínio (EqAl) (TOTHILL, 1989), uma vez que a mesma é proporcional à sensibilização do filme pelos raios X. Estes cálculos foram feitos da seguinte forma: calibração das escalas (níveis a, b, c e d), escolhendo-se uma área de leitura dos tons de cinza constante, sendo esta de 598 pixels ou 12, 558 mm². Considerando que 1 pixel (menor unidade de leitura óptica) é equivalente a 0,021 mm², e sabendo a altura dos níveis da escala, foi feito o cálculo do volume de cada um. Também obteve-se a massa utilizando o valor da densidade do alumínio (2,69 g/cm³). Com o valor médio dos tons de cinza das 4 escalas (y) e a massa de alumínio de cada nível (x) foi contruída uma reta referência para cada exposição radiográfica. Esta reta foi utilizada para determinar os valores em equivalentes de massa de alumínio do osso todo e do côndilo separadamente.

4.2.3. Análise estatística.

Os dados foram tratados por análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as medias foram avaliadas utilizando o teste de Tukey a um nível de significancia de 5%.

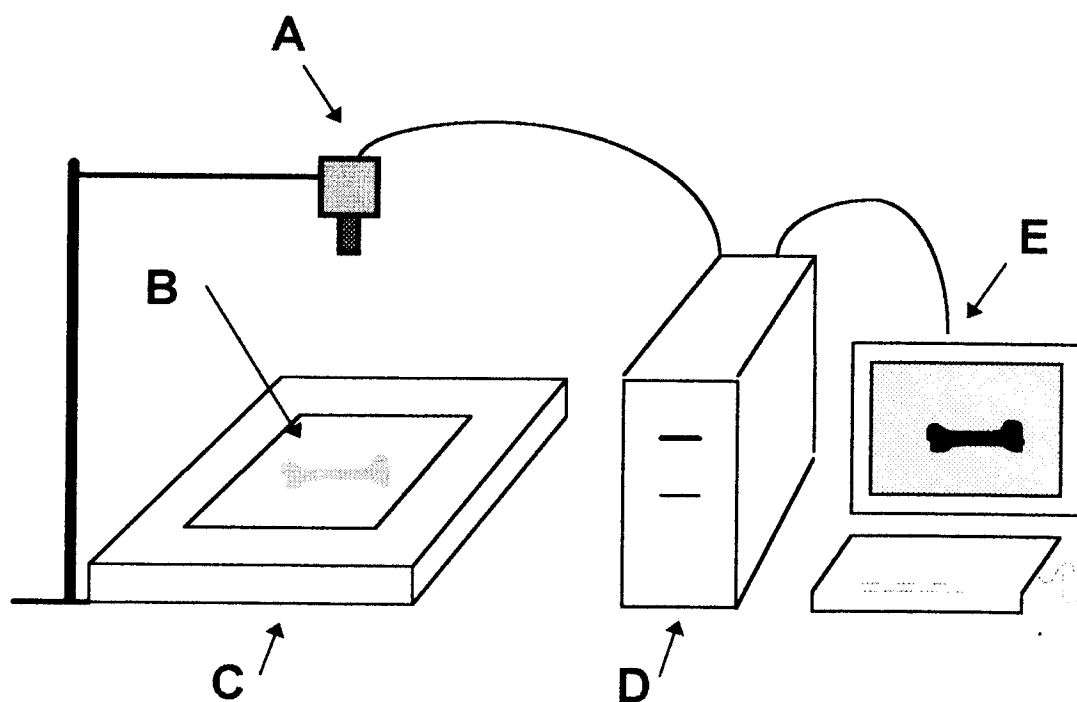


Figura 5. Esquema do equipamento óptico utilizado na digitalização de imagens. A: CCD câmera monocromática com dispositivo de imagem CCD (diodo de carga acoplada). B: Imagem radiográfica. C: Fonte de luz fluorescente homogênea com difusor acrílico. D: CPU convencional com “Frame Graver” instalado, gerenciado por software de processamento de imagem, Global Lab. (versão 2.10) que converte os sinais analógicos capturados pela CCD em digitais. E: Monitor para a observação das informações matemáticas extraídas das imagens digitalizadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises químicas.

5.1.1. Composição química.

Na Figura 6 são apresentados os resultados obtidos para as diferentes análises químicas realizadas no farelo de arroz, dentre os quais destacam-se os valores de fibra alimentar e cinzas.

A fração insolúvel da fibra alimentar está na ordem de 34 % e a solúvel em 5 %. Diversos autores relatam valores que variam entre 20 e 34 % para a fibra total (WEBER & CHAUDHARY, 1987; TOPPING *et al.*, 1990; SAUNDERS, 1990; TORIN, 1991) e valores entre 1,8 e 4 % a fibra solúvel (SAUNDERS, 1990; TORIN, 1991). Os valores relativamente elevados da fibra solúvel são importantes já que esta tem sido associada por vários pesquisadores com a diminuição do colesterol total e da fração de lipoproteína de baixa densidade (LDL) em humanos e animais consumindo diversos farelos, entre os quais se destacam o de aveia e arroz (KIRBY, 1981; VAHOUNY, 1982; KAHN, *et al.*, 1989; SHINNICK *et al.*, 1988; TOPPING *et al.*, 1990; KAHN, *et al.*, 1992; ROUANET *et al.*, 1993; KAHN, *et al.*, 1994).

O elevado conteúdo em cinzas encontrado no farelo de arroz (11 %), comparável com o encontrado por vários autores que relatam valores entre 6 e 18 % (BARBER, 1971; GUERRA & JAFFÉ, 1975; TORTOSA & BENEDITO DE BARBER, 1978; BARBER & BENEDITO DE BARBER, 1980; JULIANO, 1980; SAUNDERS, 1990; TORIN, 1991) foi um indicador da riqueza mineral deste subproduto.

Os resultados da análise da composição mineral (Tabela 3) mostraram, como era de se esperar pelo alto teor de cinzas, que o farelo de arroz apresenta-se como um subproduto rico em ferro, cobre, fósforo e zinco. O único elemento encontrado em baixa concentração foi o cálcio, estes

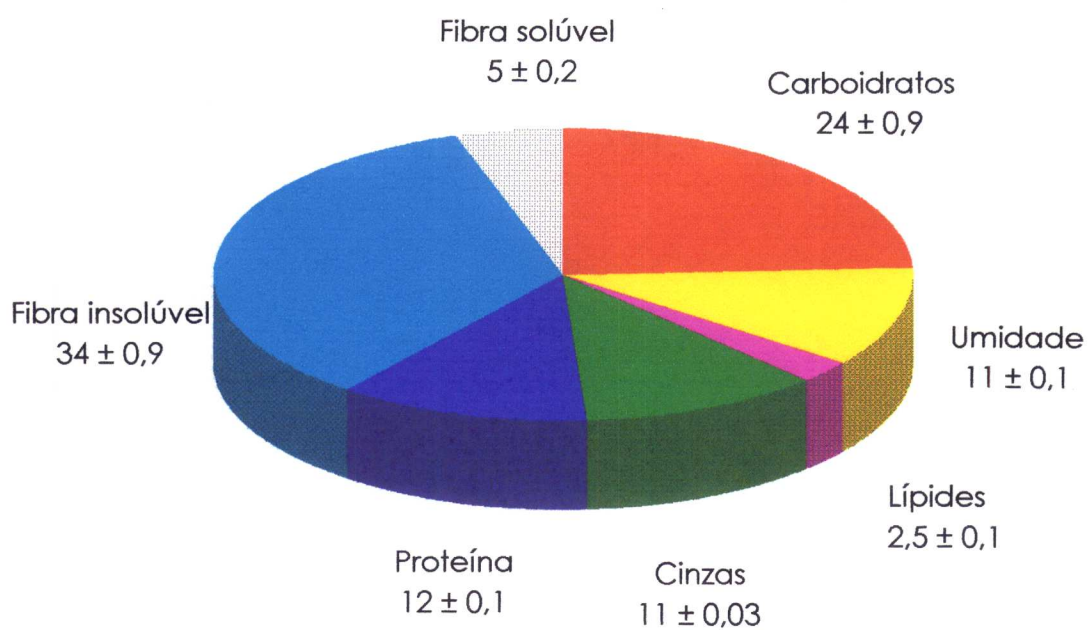


Figura 6. Composição química do farelo de arroz (g/100g).
Valores médios e desvios-padrão de um mínimo de 3 determinações.

resultados estão de acordo com os relatados por Primo *et al.*, (1970); Barber (1971); Barber & Benedito de Barber (1980); Saunders (1990) e Torin (1991).

Tabela 3. Composição em Zn, Ca, Cu, Fe e P do farelo de arroz

<i>Mineral</i>	<i>Farelo de arroz</i>
Zn (µg/g)	80 ± 4,29
Ca (%)	0,07 ± 0,002
Cu (µg/g)	24,90 ± 0,67
Fe (µg/g)	310 ± 7,99
P (%)	2 ± 0,23

Valores médios e erros-padrão de 2 determinações

Nas Tabelas 4 e 5 são apresentados os resultados da composição centesimal e mineral (zinco, cálcio, cobre, ferro e fósforo), respectivamente, das dietas elaboradas para os ensaios biológicos. É interessante observar que para os diferentes minerais, todas as dietas, inclusive a Basal, cobrem os requerimentos de Zn, Cu, P e Fe. O cálcio permaneceu deficiente nas dietas Basal e todas aquelas onde o elemento não é acrescido a nível de 100 %.

Tabela 4. Composição química das dietas experimentais (g/100g)

<i>Dieta</i>	<i>Umidade</i>	<i>Proteína</i>	<i>Lípides</i>	<i>Fibra alimentar</i>	<i>Cinzas</i>	<i>Carboidratos</i>
Basal	11,21 ± 0,05	10,31 ± 0,12	7,24 ± 0,11	39,40 ± 0,70	10,64 ± 1,02	21,20 ± 0,66
Comp	11,27 ± 0,03	10,09 ± 0,37	7,18 ± 0,09	40,93 ± 0,90	13,39 ± 0,96	17,14 ± 0,59
Cas	9,64 ± 0,13	10,40 ± 0,21	7,05 ± 0,09	5,15 ± 0,33	2,83 ± 0,28	65,11 ± 0,28
Zn-50	11,30 ± 0,05	10,58 ± 0,33	7,28 ± 0,06	39,95 ± 0,99	10,79 ± 0,86	20,10 ± 0,75
Zn-100	10,94 ± 0,15	10,65 ± 0,40	6,26 ± 0,08	40,03 ± 0,86	10,88 ± 0,81	21,24 ± 0,65
Ca-50	7,99 ± 0,03	10,32 ± 0,13	7,63 ± 0,09	39,59 ± 0,98	11,65 ± 0,73	22,82 ± 0,77
Ca-100	9,98 ± 0,06	10,21 ± 0,17	7,65 ± 0,12	40,26 ± 1,04	12,42 ± 0,65	19,48 ± 0,89
Zn-Ca	9,08 ± 0,05	10,15 ± 0,22	7,80 ± 0,07	39,63 ± 0,69	12,60 ± 0,58	20,74 ± 0,69
Zn-Cu	10,29 ± 0,18	10,30 ± 0,13	7,33 ± 0,12	38,74 ± 0,95	10,82 ± 0,08	22,52 ± 0,85
Zn-Fe	11,07 ± 0,06	9,58 ± 0,37	7,37 ± 0,04	39,17 ± 0,87	11,15 ± 0,21	21,66 ± 0,68
Ca-Cu	9,64 ± 0,08	10,18 ± 0,50	7,99 ± 0,09	37,67 ± 0,93	12,53 ± 0,09	21,99 ± 0,70
Ca-Fe	10,42 ± 0,11	10,45 ± 0,37	7,32 ± 0,12	37,31 ± 0,74	12,96 ± 0,13	21,54 ± 0,63
Zn-Ca-Cu	11,22 ± 0,09	9,78 ± 0,18	7,15 ± 0,12	41,06 ± 0,59	12,91 ± 0,42	17,88 ± 0,73
Zn-Ca-Fe	10,83 ± 0,12	9,98 ± 0,57	7,03 ± 0,06	39,74 ± 0,86	11,90 ± 0,31	20,52 ± 0,99
Zn-Ca-Cu-Fe	12,50 ± 0,09	10,20 ± 0,20	6,99 ± 0,13	41,12 ± 1,32	13,13 ± 0,18	16,06 ± 1,01
Zn-Cu-Fe	10,45 ± 0,07	10,33 ± 0,27	7,67 ± 0,06	39,40 ± 0,77	10,95 ± 0,64	21,20 ± 0,88
Ca-Cu-Fe	11,01 ± 0,13	10,27 ± 0,32	7,24 ± 0,08	41,44 ± 0,79	12,52 ± 0,09	17,52 ± 0,97

Valores médios e desvios-padrão de 3 determinações.

Tabela 5. Composição em zinco, cálcio, cobre, ferro e fósforo da dietas experimentais.

<i>Dietas</i>	<i>Zn (µg/g)</i>	<i>Ca (%)</i>	<i>Cu (µg/g)</i>	<i>Fe (µg/g)</i>	<i>P (%)</i>
Basal	70 ± 2,2	0,05 ± 0,00	11,2 ± 0,7	240 ± 2	2,20 ± 0,16
Comp	78 ± 3,4	0,50 ± 0,00	14,9 ± 1,1	293 ± 2	2,46 ± 0,02
Cas	11 ± 1,9	0,50 ± 0,00	7,0 ± 0,7	24 ± 2	0,56 ± 0,03
Zn-50	76 ± 1,0	0,05 ± 0,00	10,6 ± 3,4	234 ± 1	2,15 ± 0,11
Zn-100	85 ± 1,5	0,05 ± 0,01	11,2 ± 0,8	225 ± 3	2,13 ± 0,15
Ca-50	62 ± 1,9	0,27 ± 0,02	7,4 ± 0,6	210 ± 1	2,34 ± 0,07
Ca-100	65 ± 2,2	0,52 ± 0,02	7,3 ± 0,7	225 ± 2	2,52 ± 0,17
Zn-Ca	79 ± 1,8	0,54 ± 0,02	7,1 ± 0,9	210 ± 2	2,51 ± 0,08
Cu-Zn	83 ± 1,9	0,04 ± 0,00	14,8 ± 0,2	223 ± 2	2,09 ± 0,07
Fe-Zn	82 ± 1,7	0,04 ± 0,00	10,3 ± 0,3	274 ± 2	2,16 ± 0,10
Ca-Cu	67 ± 1,9	0,56 ± 0,03	13,2 ± 1,1	144 ± 2	2,08 ± 0,16
Fe-Ca	68 ± 2,1	0,54 ± 0,02	8,2 ± 0,4	265 ± 2	2,11 ± 0,07
Zn-Ca-Cu	80 ± 2,5	0,48 ± 0,06	14,5 ± 0,6	133 ± 2	2,52 ± 0,18
Fe-Zn-Ca	79 ± 2,2	0,50 ± 0,04	6,9 ± 0,1	276 ± 2	2,48 ± 0,11
Fe-Zn-Ca-Cu	80 ± 2,2	0,50 ± 0,04	14,7 ± 0,3	273 ± 2	2,45 ± 0,16
Cu-Zn-Fe	81 ± 2,6	0,04 ± 0,00	14,7 ± 1,3	269 ± 2	2,07 ± 0,10
Fe-Ca-Cu	66 ± 1,9	0,51 ± 0,00	14,0 ± 0,9	259 ± 2	2,43 ± 0,17

Valores médios e erros-padrão de 2 determinações por dieta.

5.1.2. Inibidores de tripsina.

No farelo de arroz analisado não foi detectada atividade dos inibidores de tripsina, resultado que coincide com o relatado por Torin (1991). Poucos trabalhos (BARBER *et al.*, 1978; BENEDITO DE BARBER & BARBER, 1978; TORTOSA & BENEDITO DE BARBER, 1978) relatam a presença destes antinutrientes no farelo de arroz como um todo. É factível encontrar alguma atividade antitriptica no gérmen, a qual se encontra distribuída pelo farelo, sendo esses baixos níveis facilmente eliminados com o tratamento térmico.

5.1.3. Ácido fítico.

A análise do conteúdo de ácido fítico no farelo de arroz revelou concentrações de $6,47 \pm 0,25$ e $6,39 \pm 0,15$ g/100g, coincidindo com resultados encontrados por Erdman (1979), Weber & Chaudhary (1987), Warren & Farrell (1990), Torin (1991) e Torin *et al.*, (1994). São poucos os produtos conhecidos com teor tão elevado de fitatos. Entre eles encontram-se a farinha de gergelim desengordurada com 5,17 e a farinha de algodão com 4,8 % (CHERYAN, 1980). A presença destas concentrações de fitato no farelo de arroz foi considerada de grande importância para a análise dos resultados dos ensaios biológicos, devido à conhecida interferência deste agente quelante na disponibilidade biológica dos minerais, principalmente com relação à utilização de zinco e cálcio (ERDMAN, 1979; CHERYAN, 1980; CHAMPAGNE *et al.*, 1985; FRØLICH & ASP, 1985) ou seja os elementos chave na interpretação deste trabalho.

5.2. Ensaio biológicos.

5.2.1. Deposição mineral óssea.

No início do ensaio, o grupo Zero foi sacrificado e seus fêmures extraídos para determinação das cinzas, a fim de se avaliar comparativamente

o efeito da alimentação com dietas a base de farelo de arroz (suplementadas ou não), sobre a deposição mineral óssea. Na Figura 7 pode-se observar que o consumo da dieta Basal de farelo de arroz produziu uma diminuição de 23 % no conteúdo de cinzas dos fêmures, com relação ao início do experimento (grupo Zero). Já o acréscimo de cálcio a 100 % do requerimento tanto na forma isolada (dieta Ca-100) ou complementada (dieta Comp) não modificou o teor de cinzas obtido com o Zero. Por outra parte, comparando o grupo Zero com a dieta de caseína observou-se que esta apresentava uma resposta positiva, medida através do aumento no teor de cinzas, de 21 %. Estes resultados mostraram que de fato o uso do farelo de arroz produziu uma perda no conteúdo mineral ósseo dos animais em fase de crescimento; ou seja, de animais que apresentavam uma demanda grande de minerais na dieta, em relação aos animais recém desmamados.

É importante destacar que a dieta Basal apresentou deficiência de cálcio, o que já não aconteceu com as dietas Ca-100 e Comp, as quais supriam o requerimento total em cálcio, e cálcio mais os outros minerais, respectivamente. Entretanto, é evidente que nem a suplementação com cálcio, nem com a mistura mineral completa atingiu o nível de rendimento observado quando o farelo foi totalmente excluído da dieta (Cas). O anterior deixa clara a baixa eficiência com que os minerais do farelo, assim como aqueles a ele adicionados, são aproveitados pelo animal.

Na tabela 6 apresentam-se os resultados dos teores de cinzas nos fêmures, cálcio, zinco, cobre e fósforo obtidos dos diferentes tratamentos. Os Blocos formados com os diferentes grupos para a realização da análise estatística já foram detalhados na secção 4.2.2.1.

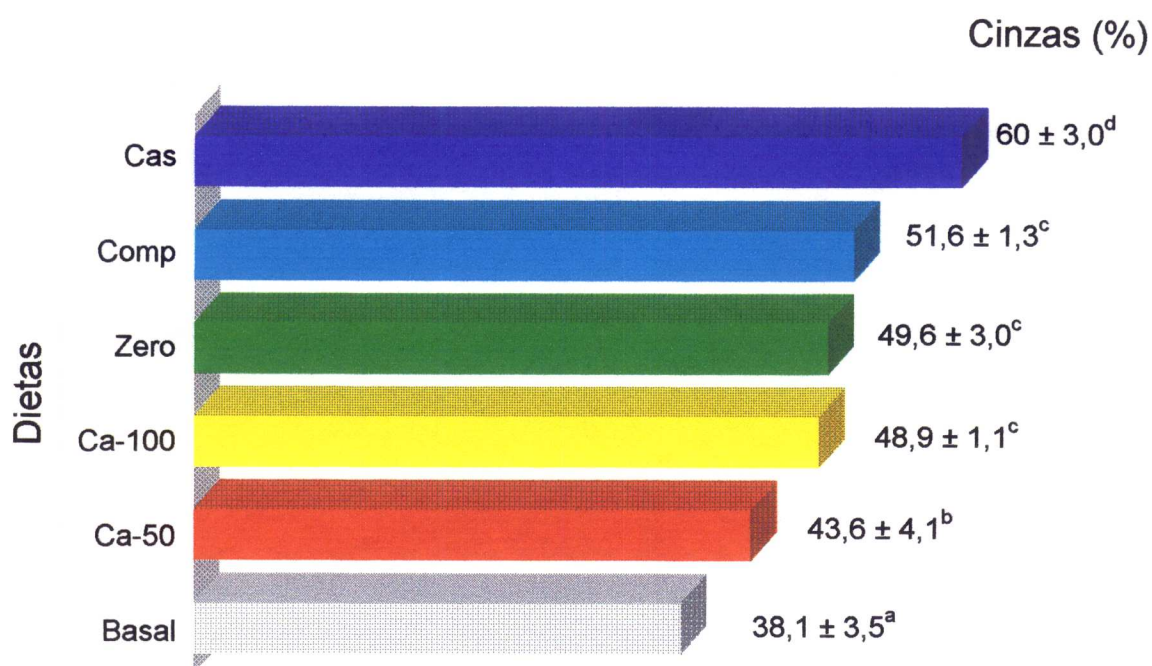


Figura 7. Conteúdo em cinzas (%) dos fêmures do Bloco 1, constituído pelos seguintes tratamentos: Basal: dieta de farelo de arroz (composição na Tabela 1). Ca-50: Basal + 50 % do requerimento de cálcio (AIN-76). Ca-100: Basal + 100 % do requerimento de cálcio (AIN-76). Comp: Basal + mistura mineral completa. Cas: igual à dieta Comp, substituindo o farelo de arroz por caseína. Zero: animais sacrificados ao início do ensaio.

Tabela 6. Conteúdo de cinzas (%) e deposição de zinco, cálcio, cobre e fósforo dos fêmures dos animais submetidos aos diferentes tratamentos alimentares.

<i>Tratamento</i>	<i>Cinzas</i>	<i>Zn (µg)</i>	<i>Ca (%)</i>	<i>Cu (µg)</i>	<i>P (%)</i>
Basal	38,13 ± 3,51	13,63 ± 1,39	15,73 ± 1,80	2,19 ± 0,20	8,38 ± 0,51
Comp	51,56 ± 1,34	17,56 ± 0,91	30,70 ± 3,33	3,97 ± 0,27	15,50 ± 1,68
Cas	59,98 ± 2,96	30,79 ± 3,18	31,03 ± 1,31	4,93 ± 0,32	20,86 ± 1,12
Zn-50	35,67 ± 3,11	17,83 ± 1,68	15,82 ± 0,51	2,37 ± 0,30	8,73 ± 0,53
Zn-100	38,27 ± 1,02	18,53 ± 2,22	16,06 ± 1,57	2,21 ± 0,37	8,86 ± 0,91
Ca-50	43,59 ± 4,10	12,93 ± 1,47	17,27 ± 1,33	2,33 ± 0,20	9,24 ± 0,59
Ca-100	48,91 ± 1,13	14,49 ± 1,78	20,84 ± 1,79	2,91 ± 0,14	11,84 ± 0,57
Zn-Ca	50,07 ± 1,05	13,31 ± 1,51	19,59 ± 2,55	2,61 ± 0,40	10,83 ± 1,22
Zn-Cu	40,89 ± 3,32	14,34 ± 2,40	10,77 ± 0,66	1,88 ± 0,22	7,38 ± 0,35
Zn-Fe	41,31 ± 3,48	13,03 ± 1,07	14,36 ± 1,85	2,03 ± 0,28	8,12 ± 1,02
Ca-Cu	49,18 ± 4,20	12,16 ± 0,88	22,40 ± 2,93	3,12 ± 0,17	11,61 ± 0,94
Ca-Fe	47,36 ± 4,41	14,58 ± 3,53	20,68 ± 2,17	2,98 ± 0,20	11,60 ± 1,20
Zn-Ca-Cu	48,12 ± 2,89	13,16 ± 1,96	20,24 ± 2,87	2,89 ± 0,30	10,95 ± 1,25
Zn-Ca-Fe	47,91 ± 4,12	15,77 ± 2,80	19,19 ± 2,47	3,20 ± 0,31	11,90 ± 1,04
Zn-Ca-Cu-Fe	51,02 ± 2,74	12,32 ± 1,33	18,26 ± 2,71	2,80 ± 0,38	11,53 ± 1,48
Zn-Cu-Fe	38,53 ± 1,27	14,30 ± 1,65	9,73 ± 0,74	2,07 ± 0,34	6,99 ± 0,55
Ca-Cu-Fe	49,46 ± 2,38	11,80 ± 1,78	15,41 ± 1,19	2,81 ± 0,20	11,19 ± 1,02

Valores médios e desvios-padrão de 6 animais por tratamento.

Na tabela 7 (Bloco A) pode-se observar que para o parâmetro cinzas no fêmur o maior valor encontrado foi o da dieta de caseína com todos os minerais (Cas), como foi anotado anteriormente.

Tabela 7. Conteúdo de cinzas (%) e deposição de zinco, cálcio, cobre e fósforo dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco A.

<i>Tratamento</i>	<i>Cinzas</i>	<i>Zn (µg)</i>	<i>Ca (%)</i>	<i>Cu (µg)</i>	<i>P (%)</i>
Basal	38,13 ± 3,51 ^a	13,63 ± 1,39 ^a	15,73 ± 1,80 ^a	2,19 ± 0,20 ^a	8,38 ± 0,51 ^a
Ca-50	43,59 ± 4,10 ^b	12,93 ± 1,47 ^a	17,27 ± 1,33 ^a	2,33 ± 0,20 ^a	9,24 ± 0,59 ^a
Ca-100	48,91 ± 1,13 ^c	14,49 ± 1,78 ^a	20,84 ± 1,79 ^b	2,91 ± 0,14 ^b	11,84 ± 0,57 ^b
Comp	51,56 ± 1,34 ^c	17,56 ± 0,91 ^b	30,70 ± 3,33 ^c	3,97 ± 0,27 ^c	15,50 ± 1,68 ^c
Cas	59,98 ± 2,96 ^d	30,79 ± 3,18 ^c	31,03 ± 1,31 ^c	4,93 ± 0,32 ^d	20,86 ± 1,12 ^d

Valores médios e desvios-padrão de 6 animais por tratamento.

Valores com letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Entretanto, considerando os minerais de forma individual, vemos que a deposição de cálcio no osso do animal alimentado com a dieta Basal e Ca-50 foi inferior àquela obtida com as dietas Ca-100, Comp e Cas, sendo que entre as duas últimas não existiu diferença significativa. Isto mostra que o Ca da dieta completa foi depositado com a mesma eficiência que o da dieta de caseína. Todavia, o efeito desta suplementação sobre a deposição de Zn, Cu e P foi estatisticamente diferente. Ressalte-se, contudo, que o conteúdo destes minerais nos fêmures dos animais do tratamento com a dieta completa, apesar de ser maior que o observado com a dieta Basal, não atingiu os valores da dieta de caseína. Isto vem em apoio à hipótese de que o acréscimo de cálcio a uma dieta cuja disponibilidade de zinco está prejudicada pela presença de

fitatos resultaria em deficiência ainda maior de Zn (MORRIS & ELLIS, 1980; FORBES *et al.*, 1983; FORBES *et al.*, 1984; FORDYCE *et al.*, 1987). Por outra parte, pode-se observar que o cobre, mesmo tendo uma deposição menor, tanto pela dieta Basal quanto pela completa em relação à dieta de caseína, apresentou uma concentração no fêmur dos animais da dieta completa 19% menor que a da dieta de caseína. Já para o zinco esta diferença foi de 43%. Estes resultados podem ser pelo menos em parte interpretados segundo o exposto por Lee *et al.* (1985), e Cousins (1985). Esses autores sugerem que a redução na absorção do zinco pela presença de ácido fítico produz um aumento na fração de cobre disponível, devido a uma menor produção de metalotioneína (proteína que liga tanto Zn quanto Cu), permitindo assim a passagem de mais cobre do lúmen para o sistema circulatório.

Nas Tabelas 8 e 9 (Blocos B e C) pode-se ver o aumento no teor de cinzas em relação à dieta Basal quando as dietas foram suplementadas com cálcio.

Tabela 8. Conteúdo de cinzas (%) e deposição de zinco, cálcio, cobre e fósforo dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco B.

<i>Tratamento</i>	<i>Cinzas</i>	<i>Zn (μg)</i>	<i>Ca (%)</i>	<i>Cu (μg)</i>	<i>P (%)</i>
Basal	38,13 ± 3,51 ^a	13,63 ± 1,39 ^a	15,73 ± 1,80 ^a	2,19 ± 0,20 ^a	8,38 ± 0,51 ^a
Zn-50	35,67 ± 3,11 ^a	17,83 ± 1,68 ^b	15,82 ± 0,51 ^a	2,37 ± 0,30 ^a	8,73 ± 0,53 ^a
Zn-100	38,27 ± 1,02 ^a	18,53 ± 2,22 ^b	16,06 ± 1,57 ^a	2,21 ± 0,37 ^a	8,86 ± 0,91 ^a
Ca-50	43,59 ± 4,10 ^b	12,93 ± 1,47 ^a	17,27 ± 1,33 ^a	2,33 ± 0,20 ^a	9,24 ± 0,59 ^a
Ca-100	48,91 ± 1,13 ^c	14,49 ± 1,78 ^a	20,84 ± 1,79 ^b	2,91 ± 0,14 ^b	11,84 ± 0,57 ^b
Zn-Ca	50,07 ± 1,05 ^c	13,31 ± 1,51 ^a	19,59 ± 2,55 ^b	2,61 ± 0,40 ^b	10,83 ± 1,22 ^b
Comp	51,56 ± 1,34 ^c	17,56 ± 0,91 ^b	30,70 ± 3,33 ^c	3,97 ± 0,27 ^c	15,50 ± 1,68 ^c

Valores médios e desvios-padrão de 6 animais por tratamento.

Valores com letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 9. Conteúdo de cinzas (%) e deposição de zinco, cálcio, cobre e fósforo dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco C.

<i>Tratamento</i>	<i>Cinzas</i>	<i>Zn (μg)</i>	<i>Ca (%)</i>	<i>Cu (μg)</i>	<i>P (%)</i>
Basal	38,13 ± 3,51 ^a	13,63 ± 1,39 ^a	15,73 ± 1,80 ^a	2,19 ± 0,20 ^a	8,38 ± 0,51 ^a
Ca-100	48,91 ± 1,13 ^b	14,49 ± 1,78 ^a	20,84 ± 1,79 ^b	2,91 ± 0,14 ^{bc}	11,84 ± 0,57 ^b
Zn-Ca	50,07 ± 1,05 ^{bc}	13,31 ± 1,51 ^a	19,59 ± 2,55 ^b	2,61 ± 0,40 ^b	10,83 ± 1,22 ^b
Ca-Cu	49,18 ± 4,20 ^{bc}	12,16 ± 0,88 ^a	22,40 ± 2,93 ^b	3,12 ± 0,17 ^c	11,61 ± 0,94 ^b
Zn-Ca-Cu	48,12 ± 2,89 ^b	13,16 ± 1,96 ^a	20,24 ± 2,87 ^b	2,89 ± 0,30 ^{bc}	10,95 ± 1,25 ^b
Comp	51,56 ± 1,34 ^c	17,56 ± 0,91 ^b	30,70 ± 3,33 ^c	3,97 ± 0,27 ^d	15,50 ± 1,68 ^c

Valores médios e desvios-padrão de 6 animais por tratamento.

Valores com letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Analisando a deposição dos minerais no Bloco B (Tabela 8), evidencia-se aumento no conteúdo de Ca ósseo quando a suplementação da dieta Basal é feita com este mineral a 100%, independente de ser uma suplementação simples (Ca-100) ou composta (Zn-Ca). O aumento, contudo, não igualou o valor obtido com a dieta completa; ou seja, a dieta Basal que foi suplementada com todos os minerais necessários para o animal, nas proporções adequadas. Resultados similares aos obtidos com o cálcio foram encontrados para o fósforo. O acréscimo de zinco à dieta Basal (Zn-50 e Zn-100) produziu aumento no conteúdo ósseo de zinco, do mesmo nível que o observado com a dieta completa. Por outro lado, as dietas suplementadas com cálcio não melhoraram a deposição deste mineral, inclusive a dieta contendo zinco e cálcio (Zn-Ca), resultado lógico se se considerar que o Ca exerce um efeito negativo sobre a disponibilidade do zinco na presença de fitato. Isto também confirma o relatado por Brown *et al.* (1978), que encontraram que a deposição de zinco no fêmur de ratos é independente da deposição de cálcio e fósforo.

Para cobre e fósforo, a tendência foi a mesma que para o cálcio, ou seja: aumento na deposição, quando a suplementação da dieta Basal foi feita com cálcio a 100%.

Na Tabela 9, onde todos os tratamentos (com exceção da dieta Basal) têm suplementação simples ou composta com cálcio a 100 %, observou-se que a deposição deste mineral aumentou em todos os tratamentos, sendo entretanto maior no caso da dieta completa; da mesma forma como foi visto no Bloco B. Com relação ao zinco, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos a não ser para a dieta completa, onde se repete o caso do Bloco B, onde somente as dietas com acréscimo simples de Zn apresentaram uma maior deposição deste mineral. No caso do Bloco C, o acréscimo de zinco às dietas foi exclusivamente de forma combinada ou acompanhada de outro (s) mineral (ais), e sempre na presença de cálcio, que afeta a disponibilidade do Zn. Em adição, percebe-se que a resposta à suplementação com cobre foi influenciada pela presença de cálcio nas dietas, melhorando a utilização do microelemento. Pode ser dito também que o estímulo à deposição de cobre causado pela suplementação específica com cobre foi da mesma ordem de grandeza da produzida pela suplementação apenas com cálcio (Ca-100). Consistente com o registrado para as cinzas, observou-se ainda que a suplementação com todos os minerais (Comp) induziu a mais alta deposição destes quatro minerais.

A análise do efeito do acréscimo de zinco à dieta Basal na forma simples e combinada pode ser feita por meio da Tabela 10 (Bloco D). Observou-se que a dieta Zn-100 não trouxe diferença no teor de cinzas dos ossos dos animais em relação à dieta Basal. O que não foi uma surpresa pois também não houve elevação nos teores de cinzas provocados pelas dietas Zn-50 (Tabela 8) e Zn-100. Por sua vez, as dietas com acréscimo de zinco e cobre (Zn-Cu, Zn-Ca-Cu) não introduziram nenhuma mudança na deposição de zinco, quando comparadas com a dieta Basal.

Tabela 10. Conteúdo de cinzas (%) e deposição de zinco, cálcio, cobre e fósforo dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco D.

<i>Tratamento</i>	<i>Cinzas</i>	<i>Zn (μg)</i>	<i>Ca (%)</i>	<i>Cu (μg)</i>	<i>P (%)</i>
Basal	38,13 ± 3,51 ^a	13,63 ± 1,39 ^a	15,73 ± 1,80 ^a	2,19 ± 0,20 ^a	8,38 ± 0,51 ^{ac}
Zn-100	38,27 ± 1,02 ^{ab}	18,53 ± 2,22 ^b	16,06 ± 1,57 ^a	2,21 ± 0,37 ^a	8,86 ± 0,91 ^a
Zn-Ca	50,07 ± 1,05 ^{cd}	13,31 ± 1,51 ^a	19,59 ± 2,55 ^b	2,61 ± 0,40 ^b	10,83 ± 1,22 ^b
Zn-Cu	40,89 ± 3,32 ^b	14,34 ± 2,40 ^a	10,77 ± 0,66 ^c	1,88 ± 0,22 ^a	7,38 ± 0,35 ^c
Zn-Ca-Cu	48,12 ± 2,89 ^c	13,16 ± 1,96 ^a	20,24 ± 2,87 ^b	2,89 ± 0,30 ^b	10,95 ± 1,25 ^b
Comp	51,56 ± 1,34 ^d	17,56 ± 0,91 ^b	30,70 ± 3,33 ^d	3,97 ± 0,27 ^c	15,50 ± 1,68 ^d

Valores médios e desvios-padrão de 6 animais por tratamento.

Valores com letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Já a suplementação em zinco, junto com cálcio, mas não com o cobre, trouxe melhorias na deposição de minerais em geral (cinzas) e de Ca, P e Cu em particular, embora nenhuma melhoria tenha sido observada na deposição do próprio Zn.

Se o cálcio adicional não trouxe melhora na deposição do zinco, seja através da dieta Zn-Ca ou da Zn-Ca-Cu, o seu efeito positivo no aumento da deposição do próprio cálcio foi bem claro. Uma melhor deposição de cobre, por sua vez, foi estimulada pelo acompanhamento de Ca (ou Ca + Cu) na dieta suplementada com Zn, mas não pela mistura binária e balanceada de Zn + Cu.

A falta de uma resposta melhor à suplementação com zinco apenas, assim como o retrocesso que se registrou com a adição de cálcio (dieta Zn-Ca) pode ser explicada em parte pela interferência que o Ca exerce sobre a disponibilidade do Zn, como foi explicado para o Bloco B e pela

conhecida interação negativa que ocorre entre o cobre e o zinco (MAGEE & MATRONE, 1960; VAN CAMPEN & SCAIFE, 1967; VAN CAMPEN, 1969; HALL *et al.*, 1979; O'NEIL-CUTTING *et al.*, 1981; OESTREICHER & COUSINS, 1985; STOREY & GREGER, 1987). Efeito que pode justificar o fato de que a deposição de cálcio, cobre e fósforo no Bloco D apresentou o menor valor para a dieta Zn-Cu.

Outras três observações surgem da Tabela 10. Em primeiro lugar, e consistente com o achado nos outros Blocos, apenas a dieta Comp gerou os mais altos valores de cinzas, sendo que estes foram reflexo de aumentos condizentes para Zn, Ca, Cu e P. Isto em desacordo com o produzido pelas outras dietas, onde houve às vezes aumento no parâmetro cinzas, mas queda no de alguns minerais; ou uma situação como a da dieta Zn-100, que não resultou em alteração das cinzas embora tenha garantido uma maior deposição de zinco.

Em segundo lugar, o efeito compensatório da dieta Zn-Cu resultou de fato em uma drástica descalcificação, com queda (não significativa) na deposição de fósforo, mas sem aumento no cobre. Tal variação foi responsável por uma alteração notável da relação Ca/P e deixou perguntas quanto à estrutura físico-química da fase mineral do osso e, inclusive, dos minerais que tenham entrado em substituição ao cálcio.

Por último, a tendência seguida pelo aparecimento do zinco, mais uma vez, sugere a existência de fatores que regulam a sua deposição no osso, além da relação Zn/Cu.

É importante destacar que em trabalho anterior (TORIN *et al.*, 1994) encontrou-se que o acréscimo simples de 50 % do requerimento de zinco à dieta basal produziu aumento na eficiência alimentar da mesma ordem que o produzido com a dieta Comp, o que implica que uma vez superada a baixa disponibilidade de Zn da dieta Basal não necessariamente ocorrerá uma ótima utilização deste mineral, pois apesar de se registrar aumento na taxa de

crescimento dos animais, o estado de equilíbrio metabólico parece estar alterado. Isto pode ser deduzido dos achados de Brown *et al.* (1978); Giugliano & Millward (1984) e Zhou *et al.* (1993), que sugerem que o zinco do osso pode ser mobilizado e redistribuído a outros tecidos para suportar o crescimento mínimo durante períodos de deficiência de zinco.

Estes resultados podem ser interpretados como resposta metabólica às diversas tentativas de rebalancear o perfil mineral, onde dietas com Ca + Zn ou Ca + Zn + Cu exercem ambas um efeito positivo na neutralização da desmineralização causada pelo consumo de uma dieta de farelo de arroz, ao invés que dietas só com Zn ou Zn + Cu como suplemento.

Finalmente no Bloco E (Tabela 11), onde foi feita a introdução do ferro nas dietas, de forma associada a outros minerais, foi possível observar que o teor de cinzas estava diretamente relacionado com a presença de cálcio e não do ferro nas dietas. O mesmo aconteceu com a deposição do cálcio, cobre e fósforo. Já para o zinco, observou-se que as respostas aos diferentes tratamentos não diferiram estatisticamente da obtida com o grupo Basal, excetuando o grupo Comp que apresentou a maior deposição deste mineral. Esses resultados são compatíveis com os encontrados por Storey & Greger (1987), que não detectaram relação entre o consumo de ferro e a retenção de zinco em tíbias de ratos.

Cabe salientar na Tabela 11 a incidência de uma drástica diminuição da relação Ca/P. De forma análoga ao discutido no Bloco D, a tentativa de ministrar suplementação equilibrada de zinco e cobre resultou na perda acentuada de cálcio (nível 38 % inferior ao obtido com a dieta Basal) e redução da relação Ca/P. Considerando que as misturas Ca-Cu-Fe e Zn-Ca-Cu-Fe não mostraram esse efeito depressivo do cobre sobre a deposição do cálcio, sugere-se que a deficiência de cálcio na dieta pode ser seriamente agravada por suplementações de cobre, mesmo em relação balanceada com o

Tabela 11. Conteúdo de cinzas (%) e deposição de zinco, cálcio, cobre e fósforo dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco E.

<i>Tratamento</i>	<i>Cinzas</i>	<i>Zn (μg)</i>	<i>Ca (%)</i>	<i>Cu (μg)</i>	<i>P (%)</i>
Basal	38,13 ± 3,51 ^a	13,63 ± 1,39 ^a	15,73 ± 1,80 ^a	2,19 ± 0,20 ^a	8,38 ± 0,51 ^a
Zn-Fe	41,31 ± 3,48 ^b	13,03 ± 1,07 ^b	14,36 ± 1,85 ^b	2,03 ± 0,28 ^b	8,12 ± 1,02 ^b
Ca-Fe	47,36 ± 4,41 ^c	14,58 ± 3,53 ^c	20,68 ± 2,17 ^c	2,98 ± 0,20 ^c	11,60 ± 1,20 ^c
Zn-Ca-Fe	47,91 ± 4,12 ^d	15,77 ± 2,80 ^d	19,19 ± 2,47 ^d	3,20 ± 0,31 ^d	11,90 ± 1,04 ^d
Zn-Cu-Fe	38,53 ± 1,27 ^a	14,30 ± 1,65 ^c	9,73 ± 0,74 ^e	2,07 ± 0,34 ^b	6,99 ± 0,55 ^e
Ca-Cu-Fe	49,46 ± 2,38 ^e	11,80 ± 1,78 ^e	15,41 ± 1,19 ^a	2,81 ± 0,20 ^e	11,19 ± 1,02 ^f
Zn-Ca-Cu-Fe	51,02 ± 2,74 ^f	12,32 ± 1,33 ^f	18,26 ± 2,71 ^f	2,80 ± 0,38 ^e	11,53 ± 1,48 ^c
Comp	51,56 ± 1,34 ^f	17,56 ± 0,91 ^g	30,70 ± 3,33 ^g	3,97 ± 0,27 ^f	15,50 ± 1,68 ^g

Valores médios e desvios-padrão de 6 animais por tratamento.

Valores com letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

zinco. O autor declara não ter conhecimento de tal interação através da literatura. Não é possível afirmar também se a interação Ca x Cu ocorre a nível de absorção ou a nível de osteócito.

Tendo-se confirmado o fato de que a reposição de qualquer ferro perdido através do ácido fítico não afetaria a deposição dos minerais neste estudo, a análise dos resultados obtidos neste trabalho se restringiu aos Blocos A, B, C e D.

Estes resultados, permitem verificar que a deposição dos minerais zinco, cálcio, cobre e fósforo no fêmur de ratos constitui um bom avaliador da sua utilização, como foi sugerido por Franz *et al.* (1980a) e Momcilovic (1975). Esses autores recomendam a utilização deste tipo de análise para estudos de biodisponibilidade mineral em ratos.

5.2.2. Deteminações físicas.

Nas Tabelas 12 a 15 apresentam-se os resultados de peso dos animais e peso, diâmetro e comprimento dos fêmures dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos e organizados nos Blocos A, B, C e D, descritos anteriormente.

A Tabela 12 mostra o efeito da tentativa de se rebalancear a dieta Basal com cálcio. Evidencia-se primeiramente o retardo no crescimento do animal com ambos os níveis de suplementação, não se manifestando diferença significativa entre as dietas Ca-50 e Ca-100. Por outro lado, o maior rendimento em ganho de peso corporal e comprimento femoral foi mostrado pela dieta Comp, seguida pela Cas.

Tabela 12. Peso corporal e peso, diâmetro e comprimento dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco A.

<i>Tratamento</i>	<i>Peso rato (g)</i>	<i>Peso osso (g)</i>	<i>Diâmetro (mm)</i>	<i>Comprimento (mm)</i>
Basal	107,44 ± 5,42 ^a	0,12 ± 0,019 ^a	2,86 ± 0,13 ^a	25,03 ± 0,62 ^a
Ca-50	80,57 ± 2,62 ^b	0,11 ± 0,008 ^a	2,68 ± 0,14 ^a	23,20 ± 0,29 ^b
Ca-100	78,71 ± 8,39 ^b	0,12 ± 0,010 ^a	2,70 ± 0,20 ^a	23,33 ± 0,62 ^b
Comp	130,51 ± 7,78 ^c	0,17 ± 0,018 ^b	3,07 ± 0,15 ^b	25,94 ± 0,29 ^c
Cas	114,42 ± 3,55 ^a	0,19 ± 0,009 ^c	3,18 ± 0,07 ^b	25,60 ± 0,46 ^a

Valores médios e desvios-padrão de 6 animais por tratamento.

Valores com letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Os decréscimos ponderais, ainda abaixo do valor basal, não correlacionaram com o efeito positivo que o cálcio trouxe para o teor de cinzas, Ca e P dos fêmures, registrados na Tabela 7. Tampouco foi esperado o fato de que a dieta Comp tenha superado o desempenho da Cas, sendo que a Tabela 7 aponta uma tendência inversa com relação à deposição de minerais no osso.

O efeito da suplementação com cálcio nos pesos dos fêmures, entretanto, embora não tenha sido positivo para as dietas Ca-50 e 100, não resultou em diminuição da massa óssea. Também a massa óssea produzida pelas dietas Comp e Cas guardou alguma relação com os teores de cinzas e cálcio (Tabela 7).

De modo geral os resultados da Tabela 12 sugerem que as variáveis diâmetro e comprimento-do-osso não responderam claramente à suplementação singular do farelo de arroz com cálcio.

Por sua vez, o parâmetro peso corporal, visto em relação às medidas físicas do osso, sugere que a queda do peso do animal ocasionada pelo acréscimo simples de cálcio à dieta de farelo resulta em alterações metabólicas várias, dentre as quais, as que tangem ao metabolismo geral são sensivelmente afetadas e as que se relacionam com o metabolismo ósseo não.

Nas Tabelas 13, 14 e 15 (Blocos B, C e D), pode se comprovar a afirmação feita para o efeito do cálcio no peso corporal. Isto é, toda vez que se introduz o cálcio como suplemento, o organismo reage com a perda de massa, independente de o macroelemento estar acompanhado de cobre ou zinco. Já o efeito da suplementação com zinco amplamente conhecido através da literatura (PRASAD, 1989), estimulou o aumento, tanto do peso corporal, como o crescimento

Tabela 13. Peso corporal e peso, diâmetro e comprimento dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco B.

<i>Tratamento</i>	<i>Peso rato</i> (g)	<i>Peso osso</i> (g)	<i>Diâmetro</i> (mm)	<i>Comprimento</i> (mm)
Basal	107,44 ± 5,42 ^a	0,12 ± 0,019 ^{ab}	2,86 ± 0,13 ^a	25,03 ± 0,62 ^{ab}
Zn-50	116,22 ± 5,25 ^b	0,13 ± 0,012 ^a	3,06 ± 0,17 ^b	25,62 ± 0,32 ^{be}
Zn-100	107,52 ± 5,42 ^a	0,13 ± 0,009 ^a	2,88 ± 0,11 ^{ab}	24,80 ± 0,50 ^{ac}
Ca-50	80,57 ± 2,62 ^c	0,11 ± 0,008 ^{ab}	2,68 ± 0,14 ^a	23,20 ± 0,29 ^d
Ca-100	78,71 ± 8,39 ^c	0,12 ± 0,010 ^{ab}	2,70 ± 0,20 ^a	23,33 ± 0,62 ^d
Zn-Ca	79,77 ± 7,11 ^c	0,11 ± 0,011 ^b	2,68 ± 0,17 ^a	23,05 ± 0,73 ^d
Comp	130,51 ± 7,78 ^d	0,17 ± 0,018 ^c	3,07 ± 0,15 ^b	25,94 ± 0,29 ^e

Valores médios e desvios-padrão de 6 animais por tratamento.

Valores com letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 14. Peso corporal e peso, diâmetro e comprimento dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco C.

<i>Tratamento</i>	<i>Peso rato (g)</i>	<i>Peso osso (g)</i>	<i>Diâmetro (mm)</i>	<i>Comprimento (mm)</i>
Basal	107,44 ± 5,42 ^a	0,12 ± 0,019 ^a	2,86 ± 0,13 ^a	25,03 ± 0,62 ^a
Ca-100	78,71 ± 8,39 ^b	0,12 ± 0,010 ^a	2,70 ± 0,20 ^{ab}	23,33 ± 0,62 ^b
Zn-Ca	79,77 ± 7,11 ^b	0,11 ± 0,011 ^a	2,68 ± 0,17 ^{ab}	23,05 ± 0,73 ^b
Ca-Cu	77,91 ± 4,49 ^b	0,12 ± 0,014 ^a	2,80 ± 0,17 ^{ab}	22,84 ± 0,70 ^b
Zn-Ca-Cu	75,23 ± 7,45 ^b	0,12 ± 0,012 ^a	2,64 ± 0,13 ^b	22,63 ± 0,88 ^b
Comp	130,51 ± 7,78 ^c	0,17 ± 0,018 ^b	3,07 ± 0,15 ^c	25,94 ± 0,29 ^c

Valores médios e desvios-padrão de 6 animais por tratamento.

Valores com letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 15. Peso corporal e peso, diâmetro e comprimento dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco D.

<i>Tratamento</i>	<i>Peso rato (g)</i>	<i>Peso osso (g)</i>	<i>Diâmetro (mm)</i>	<i>Comprimento (mm)</i>
Basal	107,44 ± 5,42 ^a	0,12 ± 0,019 ^{ab}	2,86 ± 0,13 ^a	25,03 ± 0,62 ^{ac}
Zn-100	107,52 ± 5,42 ^a	0,13 ± 0,009 ^a	2,88 ± 0,11 ^a	24,81 ± 0,50 ^a
Zn-Ca	79,77 ± 7,11 ^b	0,11 ± 0,011 ^a	2,68 ± 0,17 ^b	23,05 ± 0,73 ^b
Zn-Cu	90,60 ± 2,96 ^c	0,09 ± 0,011 ^b	3,06 ± 0,17 ^c	25,62 ± 0,32 ^{cd}
Zn-Ca-Cu	75,23 ± 7,45 ^b	0,12 ± 0,012 ^a	2,64 ± 0,13 ^b	22,63 ± 0,88 ^b
Comp	130,51 ± 7,78 ^d	0,17 ± 0,018 ^c	3,07 ± 0,15 ^c	25,94 ± 0,29 ^d

Valores médios e desvios-padrão de 6 animais por tratamento.

Valores com letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

5.2.3. Fotodensitometria.

Para a avaliação da fotodensitometria como possível método de análise do conteúdo mineral ósseo, incluíram-se os dados de Equivalentes de massa de Alumínio total do Bloco 1 (descrito na seção 4.2.2.1) que incluiu os fêmures do Bloco A, mais aqueles extraídos do grupo Zero, estes últimos utilizados como indicador das características do tecido ósseo antes dos tratamentos. Os resultados correspondentes aos equivalentes em massa de alumínio total (EqAl) dos fêmures do Bloco 1 podem ser vistos na Figura 8, que mostra maior densidade, expressa em EqAl, dos fêmures dos animais alimentados com a dieta de caseína, quando comparados com os outros grupos. É importante ressaltar que a administração da dieta Basal não produziu nenhuma mudança no parâmetro, fato não consistente com os resultados obtidos para as cinzas (Figura 7).

A modo de ilustração são apresentadas uma série de seis fotos, com suas respectivas imagens radiográficas, correspondentes a um fêmur por tratamento do Bloco 1, onde pode ser observada a deterioração considerável do aspecto do osso da dieta Basal, caracterizável pela excessiva porosidade condilar (Foto 2, Radiografia 2). Para a dieta Ca-50, apesar de se observar na Foto 3 (Radiografia 3) alguma melhora no enchimento do osso, estatisticamente não se observa diferença nos EqAl quando comparada com os grupos Zero (Figura 8, Foto 1, Radiografia 1) e Basal, isto pode ser explicado pelo fato de o tratamento Ca-50 ser uma dieta que cobre somente 50 % do requerimento deste mineral. Já as dietas Ca-100 e Comp produziram ossos de aparência mais normal, como pode ser visto nas Fotos e Radiografias 4 e 5, respectivamente, e nas quais nota-se uma superfície aparentemente mais compacta, resultado que é atribuído à presença de cálcio em nível adequado para cobrir o requerimento teórico do animal,

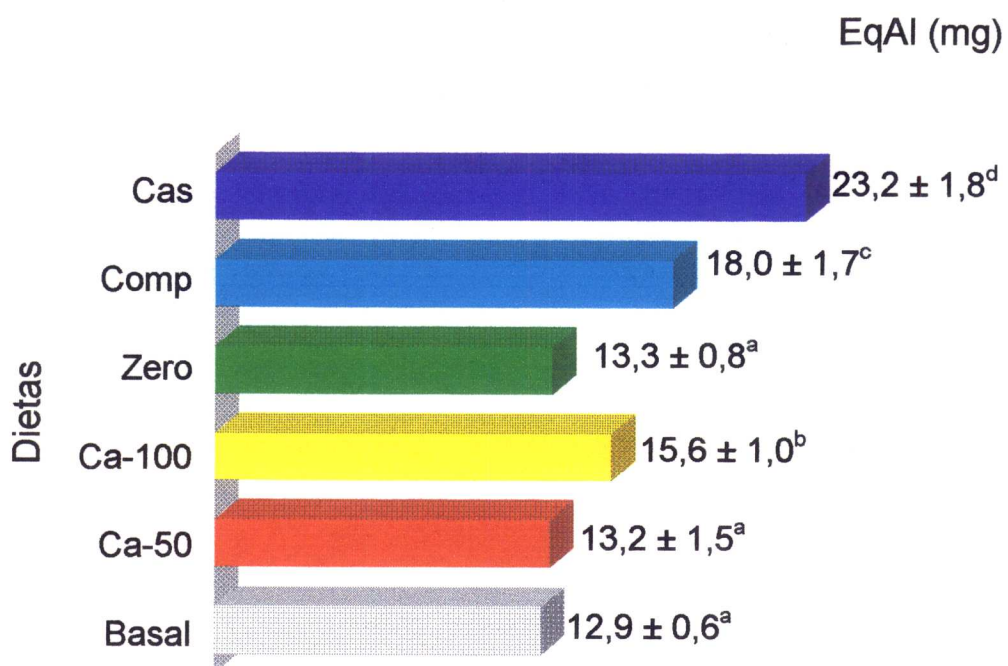


Figura 8. Equivalentes em massa de alumínio total dos fêmures do Bloco 1, constituído pelos seguintes tratamentos: Basal: dieta em base a farelo de arroz (composição na Tabela 1). Ca-50: Basal + 50 % do requerimento de cálcio (AIN-76). Ca-100: Basal + 100 % do requerimento de cálcio (AIN-76). Comp: Basal + mistura mineral completa. Cas: igual à dieta Comp, substituindo o farelo de arroz por caseína. Zero: animais sacrificados no início do ensaio.

Foto 1.- Fêmur de rato do grupo Zero (sacrificado ao início do ensaio)



Foto 2.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Basal (dieta em base a farelo de arroz, vide Tabela 1)



Foto 3.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Ca-50 (Basal + 50 % do requerimento de cálcio)



Foto 4.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Ca-100 (Basal + 100 % do requerimento de cálcio)

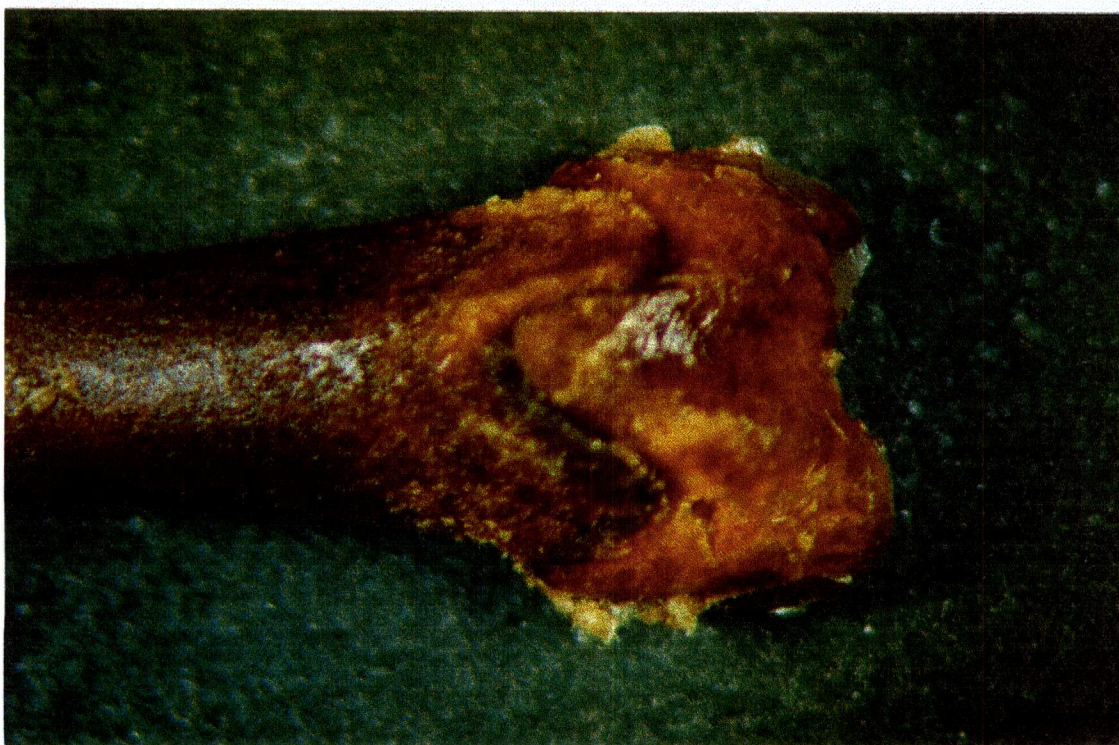


Foto 5.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Comp (Basal + mistura mineral completa)

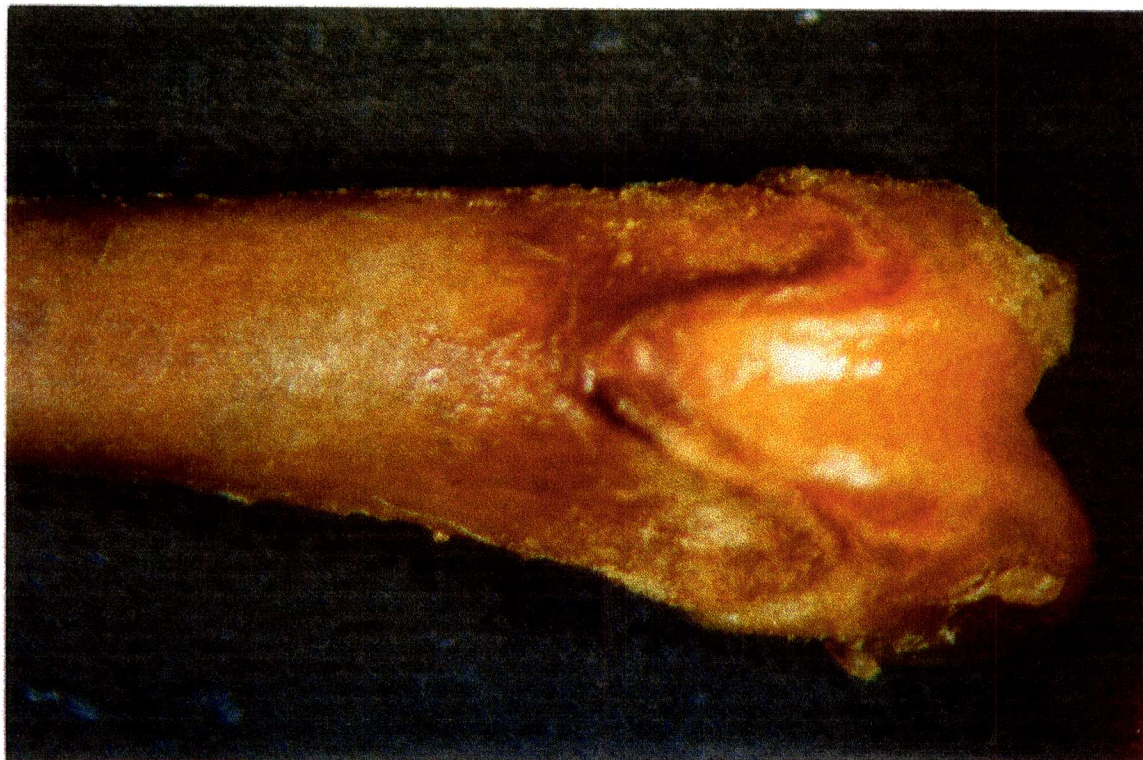
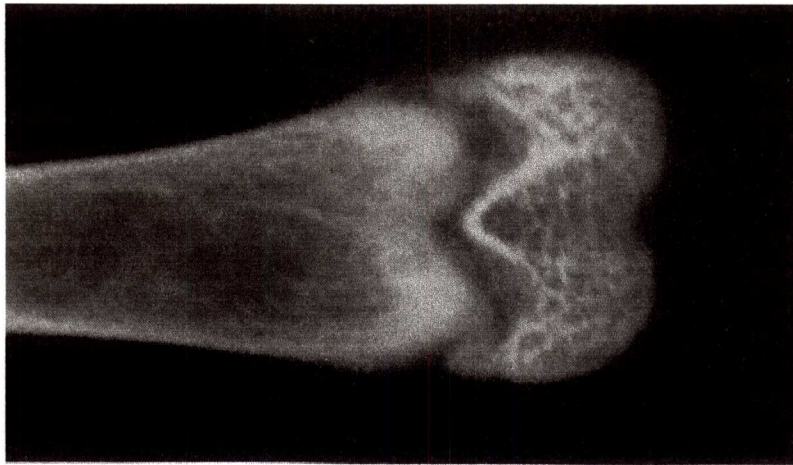


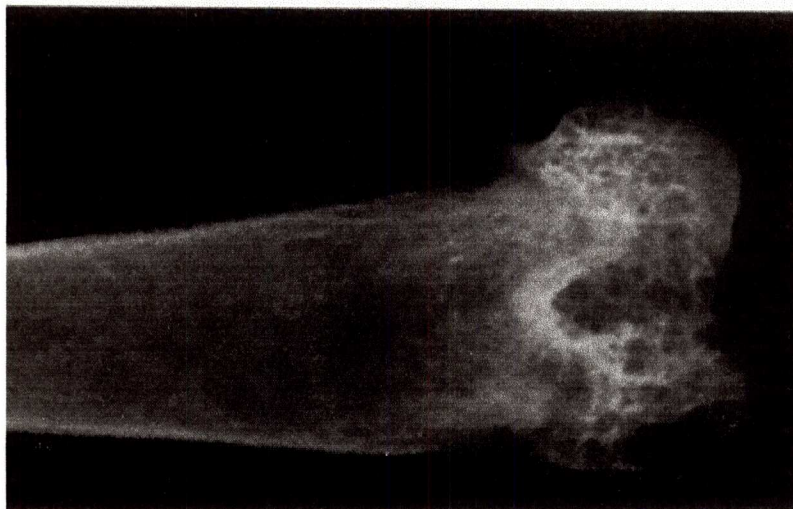
Foto 6.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Cas (Basal + igual à dieta Comp, substituindo o farelo de arroz por caseína)



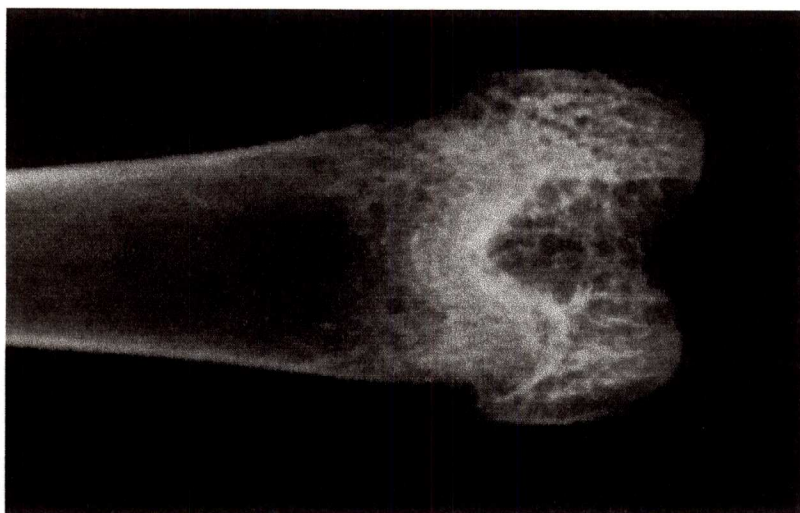
Radiografia 1.- Fêmur de rato do grupo Zero (sacrificado ao início do ensaio)



Radiografia 2.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Basal (dieta em base a farelo de arroz, vide Tabela 1)



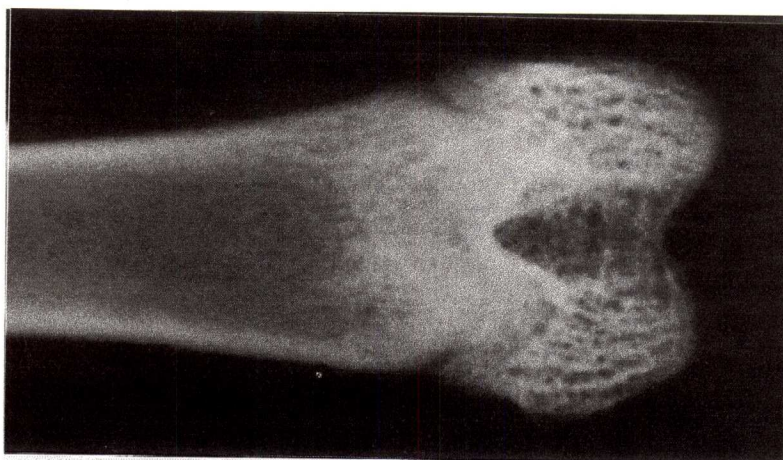
Radiografia 3.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Ca-50
(Basal + 50 % do requerimento de cálcio)



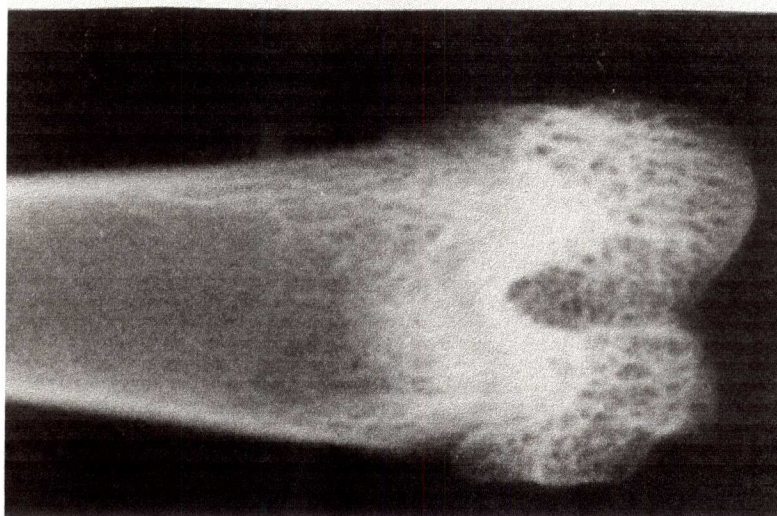
Radiografia 4.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Ca-100
(Basal + 100 % do requerimento de cálcio)



Radiografia 5.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Comp
(Basal + mistura mineral completa)



Radiografia 6.- Fêmur de rato alimentado com a dieta Cas (igual à dieta Comp, substituindo o farelo de arroz por caseína)



independente, desses valores serem inferiores aos obtidos com a dieta Cas (Foto 6, Radiografia 6). O valor de EqAI do grupo Cas foi o maior de todos, fato que corrobora o encontrado para o teor de cinzas deste tratamento (Figura 7).

Observa-se que a medida dos EqAI refletem fielmente a variação dos demais indicadores da mineralização óssea, que apresentaram incremento a partir do grupo Zero. Estes resultados podem ser comparados com os obtidos por Peterson *et al.* (1995), que observaram aumento do comprimento, mas não de volume, de tíbias de ratos alimentados com dietas contendo 0,25% de cálcio (fornecendo 50 % do requerimento). Os mesmos autores observaram que dietas com 0,5 ou 1% de cálcio resultaram em maior volume da tíbia.

As regressões lineares entre os equivalentes de massa de alumínio e os indicadores teor-de-cinzas e peso-do-fêmur (Figura 9), assim como o conteúdo de cálcio (Figura 10) deste Bloco, apresentam em todos os casos uma correlação positiva.

Na Tabela 16 apresentam-se os dados obtidos com todas as dietas, tanto para equivalentes de massa de alumínio para o fêmur total, quanto para os côndilos. A comparação entre estas duas medidas foi com o intuito de verificar se as duas determinações podem ser indistintamente utilizadas em um procedimento avaliatório de rotina. Para tanto, a partir destes dados foi realizada uma nova regressão linear obtendo-se uma correlação forte e positiva (Figura 11), indicando a ausência de diferença entre a utilização de qualquer um dos avaliadores em questão. Por essa razão e baseados na maior facilidade de manipular a imagem do fêmur total, a análise dos resultados dos Blocos A a D foi feita com os dados dos equivalentes de massa de alumínio do fêmur total.

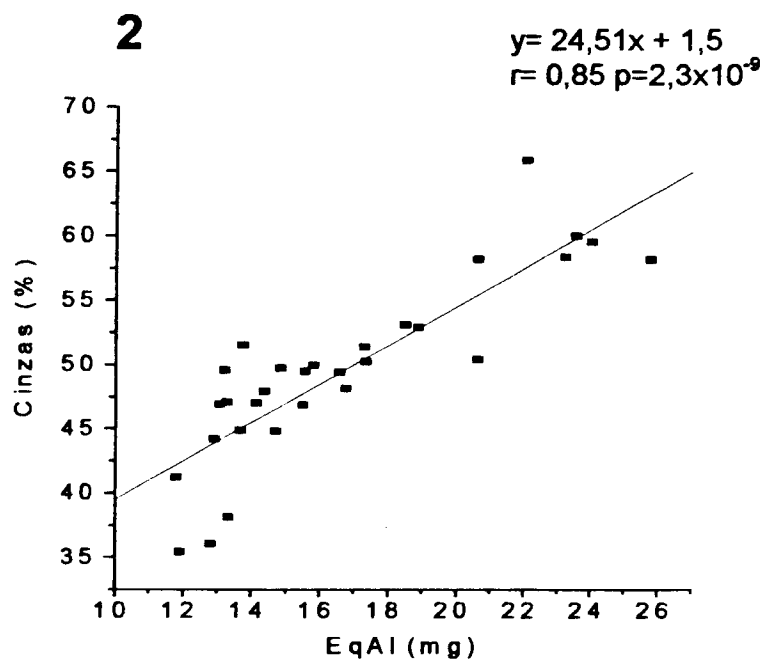
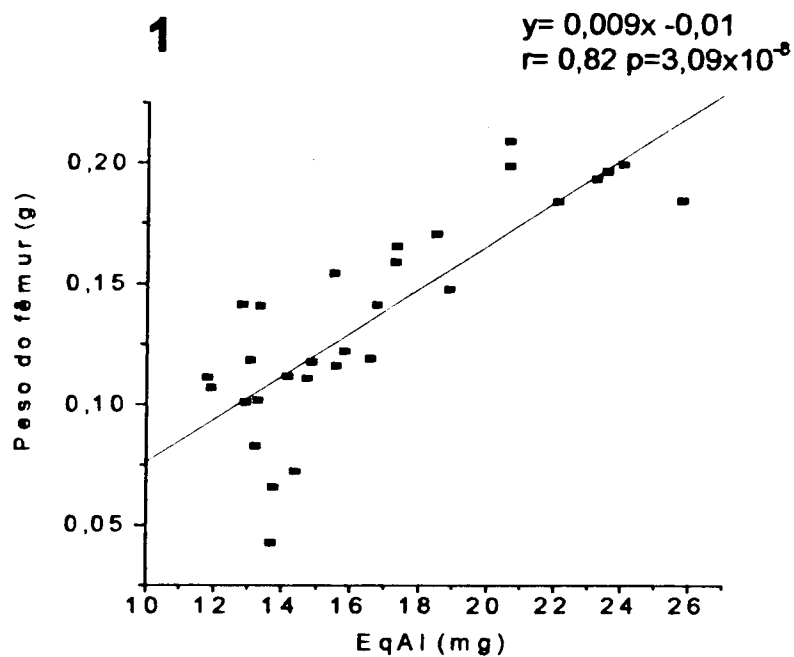


Figura 9. Regressões lineares entre equivalentes de alumínio (EqAl) do Bloco 1^a e os seguintes indicadores: 1: peso do fêmur (g). 2: teor de cinzas no fêmur (%). ^a Bloco 1 constituído pelos seguintes tratamentos: Basal; Ca-50; Ca-100; Comp; Cas e Zero

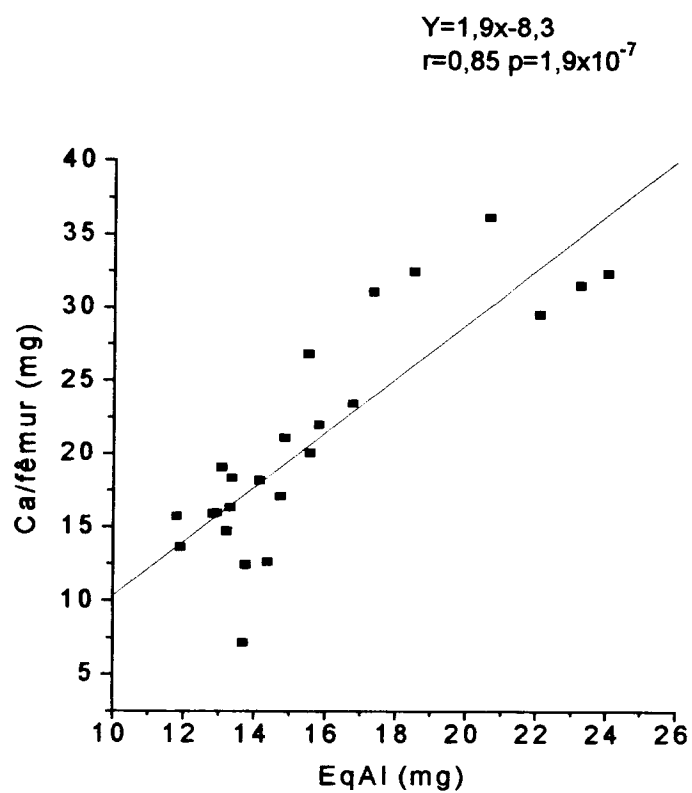


Figura 10. Regressões lineares entre equivalentes de alumínio (EqAl) e o conteúdo em cálcio dos fêmures dos ratos do Bloco 1. Bloco 1 constituído pelos seguintes tratamentos: Basal; Ca-50; Ca-100; Comp; Cas e Zero.

Tabela 16. Equivalentes de massa de alumínio (EqAl) dos fêmures e cêndilos dos animais submetidos aos diferentes tratamentos alimentares.

<i>Tratamento</i>	<i>EqAl fêmur</i> <i>(mg)</i>	<i>EqAl cêndilos</i> <i>(mg)</i>
Basal	12,88 ± 0,58	14,58 ± 0,95
Comp	18,04 ± 1,74	28,35 ± 1,32
Cas	23,23 ± 1,75	36,52 ± 2,30
Zn-50	13,00 ± 0,40	14,09 ± 0,83
Zn-100	13,14 ± 0,21	15,46 ± 0,86
Ca-50	13,21 ± 1,46	19,00 ± 2,67
Ca-100	15,63 ± 1,01	23,64 ± 2,53
Zn-Ca	14,52 ± 0,82	19,13 ± 2,94
Zn-Cu	13,00 ± 0,40	14,10 ± 0,83
Ca-Cu	15,40 ± 0,67	22,60 ± 1,52
Zn-Ca-Cu	15,89 ± 1,59	27,89 ± 2,74

Valores médios e desvios-padrão de 6 animais por tratamento.

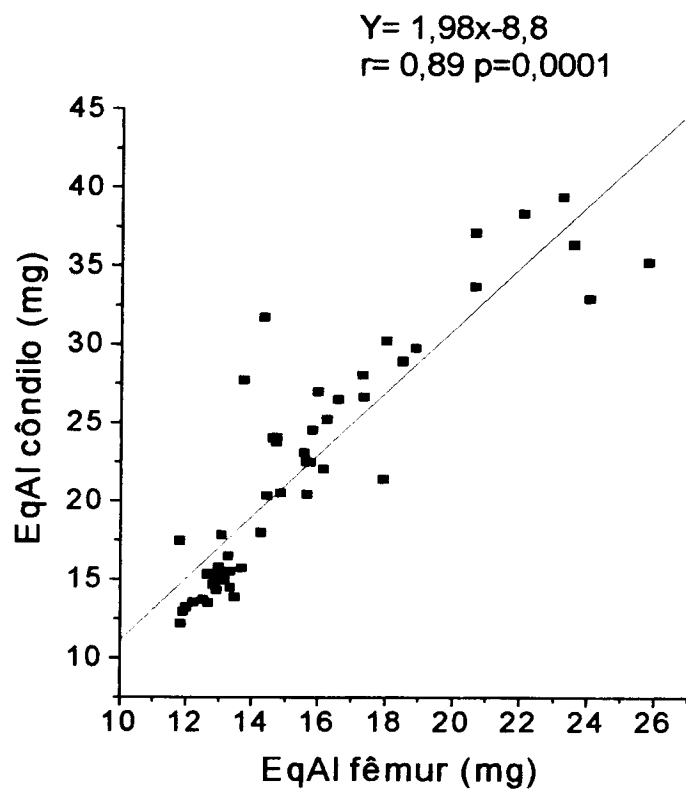


Figura 11. Regressão linear entre os equivalentes de massa de alumínio (EqAl) dos côndilos e fêmures dos animais submetidos aos diferentes tratamentos alimentares. Tratamentos iguais aos indicados na Tabela 16.

Nas Tabelas 17 a 20 apresentam-se os resultados obtidos com os Blocos A-D dos equivalentes de massa de alumínio para os fêmures (EqAl), podendo observar-se que para o Bloco A (Tabela 17) os EqAl aumentaram na medida em que melhora a qualidade da dieta, sendo o maior valor aquele obtido com a dieta de caseína.

Tabela 17. Equivalentes de massa de alumínio (EqAl) dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco A.

<i>Tratamento</i>	<i>EqAl fêmur (mg)</i>
Basal	12,88 ± 0,58 ^a
Ca-50	13,21 ± 1,46 ^b
Ca-100	15,63 ± 1,01 ^b
Comp	18,04 ± 1,74 ^c
Cas	23,23 ± 1,75 ^d

Valores médios e desvios-padrão de 6 animais por tratamento
Valores com letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Na Tabela 18 os resultados com o Bloco B mostraram que a presença de zinco nas dietas não contribuiu para uma melhora na densidade dos ossos expressa em EqAl, embora a presença de cálcio (tanto nas dietas Ca-100 e Comp) tenha resultado em aumento da mesma. No caso do Bloco C (Tabela 19) o acréscimo de cálcio nas dietas garantiu um incremento nos equivalentes de massa de alumínio, sendo o valor maior aquele obtido com a dieta Comp. É importante notar que estes resultados coincidiram com aqueles obtidos para a deposição de cálcio do mesmo Bloco (Tabela 9).

Tabela 18. Equivalentes de massa de alumínio (EqAl) dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco B

<i>Tratamento</i>	<i>EqAl fêmur (mg)</i>
Basal	12,88 ± 0,58 ^a
Zn-50	13,00 ± 0,40 ^a
Zn-100	13,14 ± 0,21 ^{ac}
Ca-50	13,21 ± 1,46 ^{ac}
Ca-100	15,63 ± 1,01 ^b
Zn-Ca	14,52 ± 0,82 ^c
Comp	18,04 ± 1,74 ^d

Valores médios e desvios-padrão de 6 animais por tratamento. Valores com letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 19. Equivalentes de massa de alumínio (EqAl) dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco C.

<i>Tratamento</i>	<i>EqAl fêmur (mg)</i>
Basal	12,88 ± 0,58 ^a
Ca-100	15,63 ± 1,01 ^b
Zn-Ca	14,52 ± 0,82 ^b
Ca-Cu	15,40 ± 0,67 ^b
Zn-Ca-Cu	15,89 ± 1,59 ^b
Comp	18,04 ± 1,74 ^c

Valores médios e desvios-padrão de 6 animais por tratamento. Valores com letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Para o Bloco D, (Tabela 20) o maior valor de EqAl foi observado com a dieta Comp, em concordância com o observado no teor de cinzas dos fêmures. Foi possível observar também que a introdução de Zinco e/ou cobre nas dietas não promoveu mudança substancial nos valores de EqAl dos fêmures dos animais com tais tratamentos quando comparados com a dieta Basal, situação que difere do que aconteceu com a introdução de cálcio na dieta.

Tabela 20. Equivalentes de massa de alumínio (EqAl) dos fêmures dos animais submetidos aos tratamentos do Bloco D.

<i>Tratamento</i>	<i>EqAl fêmur (mg)</i>
Basal	12,88 ± 0,58 ^a
Zn-100	13,14 ± 0,21 ^{ac}
Zn-Ca	14,52 ± 0,82 ^{bc}
Zn-Cu	13,00 ± 0,40 ^{ac}
Zn-Ca-Cu	15,89 ± 1,59 ^b
Comp	18,04 ± 1,74 ^d

Valores médios e desvios-padrão de 6 animais por tratamento. Valores com letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Finalmente pode-se observar que para todos os Blocos em que foram divididos os grupos experimentais existe uma correlação forte e positiva entre os equivalentes de massa de alumínio (EqAl) e os parâmetros peso e cinzas do fêmur (Fig. 12 a 15).

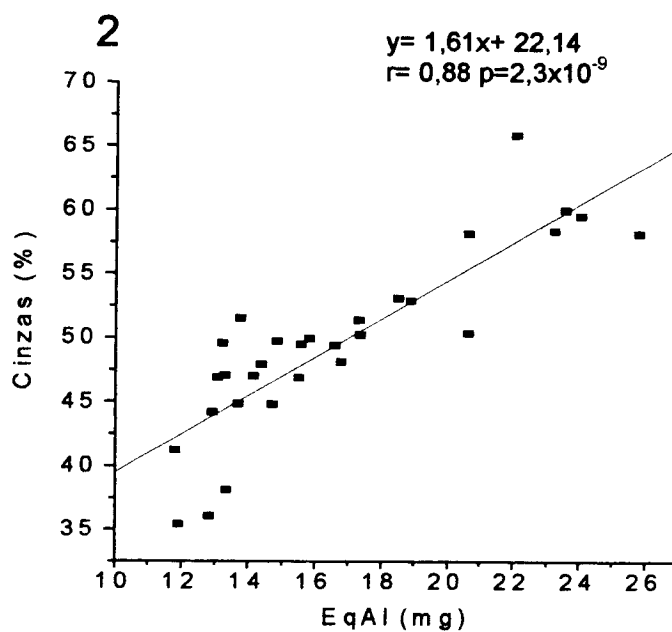
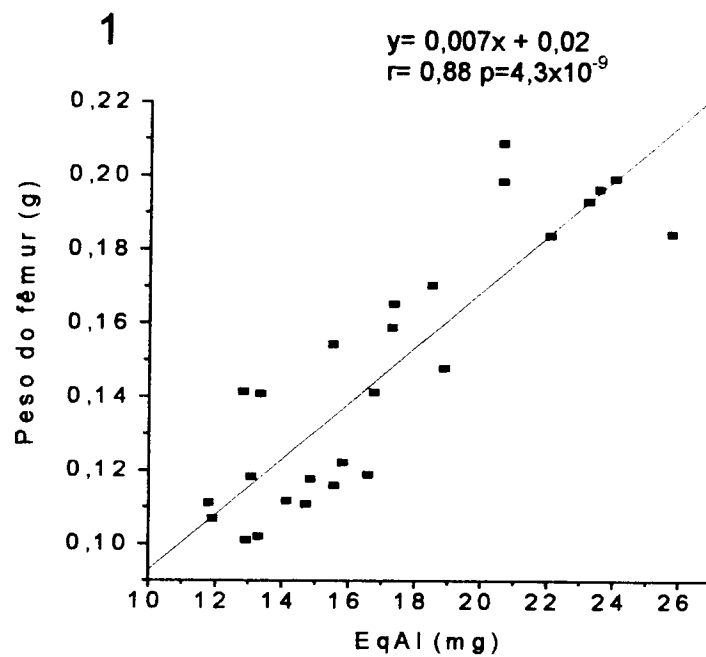


Figura 12. Regressões lineares entre equivalentes de massa de alumínio (EqAl) do Bloco A^a e os seguintes indicadores: 1: peso do fêmur (g). 2: conteúdo em cinzas do fêmur (%). ^aBloco A constituído pelos seguintes tratamentos: Basal; Ca-50; Ca-100; Comp; Cas.

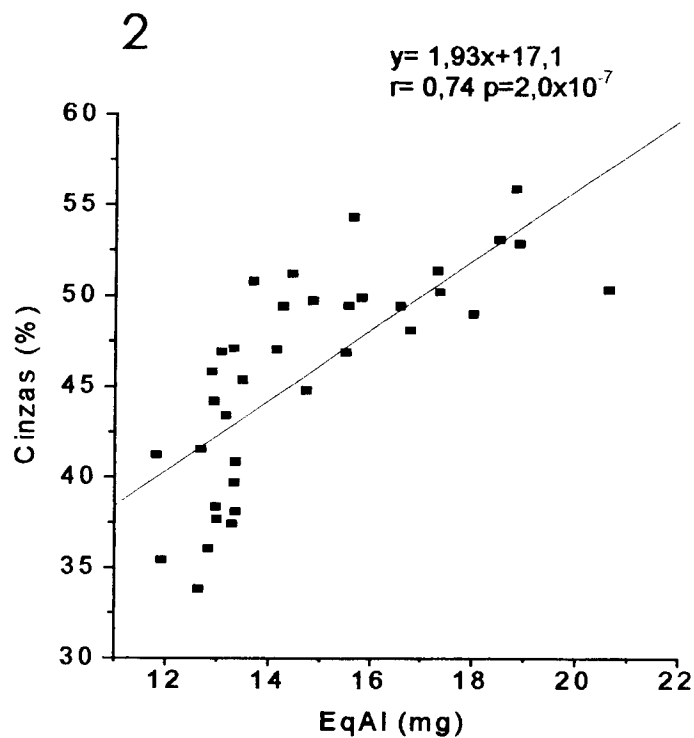
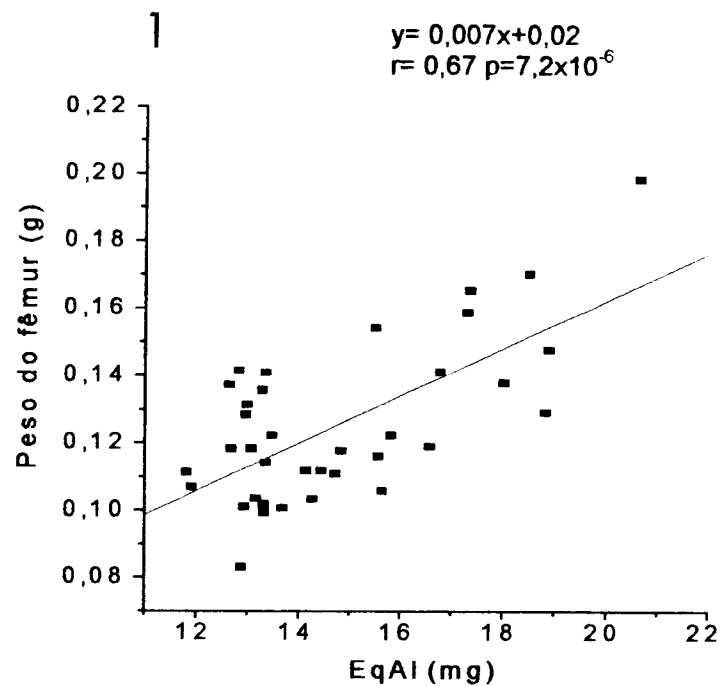


Figura 13. Regressões lineares entre equivalentes de massa de alumínio (EqAl) do Bloco B^a e os seguintes indicadores: 1: peso do fêmur (g). 2: conteúdo em cinzas do fêmur (%). ^a Bloco B constituído pelos seguintes tratamentos: Basal; Zn-50; Zn-100; Ca-50; Ca-100; Zn-Ca; Comp.

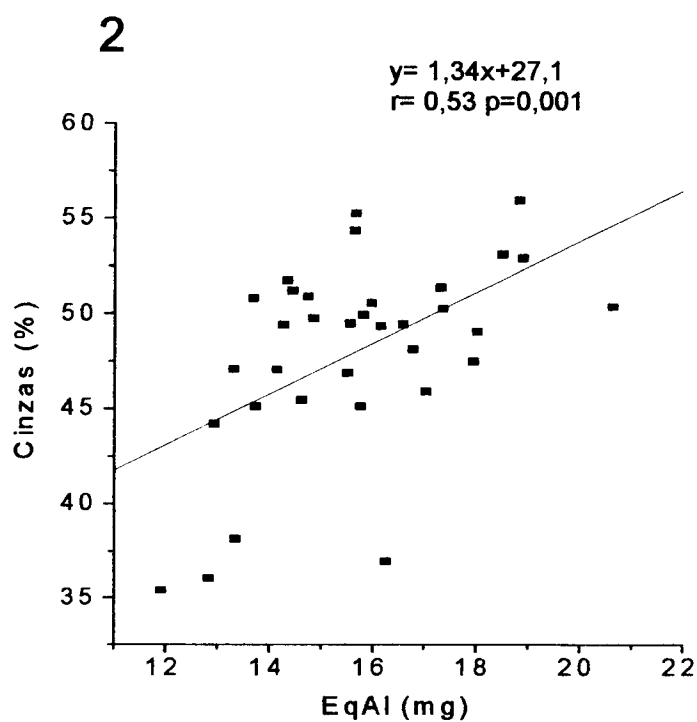
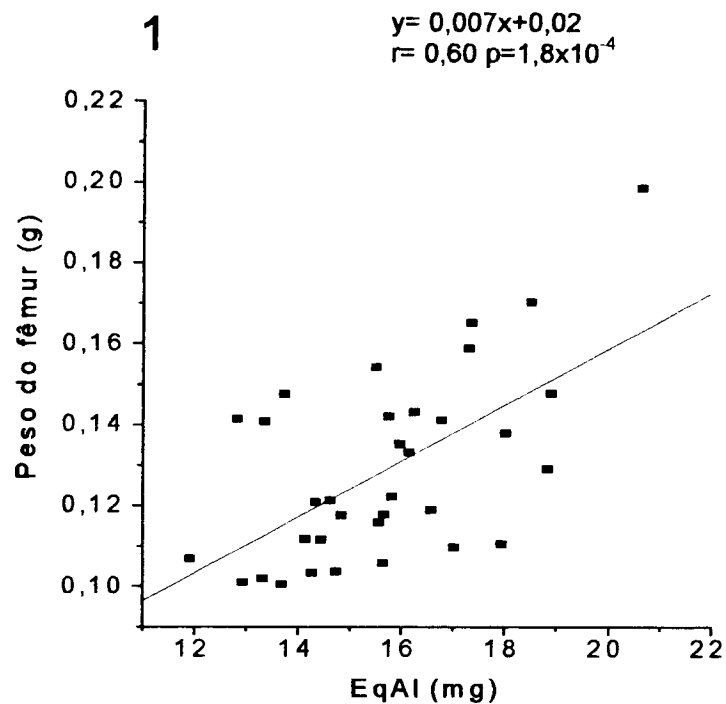


Figura 14. Regressões lineares entre equivalentes de massa de alumínio (EqAl) do Bloco C^a e os seguintes indicadores: 1: peso do fêmur (g) 2: conteúdo em cinzas do fêmur (%). ^a Bloco C constituído pelos seguintes tratamentos: Basal; Ca-100; Zn-Ca; Ca-Cu; Zn-Ca-Cu e Comp.

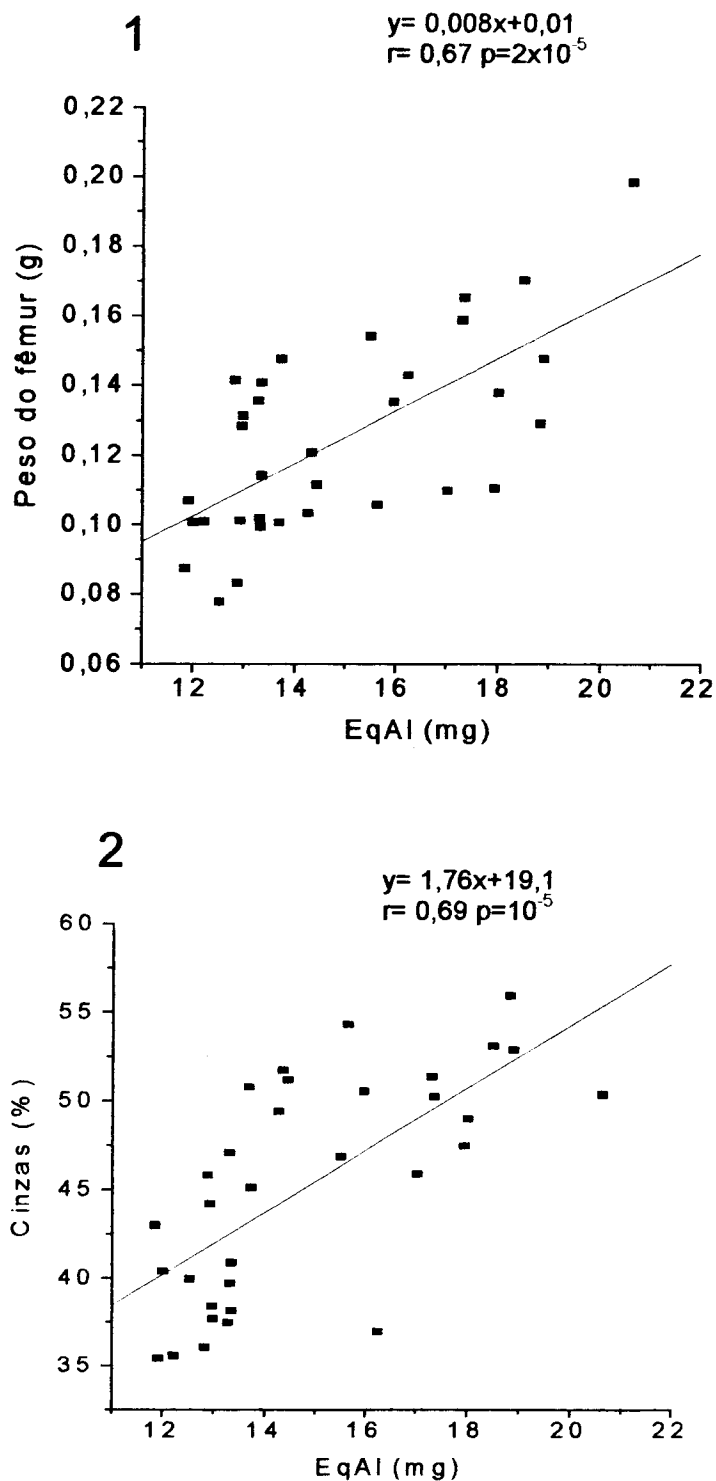


Figura 15. Regressões lineares entre equivalentes de massa de alumínio (EqAl) do Bloco D^a e os seguintes indicadores: **1:** peso do fêmur (g). **2:** conteúdo em cinzas do fêmur (%)^a Bloco D constituído pelos seguintes tratamentos: Basal; Zn-100; Zn-Ca; Zn-Cu; Zn-Ca-Cu; Comp.

Já para a deposição de cálcio, cobre, fósforo e zinco como pode ser visto nas Figuras 16 a19, as correlações entre os diferentes minerais também resultam positivas com a exceção do zinco que apresenta correlação positiva somente no Bloco A.

Ainda não dispondo de uma explicação para esse fato, é plausível afirmar que a mineralização do fêmur do rato em crescimento correlaciona com os valores arbitrários de EqAI, determinados através do processamento computadorizado da imagem radiográfica do osso.

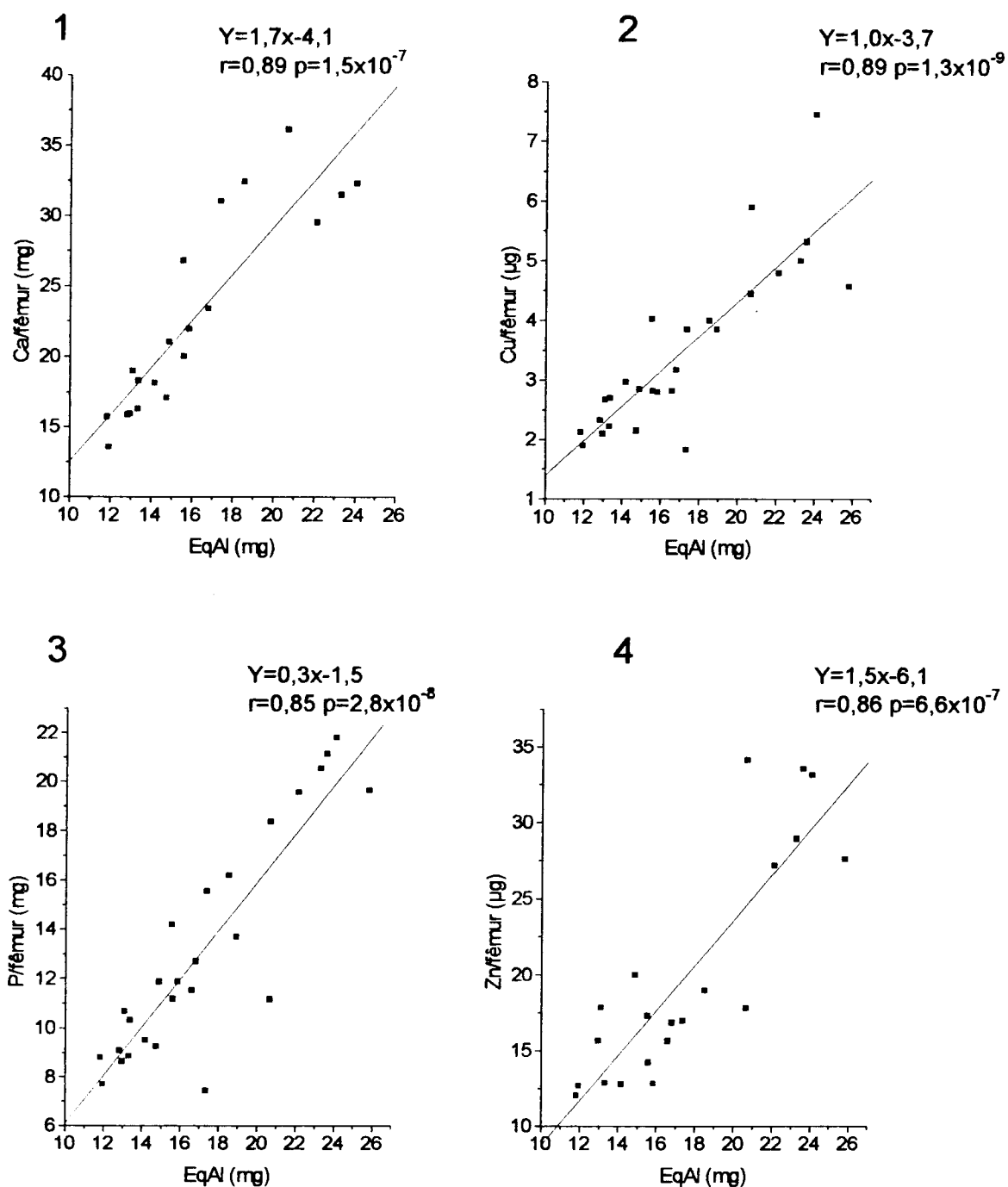


Figura 16. Regressões lineares entre equivalentes de massa de alumínio (EqAl) do Bloco A^a e o conteúdo dos seguintes minerais no fêmur: 1: cálcio (mg). 2: fósforo (mg). 3: cobre (µg). 4: zinco (µg). ^aBloco A: Basal; Ca-50; Ca-100; Comp e Cas.

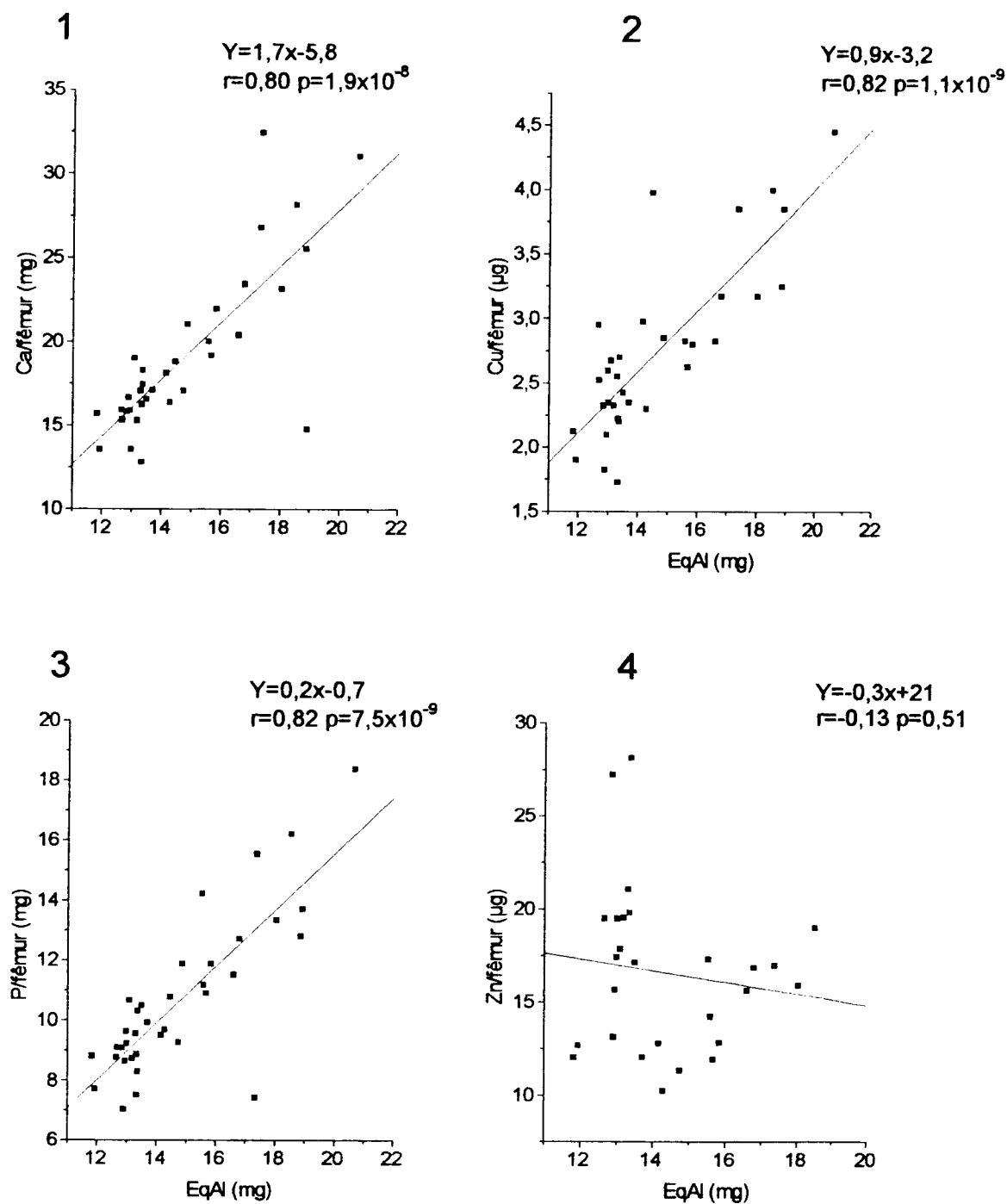


Figura 17. Regressões lineares entre equivalentes de massa de alumínio (EqAl) do Bloco B^a e conteúdo dos seguintes minerais no fêmur: 1: cálcio (mg). 2: fósforo (mg). 3: cobre (μg). 4: zinco (μg). ^aBloco B: Basal; Zn-50; Zn-100; Ca-50; Ca-100; Zn-Ca e Comp.

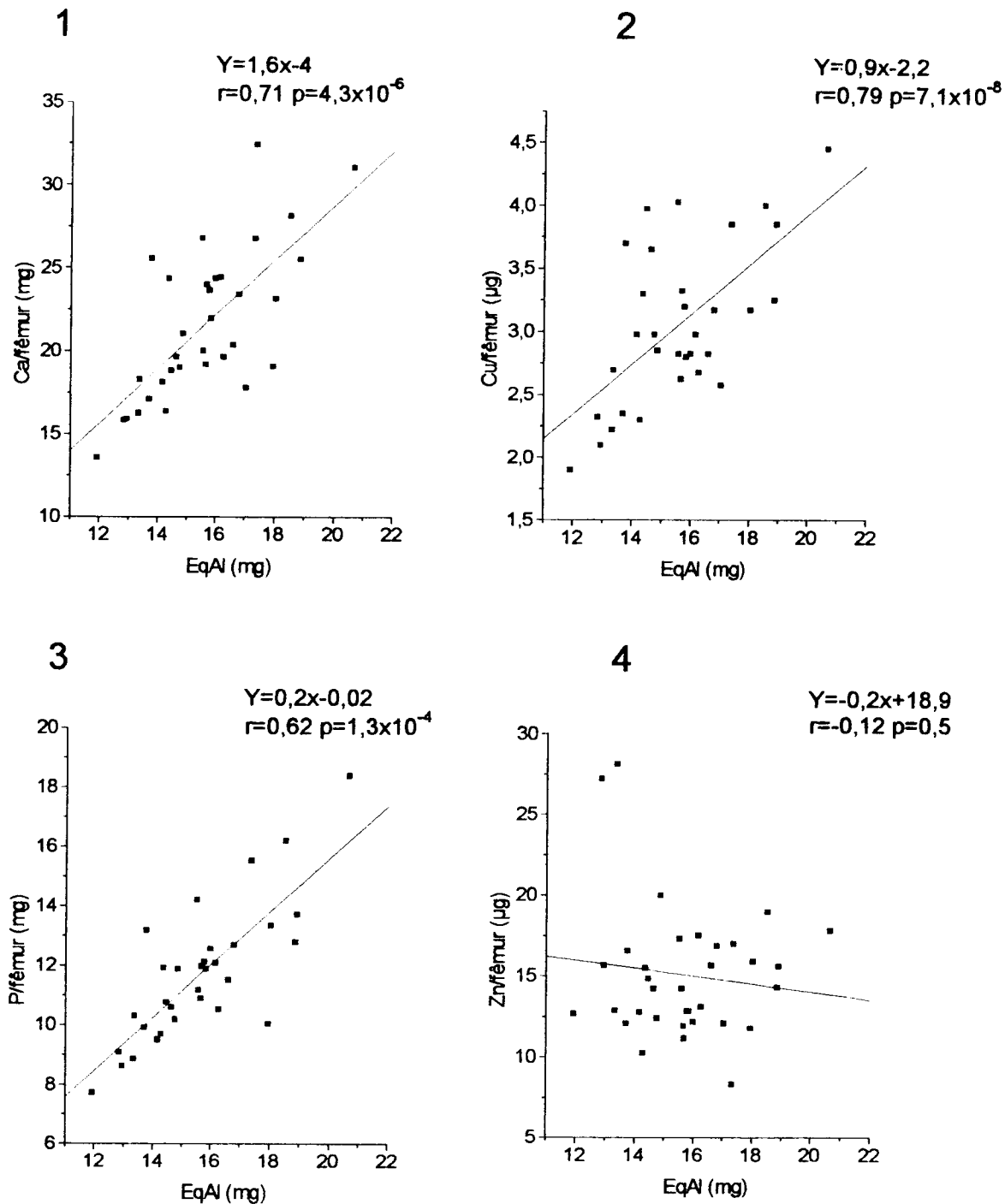


Figura 18. Regressões lineares entre equivalentes de massa de alumínio (EqAl) do Bloco C^a e o conteúdo dos seguintes minerais no fêmur: 1: cálcio (mg). 2: fósforo (mg). 3: cobre (μ g). 4: zinco (μ g). ^aBloco C: Basal; Ca-100; Zn-Ca; Ca-Cu; Zn-Ca-Cu e Comp.

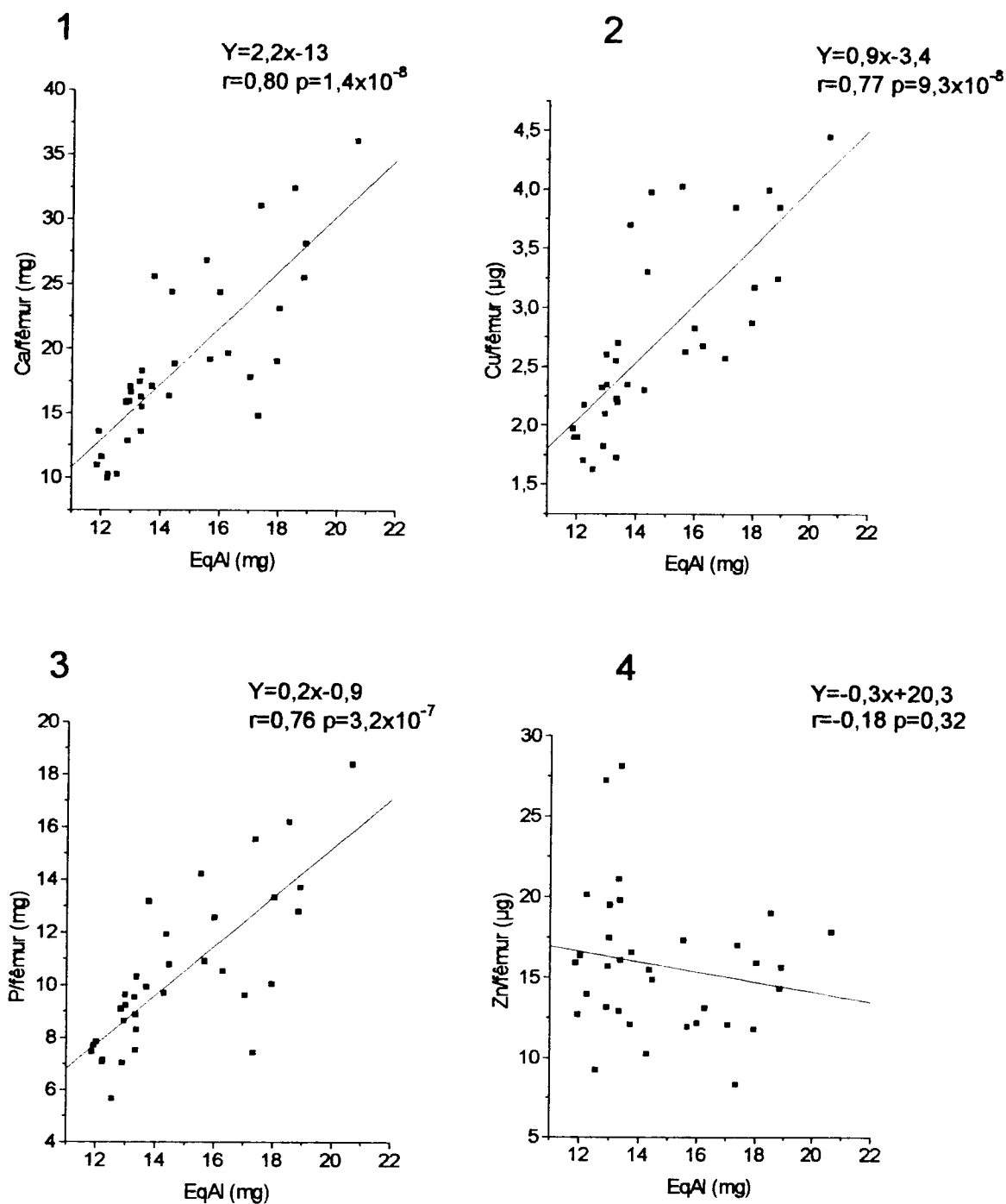


Figura 19. Regressões lineares entre equivalentes de massa de alumínio (EqAl) do Bloco D^a e o conteúdo dos seguintes minerais no fêmur: 1: cálcio (mg). 2: fósforo (mg). 3: cobre (µg). 4: zinco (µg). ^a Bloco D: Basal; Zn-100; Zn-Ca; Zn-Cu; Zn-Ca-Cu; Comp.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho, tomados em conjunto, permitem concluir:

- 1.- O consumo de dieta a base de farelo de arroz causa efeitos claramente prejudiciais ao crescimento e composição mineral do osso do rato.
- 2.- Tentativas de suplementar o farelo com cálcio ou cobre, ou os dois em combinação, resulta em detrimento ainda maior da qualidade do osso, inclusive com grande diminuição da relação Ca/P.
- 3.- Os parâmetros conteúdo de Ca, Cu, e P correlacionam bem com o teor total de cinzas do osso (excetuam-se as dietas enriquecidas com Ca e/ou Cu) mas não correlacionam com o conteúdo de Zn nem o ganho de peso corporal.
- 4.- A monitorização da deposição dos minerais em estudo no fêmur de ratos (zinco, cálcio, cobre e fósforo) constitui bom indicador da sua utilização.
- 5.- A avaliação da densidade óssea pela determinação do parâmetro indireto Equivalentes de Massa de Alumínio no fêmur pode ser realizada considerando a imagem do osso total ou apenas os côndilos, com segurança de 0,01 %. Por razão de maior facilidade de manipulação, pode se optar pela consideração do fêmur total.
- 6.- Os resultados destas experiências sugerem a adoção da técnica aqui apresentada como um meio para avaliar o “status” mineral do rato. Se usada em conjunto com outros indicadores nutricionais a mesma pode

permitir uma abordagem mais completa em estudos sobre valor nutritivo de alimentos e dietas, dado seu seu baixo custo, facilidade de execução, e a possibilidade de aplicação múltipla in vivo, por ser um método não invasivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAMS, S.A.; STUFF, J.E. Calcium metabolism in girls: current dietary intakes lead to low rates of calcium absorption and retention during puberty. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 60, n. 5, p. 739-743, Nov. 1994.
2. ADAYR, C. **Rice Chemistry and Technology**. Houston, D.F. ed. St. Paul, 1972. p. 1-13.
3. ÅKESSON, K.; GRYNPAS, M.; HANCOCK, R.; ODSELIUS, R.; OBRANT, K. Energy-dispersive X-ray microanalysis of the bone mineral content in human trabecular bone: A comparison with ICPES and neutron activation analysis. **Calcified Tissue International**, New York, v. 55, n. 3, p. 236-239, Sept. 1994.
4. ALLEN, L. H. Calcium bioavailability and absorption: a review. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 35, n. 4, p. 783-808, Apr. 1982.
5. AMAYA-FARFAN, J. Fatores que influem na formação e manutenção do osso. **Revista de Nutrição da Puccamp**, Campinas, v. 7, n.2, p. 148-172, Jul/Dez. 1994.
6. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods**. 8th ed. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, 1983.

7. AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 107, n. 2, p. 1340-1348, Feb. 1977.
8. ANDERSON, G.; DRAPER, H. Effect of dietary phosphorus on calcium metabolism in intact and parathyroidectomized adult rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 102, n. 8, p. 1123-1132, Aug. 1972.
9. ARNAUD, C.D.; SANCHEZ, S.D. Calcium and phosphorus. In: BROWN, M.L. (ed.). **Present knowledge in nutrition**. 6. ed. Washington, DC.: Nutrition Foundation, 1990. p. 212-223. (International Life Sciences Institute).
10. ASP, N-G., JOHANSSON, C-G., HALLMER, H., SILJESTROM, M. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Bethesda, v. 31, n. 3, p. 476-482, May/June 1983.
11. BARBER, S. Nuevas perspectivas en el aprovechamiento del salvado de arroz. **Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v. 11, n. 2, p. 181-186, Jun. 1971.
12. _____; BENEDITO DE BARBER, C. Salvados de arroz. Factores que influyen en su composición y características. I. El proceso de elaboración. **Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v.13, n. 4, p. 501-508, Dic. 1973.
13. _____; _____; FLORES, M.J.; MONTES, J.J. Constituyentes tóxicos del salvado de arroz. I. Actividad de inhibidores de tripsina del salvado crudo y tratado térmicamente. **Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v. 18, n. 1, p. 80-88, Mar. 1978.

14. _____; _____. Rice bran : chemistry and technology. In: LUH, B.H. **Rice: production and utilization**. Westport, AVI Publishing Company, 1980. p.790-862.
15. BARNETT, E.; NORDIN, B.E. The radiological diagnosis of osteoporosis: a new approach. **Clinical Radiology**, Bristol, v. 11, p. 166-74, 1960.
16. BAXTER, J.H. Bone disorder in copper-deficient puppies. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 167, p. 766, 1951.
17. BELL, R.; TZENG, D.; DRAPER, H. Long-term effects of calcium, phosphorus and forced exercise on the bones of mature mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 110, n. 1, p. 42-50, Jan. 1980.
18. BENEDITO DE BARBER, C.; BARBER, S. Constituyentes tóxicos del salvado de arroz. II. Actividad hemaglutinante del salvado crudo y tratado térmicamente. **Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v. 18, n. 1, p. 89-94, Mar. 1978.
19. BLIGH, E.G. ; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, Aug. 1959
20. BRONNER, F. Calcium and osteoporosis. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 60, n. 6, p.831-836, Dec. 1994.
21. BROWN, E. D.; CHAN, W.; SMITH, J.C. Jr. Bone mineralization during a developing zinc deficiency. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 157, p. 211-214, 1978.

22. CALHOUN, N.; SMITH, C. Jr.; BECKER, K. The role of zinc in bone metabolism. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Los Angeles, v. 103, p. 212-234, Sept. 1974.
23. CALVO, M.S. Dietary phosphorus, calcium metabolism and bone. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, n. 9, p. 1627-1633, Sept. 1993.
24. CARNES, W.H. Role of copper in connective tissue metabolism. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 30, p. 995-1000, 1971.
25. CASEZ, J.P.; MUEHLBAUER, R.C.; LIPPUNER, K.; KELLY, T.; FLEISCH, H.; JAEGER, P. Dual-energy X-ray absorptiometry for measuring total bone mineral content in the rat: study of accuracy and precision. **Bone Mineral**. v. 26, n. 1, p. 61-68, 1994
26. CHAMPAGNE, E.T.; RAO, R.M.; LIUZZO, J.A.; ROBINSON, I.W.; GALE, R.J.; MILLER, F. The interactions of minerals, proteins, and phytic acid in rice bran. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 62, n. 4, p. 231-238, July/Aug. 1985.
27. CHAN, G.M. Dietary calcium and bone mineral status of children and adolescents. **American Journal of Diseases of Children**, Chicago, v. 145, n. 6, p. 631-634, June 1991.
28. CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 13, n. 4, p. 297-335, Dez. 1980.
29. CLARKE, H.E.; COATES, M.E.; EVA, J.K.; FORD, D.J.; MILNER, C.K.; O'DONOGHUE, P.N.; SCOTT, P.P.; WARD, R.J. Dietary standards for laboratory animals: report of the Laboratory Animals Centre Diets

Advisory Committee. **Laboratory animals**, Theydon Bois/England, v. 11, n. 1, p. 1-28. Jan. 1977.

30. COLHOUN, N.; McDANIEL, E.; HOWARD, M.; SMITH, J. Loss of zinc from bone during deficient state. **Nutrition Reports International**, Los Altos, v. 17, p. 299-306, 1978.
31. COUSINS, R. J. Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. **Physiology Research**, v. 65, p. 238-309. 1985.
32. DANFORD, D.E. Clinical aspects of trace elements. In: CHAZOT, G.; ABDULL, M.; ARNAUD, P. ed. **Current trends in trace elements research**. Proceedings of the International Symposium (Paris, 1986). Smith- Gordon London, 1989. p.173-179.
33. DAVIES, N.; NIGHTINGALE, R. The effects of phytate on intestinal absorption and secretion of zinc and whole-body retention of zinc, copper, iron and manganese in rats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 34, n. 2, p. 243-258, Sept. 1975.
34. DRAPER, H.; SIE, T.; BERGAN, J.G. Osteoporosis in aging rats induced by high phosphorus diets. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 102, n. 9, p. 1133-1141, Sept. 1972.
35. DREWS, J.M.; KIES, C.; FOX, H.M. Effect of dietary fiber on copper, zinc, and magnesium utilization by adolescent boys. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 32, n. 9, p. 1893-1897, Sept. 1979.

36. EBISUNO, S.; MORIMOTO, S.; YASUKAWA, S.; OHKAWA, T. Results of long-term rice bran treatment on stone recurrence in hypercalciuric patients. **British Journal of Urology**, Edinburgh, v. 67, p. 237, 1991.
37. ELLIS, R.; KELSAY, J. L.; REYNOLDS, R. D.; MORRIS, E. R.; MOSER, P. B.; FRAZIER, C. W. Phytate:zinc and phytate x calcium:zinc millimolar ratios in self-selected diets of Americans, Asian Indians, and Nepalese. **Journal of the American Dietetic Association**, St. Paul, v.87, n.8, p.1043-1047, Aug. 1987.
38. ERDMAN, J.W. Oilseed phytates : Nutritional implications. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 56, n. 8, p. 736-741, Aug. 1979.
39. _____; PONEROS SCHZNEIER, A. Phytic acid interactions with divalent cations in food and in the gastrointestinal tract. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 249, p. 161-171, 1989.
40. EVANS, W. F. **Anatomy and physiology**. 2. ed. New Yersey. Prentice-Hall, INC, 1976. p. 47-89.
41. FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; FOX, T.E.; WHARF, S.G.; EAGLES, J.; KENNEDY, H. Zinc absorption in adult men from a chicken sandwich made with white or wholemeal bread, measured by a double-label stable-isotope technique. **British Journal of Nutrition** , Cambridge, v. 67, n. 3, p. 411-419, May 1992.
42. FERRETI, R.J. ; LEVANDER, O.A. Effect of milling and processing on the selenium content of grains and cereal products. **Journal of**

Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 22, n. 6,
p. 1049-1051, Nov/Dec. 1974.

43. FESTA, M.D.; ANDERSON, H.L.; DOWDY, R.P.; ELLERSIECK, M.R.
Effect of zinc intake on copper excretion and retention in men.
American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda, v. 41, n. 2,
p. 285-292, Feb. 1985.
44. FIELDS, M.; HOLBROOK, J.; SCHOLFIELD, D.; SMITH, J. Jr.; REISER, S.
Effects of fructose or starch on copper-67 absorption and excretion by
the rat. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 116, n. 4, p. 625-632, April.
1986.
45. FISHER, P.; GIROUX, A.; L'ABEE, M. The effect of dietary zinc on intestinal
copper absorption. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda,
v. 34, n. 8, p. 1670-1675, Aug. 1981.
46. FORBES, R.M. Nutritional interactions of zinc and calcium. **Federation
Proceedings**, Bethesda, v. 19, p. 643, 1960.
47. _____. Mineral utilization in the rat. III. Effect of calcium, phosphorus,
lactose and source of protein in zinc-deficient and in zinc-adequate
diets. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 83, n. 2, p. 225, Feb. 1964.
48. _____. ERDMAN, J.W.; PARKER, H.M.; KONDO, H.; KETELSON,
S.M. Bioavailability of zinc in coagulated soy protein (tofu) to rats and
effect of dietary calcium at a constant phytate:zinc ratio. **Journal of
Nutrition**, Bethesda, v. 113, N. 1, p. 205-210, Jan. 1983.
49. _____. PARKER, H. M., ERDMAN, J. W., Effect of dietary phytate,
calcium and magnesium levels on zinc bioavailability to rats. **Journal
of Nutrition**, Bethesda, v. 114, n. 8, p. 1421, Aug. 1984.

50. FORDYCE, E.J.; FORBES, R.M.; ROBBINS, K.R., ERDMAN, J.W. Phytate X calcium/zinc molar ratios: are they predictive of zinc bioavailability? **Journal of Food Science**, Chicago, v. 52, n. 2, p. 440-444, Mar/Apr. 1987.
51. FRANZ, K. B.; KENNEDY, B.M.; FELERS, D.A. Relative bioavailability of zinc using weight gain of rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.110, n. 11, p. 2263-2271, Feb. 1980a.
52. _____; _____; _____. Relative bioavailability of zinc from selected cereals and legumes using rat growth. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 110, n. 11, p. 2272-2283, Nov. 1980b.
53. FRØLICH, W.; ASP, N-G. Mineral and phytate in the analysis of dietary fiber from cereals. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 62, n. 4, p. 238-242, July/Aug. 1985.
54. GIUGLIANO, R.; MILLWARD, D.J. Growth and zinc homeostasis in the severely Zn deficient rat. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 52, n. 3, p. 545-560, Nov. 1984.
55. GREGER, J.; ZAIKIS, S.; ABERNATHY, R.; BENNETT, O.; HUFFMAN, J. Zinc, nitrogen, copper, iron and manganese balance in adolescent females fed two levels of zinc. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 108, n. 9, p. 1449-1456, Sept. 1978.
56. GUERRA, M.J.; JAFFÉ, W.G. Estudios nutricionales en salvado de arroz. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 25, n. 4, p. 401-417, Dic. 1975.

57. GUO, M.; NOPAKUN, J.; MESSER, H.; OPHAUG, R.; SINGER, L. Retention of skeletal fluoride during bone turnover in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 118, n. 3, p. 362-366, Mar. 1988.
58. GUYTON, A. C. Fisiologia Básica. Rio de Janeiro, Interamericana Ltda., 2 ed., 1978, 636 p.
59. HALL, A.C.; YOUNG, B.W.; BREMNER, Y. Intestinal metallothionein and the mutual antagonism between copper and zinc in the rat. **Journal of Inorganic Biochemistry**, London, v. 11, p. 66-67, 1979.
60. HAMBIDGE, M.; CASEY, C.; KREBS, N. Zinc. In: **Trace elements in human and animal nutrition**. 5 de. Walter Mertz ed. 1986. Academic Press INC, Orlando, Florida.
61. HAN, O.; FAILLA, M.; HILL, A.D.; MORRIS, E.; SMITH, J.C. Jr. Inositol phosphates inhibit uptake and transport of iron and zinc by a human intestinal cell line. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, n. 4, p. 580-587, Aprl. 1994.
62. HARLAND, B.; FELIX-PHIPPS, R.; KNIGHT, E.; OKE, O.; ADKINS, J. Effect of calcium and zinc status in rats fed phytate-reduced triticale breads. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 46, p. 600, 1987.
63. _____; OBERLEAS, D. A modified method for phytate analysis using an ion-exchange procedure: application to textured vegetable proteins. **Cereal Chemistry**, St Paul, v. 54, n. 4, p. 827-832, July/Aug. 1977.

64. HEANEY, R.P. Calcium intake in the osteoporotic fracture context: introduction. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 54, n. 1, p. 242S-244S, July 1991.
65. _____; WEAVER, C.; FITZSIMMONS, M. Soybean phytate content: effect on calcium absorption. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 53, n. 3, p. 745-747, Mar. 1991.
66. HURLEY, L.; SWENERTON, H. Lack of mobilization of bone and liver zinc under teratogenic conditions of zinc deficiency in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 101, n. 6, p. 597-604, June 1971.
67. JAHNEN, A.; HEYNCK, H.; GERTZ, B.; CLABEN, A.; HESSES, A. Dietary fibre: the effectiveness of a high bran intake in reducing renal calcium excretion. **Urology Research**, v. 20, n. 1, p. 3, Jan. 1992.
68. JULIANO, B.O. Properties of rice caryopsis. In: LUH, B.H. **Rice: production and utilization**. Westport, AVI Publishing Company, 1980. p. 403-438.
69. KAHN, T.; SAUNDERS, R.; CHOW, F.; CHIU, M.; BETSCHART, A.A. Effect of rice bran and oat bran on plasma cholesterol in hamsters. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 34, n. 9, p. 768, Nov. 1989.
70. _____; _____; _____; _____; _____. Influence of rice bran, oat bran, and wheat bran on cholesterol and triglycerides in hamsters. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 67, n.5, p. 439-443, Sept/Oct. 1990.
71. _____; _____; SAYRE, R. N.; CHOW, F. I.; CHIU, M. M.; BETSCHART, A.A. Cholesterol lowering effects of rice bran and rice

bran oil fractions in hypercholesterolemic hamsters. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 69, n. 5, p. 485-489, Sept/Oct. 1992.

72. _____; CHOW, F.I.; SAYRE, R.N. Cholesterol-Lowering properties of rice bran. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 39, n. 2, p. 99-103, Feb. 1994.
73. KAKADE, M.L.; SIMONS, N.; LIENER, I.E. An evaluation of natural vs synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 46, n. 5, p. 518-526, Sept. 1969.
74. KELSAY, J.L. A review of research on effects of fiber intake on man. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 31, n. 1, p. 142-159, Jan. 1978.
75. KYRBY, R.W.; ANDERSON, J.W.; SIELING, B.; REES, E.D.; CHEN, W.J.L.; MILLER, R.E.; KAY, R.M. Oat bran intake selectively lowers serum low-density lipoprotein cholesterol concentrations of hypercholesterolemic men. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 34, n. 5, p. 824-829, May 1981.
76. KOH, E.T.; REISER, S.; FIELDS, M.; SCHOLFIELD, D. Copper status in the rat is affected by modes of copper delivery. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 119, n. 3, p. 453-457, Mar. 1989.
77. KRISHNARAO, G.; DRAPER, H. Influence of dietary phosphate on bone resorption in senescent mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 102, n. 9, p. 1143-1146, Sept. 1972.

78. LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 5, p. 1313-1315. Sept/Oct. 1980.
79. LEE, D.B; SCHROEDER, J.J.; HESS, R.L.; GORDON, D.T. Interaction of phytic acid and zinc on intestinal metallothionein levels and Cu bioavailability. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 44, p. 1674, 1985.
80. LINHARES, E.D.; ROUND, J.M.; JONES, D.A. Growth, bone maturation, and biochemical changes in Brazilian children from two different socioeconomic groups. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 44, n. 4, p. 552-558, Apr. 1986.
81. MADDAIAH, V.; KURNIC, A.; REID, B. Phytic acid studies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 115, p. 391, 1964.
82. MAGEE, A.C.; MATRONE, G. Studies on growth, copper metabolism and iron metabolism of rats fed high levels of zinc. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 72, n. 2, p. 233-242, Feb. 1960.
83. MASSEY, L. K. Dietary factors influencing calcium and bone metabolism: introduction. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, n. 9, p. 1609-1610, Sept. 1993.
84. MASTERS, D.; KEEN, C.; LONNERDAL, B.; HURLEY, L. Release of zinc from maternal tissues during zinc deficiency or simultaneous zinc and calcium deficiency in the pregnant rat. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 116, n. 11, p. 2148-2154, Nov. 1986.

85. MATROVIC, V.; KOSTIAL, K.; SIMONOVIC, C.; BUZINA, R.; BRODAREC, A.; NORDIN, B. Bone status and fracture rates in two regions of Yugoslavia. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 32, n. 3, p. 540-549, Mar. 1979.
86. _____; FONTANA, D.; TOMINAC, C.; GOEL, P.; CHESNUT, CH. Factors that influence peak bone mass formation: a study of calcium balance and the inheritance of bone mass in adolescent females. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 52, n. 5, p. 878-888, Nov. 1990.
87. McCALL, E.R.; JURGENS, J.F.; HOFFPAUIR, C.L.; PONS, W.A.; STARK, S.M.; CUCULLU, A.F.; HEINZELMAN, D.C.; CIRINO, V.O.; MURRAY, M.D. Composition of rice. Influence of variety and enviroment on physical and chemical composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 1, n. 16, p. 988-993, Oct. 1953.
88. MENUIER, D.J. Assessment of bone turnover by histomorphometry in osteoporosis. In: **Osteoporosis, etiology, diagnosis, and management**. (Riggs, B.L. & Melton, J.L. III, eds.), p. 317-330. Raven Press, New York, NY. 1988.
89. MILLS, C. F. The physiological roles of copper. **Food Chemistry**, Barking, v. 43, n. 3, p. 239-240, Mar. 1992.
90. MOMCILOVIC, B.; BELONJE, B.; GIROUX, A.; SHAH, B.G. Total femur zinc as a parameter of choice for a zinc bioassay in rats. **Nutrition Reports International**, Los Altos, v. 12, p. 197-203, 1975.

91. MORRIS, E.R.; ELLIS, R. Effect of dietary phytate/zinc molar ratio on growth and bone zinc response of rats fed semipurified diets. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.110, n. 5, p.1037-1045, May 1980.
92. MUNIR, G.A. **Desenvolvimento de um sistema para avaliação de conteúdo mineral ósseo**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Física. Universidade de São Paulo. São Paulo, 89 p. 1989.
93. MURRAY, E.; MESSER, H. Turnover of bone during normal and accelerated bone loss in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 111, n. 9, p. 1641-1647, Sept. 1981.
94. NOGARA, C.D. **Farelo de arroz como suplemento alimentar. Avaliação da ação sobre insulin-like growth factor-I e oligoelementos**. Tese de Mestrado. Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994. 82p.
95. OBERLEAS, K.; MUHRER, M.; O'DELL, B. Dietary metal-complexing agents and zinc availability in the rat. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 90, n. 1, p. 56-62, Jan. 1966.
96. OBERLEAS, O.; HARLAND, B. Phytate content of foods: effect on dietary zinc bioavailability. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 79, n. 4, p. 433-436, Oct. 1981.
97. OESTREICHER, P.; COUSINS, R.J. Copper and zinc absorption in the rat: mechanism of mutual antagonism. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 115, n. 2, p. 159-166, Feb. 1985.
98. OHKAWA, T., EBISUNO, S., KITAGAWA, M., MORIMOTO, S., MIYAZAKI, Y.; YASUKAWA, S. Rice bran treatment for patients with hypercalciuric

stones: experimental and clinical studies. **Journal of Urology**. v. 132, n. 1, p. 1140-1145, Jan. 1984.

99. OMI, N.; MORIKAWA, N.; EZAWA, I. The effect of spiny lobster shell powder metabolism in ovariectomized osteoporotic model rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 38, n. 6, p. 555-563, Dec. 1992.
100. O'NEIL-CUTTING, M.A.; BOMFORD, A.; MUNRO, H.N. Effect of excess dietary zinc on tissue storage of iron in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 111, n. 11, p. 1969-1979, Nov. 1981.
101. OSTEOMETER SVERIGE AB. Techniques for measuring bone density. <http://www.osteometer.se/felen.html>, 1995.
102. PETERSON, C.; EURELL, J.; ERDMAN, J. Bone composition and histology of young growing rats fed diets of varied calcium bioavailability: spinach, nonfat dry milk, or calcium carbonate added to casein. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 122, n. 1, p. 137-144, Jan. 1992.
103. _____; _____; _____. Alterations in calcium intake on peak bone mass in the female rat. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, p. 81-95. 1995.
104. PORTALE, A.; HALLORAN, B.; MURPHY, M.; MORRIS, R. Jr. Oral intake of phosphorus can determine the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D by determining its production rate in humans. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 77, p. 7-12, 1986.
105. _____; _____; MORRIS, R. Jr. Dietary intake of phosphorus modulates the circadian rhythm in serum concentration of phosphorus.

Journal of Clinical Investigation, New York, v. 80, p. 1147-1154, 1987.

106. _____; _____; _____. Physiologic regulation of the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D by phosphorus in normal men. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 83, p.1494-1499, 1989.
107. PRASAD, A. S.; HALSTED, J.; NADIMI, M. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism, and geophagia. **American Journal of Medicine**, New York, v. 31, n. 4, p. 532-546, Oct. 1961.
108. _____; MIALE, A. Jr.; FARID, Z.; SCHULERT, A.; SANDSTEAD, H. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hypogonadism, and dwarfism. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 537-549, 1963a.
109. _____; _____; _____; SANDSTEAD, H.; SCHULERT, A.; DARBY, W. Biochemical studies on dwarfism, hypogonadism and anemia. **Arch. Intern. Med.** v. 111, p. 407-428, 1963b.
110. _____. Zinc in growth and development and diagnostic aspects of human zinc deficiency. In: CHAZOT, G.; ABDULL, M.; ARNAUD, P. ed. **Current trends in trace elements research**. Proceedings of the International Symposium (Paris, 1986). Smith-Gordon, London, 1989. p. 162-168.
111. PRENTICE, A., PARSONS, J.; COLE, T. Uncritical use of bone mineral density in absorptiometry may lead to size-related artifacts in the

identification of bone mineral determinants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 60, n. 6, p. 837-842, Dec. 1994.

- 112.PRIMO, E.; BARBER, S.; TORTOSA, E.; CAMACHO, J.; ULLDEMOLIUS, J.; JIMENEZ, A.; VEGA, R. Composición química del arroz. V. Subproductos obtenidos en las diferentes etapas del diagrama de elaboración. **Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v. 10, n. 2, p. 244-257, Jun. 1970.
- 113.RANHOTRA, G.S.; LOEWE, R.J.; PUYAT, L.V. Effect of dietary phytic acid on the availability of iron and phosphorus. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 51, n. 3, p. 323-329, May/June 1974.
- 114.REDDY, N.R.; PIERSON, M.D.; SATHE, S.K.; SALUNKE, D.K. **Phytates in cereals and legumes**. CRC Press, Boca Raton, 1989. p.57-70.
- 115.REINHOLD, J.; NASR, K.; LAHIMGARZADEH, A.; HEDAYATI, H. Effects of purified phytate and phytate-rich bread upon metabolism of zinc, calcium, phosphorus, and nitrogen in man. **Lancet**, London, v. 1, p. 283, 1973.
- 116.ROOT, A.W. Effects of undernutrition on skeletal development, maturation, and growth. In: SIMMONS, D.J. (ed.) **Nutrition and bone development**. New York: Oxford University Press, 1990. p. 114-130.
- 117.ROUANET, J.M.; LAURENT, C.; BESANÇON, P. Rice bran and wheat bran: selective effect on plasma and liver cholesterol in high cholesterol fed rats. **Food Chemistry**, Barking, v. 47, n. 1, p. 67-71, May 1993.

- 118.SAHA, S. Skeletal biomechanics and aging. In: SIMMONS, D.J. (ed.). **Nutrition and bone development**. New York: Oxford University Press, 1990. p. 37-52.
- 119.SANDERS, M.; ALBRIGHT, J. In: Albright, J.A., Brand, R.A. (eds). **The Scientific Basis of Orthopaedics**. Norwalk, Conn: Appleton & Lange, p. 267. 1987.
- 120.SANDLER, R.B.; SLEMENDA, C.W.; LaPORTE, R.E. Post-menopausal bone density and milk consumption in childhood and adolescence. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 42, n. 3, p. 279-274, Mar. 1985.
- 121.SANDSTEAD, H.H. Zinc deficiency. **American Journal of Diseases of Children**, Chicago, v. 145, n. 8, p. 853-859, Aug. 1991.
- 122.SAUNDERS, R.M. The properties of rice bran as a foodstuff. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 35, n. 7, p. 632-636, July 1990.
- 123.SCHINNICK, F.L.; LONGACRE, M.J.; INK, S.L.; MARLETT, J.A. Oat fiber: composition versus physiological functions in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 118, n. 2, p. 144-151, Feb. 1988.
- 124.SCHRYVER, H. HINTZ, H.; CRAIG, P. Calcium metabolism in ponies fed a high phosphorus diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 101, n. 2, p. 259-264, Feb. 1971.
- 125.SGARBIERI, V.C. **Alimentação e Nutrição: Fator de saúde e desenvolvimento**. Campinas: Editora da UNICAMP; São Paulo: Almed, 1987. 387 p.

126. SHAH, B.G.; MALCOLM, S.; BELONJE, B.; TRICK, K.D.; BRASSARD, R.; MONGEAU, R. Effect of dietary cereal brans on the metabolism of trace elements in a long-term rat study. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 68, n. 2, p. 190-194, Mar/Apr. 1991.
127. SHERMAN, A.R.; TISSUE, N.T. Tissue iron, copper and zinc levels in offspring of iron-sufficient and iron-deficient rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 111, n. 2, p. 266-275, Feb. 1981.
128. SIEGEL, R.; PINELL, S.; MARTIN, G. Crosslinking of collagen and elastin: properties of lysyl oxidase. **Biochemistry**, New York, v. 9, p. 4486-4490, 1970.
129. SLAVIN, J.L.; LAMPE, J.W. Health benefits of rice bran in human nutrition. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 37, n. 10, p. 760-763, Oct. 1992.
130. SOLOMONS, N.; JACOB, R.; PINEDA, O.; VITERI, F. Studies on the bioavailability of zinc in man, II: absorption of zinc from organic and inorganic sources. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 94, n. 2, p. 335-343, Aug. 1979.
131. SOWERS, M.F.; WALLACE, R.B.; LEMKE, J.H. Correlates of forearm bone mass among women during maximal bone mineralization. **Preventive Medicine**, San Diego, v. 14, p. 585-596, 1985.
132. _____. Osteoporosis and osteomalacia. In: BROWN, M.L (ed.). **Present knowledge in nutrition**. 6 de. Washington, DC: Nutrition Foundation, 1990. p. 371-376. (International Life Sciences Institute).

133. STASSE, M.; HAUTVAST, J.G.; HERMUS, J.J.; KATAN, M.B.; BAUSCH, J.E.; RIETBERG-BRUSSAARD, H.; VELEMA, J.P.; ZONDERVAN, H.; EASTWOOD, M.A.; GORDON BRYDON, W. Effects of natural high-fiber diet on serum lipids, fecal lipids, and colonic function. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 32, n. 9, p. 1881-1888, Sept. 1979.
134. STEVENSON, J.C. Epidemiology of postmenopausal osteoporosis. In: Nordin, B.E.C. ed. **Osteoporosis. Contributions to modern management**. XVIIth ILAR Congress of Rheumatology, Rio de Janeiro, 1989. Proceedings, p. 11-20.
135. STOREY, M.L.; GREGER, J.L. Iron, zinc and copper interactions: chronic versus acute responses of rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 117, n. 8, p. 1434-1442, Aug. 1987.
136. STRAUSE, L.; SALTMAN, P.; SMITH, K.; BRACKER, M.; ANDON, M. Spinal bone loss in postmenopausal women supplemented with calcium and trace minerals. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, n. 7, p. 1060-1064, July. 1994.
137. TANAKA, Y.; HATANO, S.; NISHI, Y.; USUI, T. Nutritional copper deficiency in a Japanese infant on formula. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 96, n. 2, p. 255-257, Feb. 1980.
138. TAO, S-H.; HURLEY, L. Effect of dietary calcium deficiency during pregnancy on zinc mobilization in intact and parathyroidectomized rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 105, n. 2, p. 220-225, Feb. 1975.

- 139.TENENHOUSE, H.S. The vitamin D endocrine system. In: SIMMONS, D.J. (ed.). **Nutrition and bone development**. New York: Oxford University Press, 1990. p.114-130.
- 140.TOPPING, D.L.; ILLMAN, R.J.; ROACH, P.D.; TRIMBLE, R.P. KAMBOURIS,A.; NESTEL,P.J. Modulation of the hypolipidemic effect of fish oils by dietary fiber in rats: studies with rice and wheat bran. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 120, n. 4, p. 325-330, Apr. 1990.
- 141.TORIN, H. R. **Utilização do farelo de arroz industrial. Composição e valor nutritivo em dietas recuperativas**. Campinas, 1991. Tese (Mestre em Ciência da Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 147p.
- 142._____; DOMENE, S.M. A.; AMAYA-FARFAN, J. **Limited zinc bioavailability from Brazilian industrial rice bran**. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF NUTRITION, 15, Adelaide, Australia, Sept. Oct. 1993. Book 2, p. 885.
- 143._____; DOMENE, S.M.A.; AMAYA-FARFÁN, J. El efecto de suplementar el salvado de arroz industrial con cálcio y zinc. **Revista Chilena de Nutrición**, Santiago de Chile, v. 22, n. 1, p. 52, abs. 66, Abr. 1994
- 144.TORTOSA, E.; BENEDITO De BARBER, C. El salvado de arroz y su valor potencial para alimentación animal. **Revista Agroquímica y de Tecnología de Alimentos**, Valencia, v. 18, n. 4, p. 408-421, Dic. 1978.
- 145.TOTHILL, P. Methods of bone mineral measurement. **Physics in Medicine and Biology**. v. 34, p. 534-572. 1989.

- 146.TYLAVSKY, F.; ANDERSON, J. Dietary factors in bone health of elderly lactoovovegetarians omnivorous women. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 48, n. 3, p. 842-849, Sept. 1988.
- 147.VAHOUNY, G.V. Dietary fiber, lipid metabolism and atherosclerosis. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 41, p. 2801-2806, 1982.
- 148.VAN CAMPEN, D.R.; SCAIFE, P.O. Zinc interference with copper absorption in rats. **Journal of Nutrition** , Bethesda, v. 91, p. 473-476, 1967.
- 149._____. Copper interference with the intestinal absorption of zinc-65 by rat. **Journal of Nutrition** , Bethesda, v. 97, n. 1, p. 104-108, Jan. 1969.
- 150.VIRTAMA, P.; MÄHÖNEN, H. Thickness of the cortical layer as an estimate of mineral content of human finger bones. **British Journal of Radiology**, London, v. 33, p. 60-62, 1960.
- 151.VOHRA, P.; GRAY, G.A.; KRATZER, F.A. Phytic-acid-metal complex. **Proceeding of the Social and Experimental Biological Medical**, New York, v. 120, p. 447-449, 1965.
- 152.WALLWORK, J.; SANDSTEAD. Zinc. In: SIMMONS, D.J. (ed.) **Nutrition and bone development**. New York: Oxford University Press, 1990. p. 316-329.
- 153.WARREN, B.E.; FARRELL, D.J. The nutritive value of full-fat and defatted Australian rice bran. I. Chemical composition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 219-228, 1990.

- 154.WEAVER, C. Assessing calcium status and metabolism. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 121, n. 11, p. 1769-1775, Nov. 1990.
- 155.WEBER, F.E.; CHAUDHARY, V.K. Recovery and nutritional evaluation of dietary fiber ingredients from a barley by products. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 32, n. 8, p. 548-550, Aug. 1987.
- 156.WHO STUDY GROUP ON DIET, NUTRITION AND PREVENTION OF NONCOMMUNICABLE DISEASES. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a WHO study group**. World Health Organization technical report series, 797, p.80-83, 1990.
- 157.WILSON, T.; KATZ, J.; GRAY, D.H. Inhibition of active bone resorption by copper. **Calcified Tissue International**, New York, v. 33, n. 1, p. 35-40, Jan. 1981.
- 158.XU, P.; PRICE, J.; WISE, A.; AGGETT, P.J. Interaction of inositol phosphates with calcium, zinc, and histidine. New York, **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v.47, p.119-130, 1992.
- 159.YATES, J.; OREFFO, R.; MAYOR, K.; MUNDY, G. Inhibition of bone resorption by inorganic phosphate is mediated by both reduced osteoclast formation and decreased activity of mature osteoclasts. **Journal of Bone and Mineral Research**. v. 6, p. 473-478, 1991.
- 160.YOSHIDA, T.; SHINODA, S.; NAGATA, M. Effect of age and dietary phytate on the availability of phytate and minerals in rats. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 47, n. 11, p. 2641-2644, Nov. 1983.

161.ZHOU, J.R.; CANAR, M.M.; ERDMAN, J.W. Jr. Bone zinc is poorly released in young rats fed marginally zinc-restricted diet. **Journal of Nutrition** , Bethesda, v. 123, n. 8, p. 1383-1388, Aug. 1993.