

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

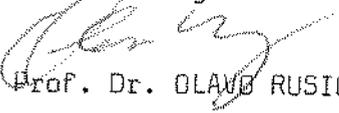
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS ÁREA DE TECNOLOGIA GERAL

9616137
Produção de Complexos de Ferro a
Partir de Hidrolisado Protéico

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por MARTA MARIA DUARTE CARVALHO VILA e aprovada pela Comissão Julgadora em 30.08.96.

Campinas, 30 de agosto de 1996


Prof. Dr. OLAVO RUSIG

Presidente da Banca

MARTA MARIA DUARTE CARVALHO VILA

Tese para obtenção do título de Mestre

Orientador:
Prof. Dr. Olavo Rusig

Co-orientador:
Prof. Dr. Matthieu Tubino

Campinas
1996

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

V71p

Vila, Marta Maria Duarte Carvalho

Produção de complexos de ferro a partir de hidrolisado protéico /
Marta Maria Duarte Carvalho Vila. -- Campinas, SP: [s.n.], 1996.

Orientador: Olavo Rusig

Dissertação de (mestrado)-Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de alimentos.

1.Complexos metálicos. 2.*Biodisponibilidade. 3.Ferro.
4.Aminoácidos. I.Rusig, Olavo. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

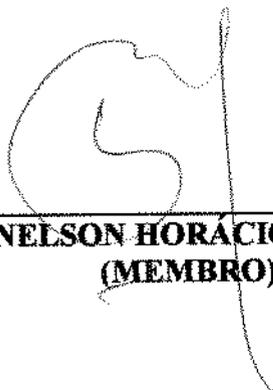
BANCA EXAMINADORA



**PROF. DR. OLAVO RUSIG
(ORIENTADOR)**



**PROF. DR. JAIME AMAYA FARFÁN
(MEMBRO)**



**PROF. DR. NELSON HORACIO PEZOA GARCIA
(MEMBRO)**

**PROFa. Dra. MARISA DE NAZARÉ HOELZ JACKIX
(MEMBRO)**

À Mariana, minha filha, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Olavo Rusig pela orientação e apoio que tornaram possível a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Matthieu Tubino pela orientação, amizade e oportunidade concedida de trabalho conjunto.

À Prof. Dra. Maria Isabel Bueno pelas sugestões e análises de fluorescência de raio-x.

Aos técnicos da Faculdade de Engenharia de Alimentos e do Instituto de Química pelo auxílio técnico prestado. Em especial à Alice, Ana Maria, Nelson, Eliete, José Luiz e Billy.

À entidade Capes, por seu auxílio financeiro.

À todos aqueles que contribuíram com amizade e compreensão para a realização desta pesquisa.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. NECESSIDADES NUTRICIONAIS DE FERRO E TOXIDEZ	3
2.2. BIODISPONIBILIDADE DE FERRO	7
2.3. ENRIQUECIMENTO DE ALIMENTOS COM FERRO	12
2.4. COMPLEXOS DE FERRO	17
3. OBJETIVOS	23
3.1. OBJETIVO GERAL	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. MATERIAL	24
4.2. MÉTODOS	24
4.2.1. Determinação da Proteína Bruta	24
4.2.2. Produção do Hidrolisado Protéico Ácido com Baixo Teor de Cloreto de Sódio	25
4.2.2.1. Produção do Hidrolisado	25
4.2.2.2. Destilação à Vácuo com Injeção de Vapor de Água	27
4.2.3. Determinação do Teor de Cloreto de Sódio	29
4.2.4. Obtenção dos Complexos Orgânicos de Ferro	29

4.2.5. Caracterização dos Complexos Formados	31
4.2.5.1. Espectroscopia de Infra-Vermelho.....	31
4.2.5.2. Espectroscopia de Fluorescência de Raio-X.....	32
4.2.6. Determinação do Teor de Ferro.....	32
4.2.7. Determinação do Nitrogênio	33
4.2.8. Recuperação dos Níveis de Hemoglobina em Ratos Anêmicos.....	34
4.2.8.1. Dosagem de Hemoglobina	38
4.2.8.2. Determinação da Utilização Biológica do Ferro	39
4.2.8.3. Análise Estatística.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. PRODUÇÃO DO HIDROLISADO ÁCIDO COM BAIXO TEOR DE CLORETO	40
5.2. PRODUÇÃO DOS COMPLEXOS DE FERRO.....	42
5.3. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS FORMADOS.....	46
5.3.1. Espectrometria de Infra-Vermelho.....	46
5.3.2. Espectrometria de Fluorescência de Raio X	52
5.3.3. Espectrometria de Absorção Atômica	52
5.4. AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DO FERRO DO COMPLEXO DO HIDROLISADO PROTÉICO PELO ÍNDICE DE REPLEÇÃO DE HEMOGLOBINA	54
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
8. ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Doses diárias de ferro recomendadas para indivíduos de diferentes idades e sexo.....	5
Tabela 2 - Biodisponibilidade relativa do ferro presente em alguns alimentos.....	9
Tabela 3 - Valor biológico relativo (VBR) de ferro de várias fontes minerais	16
Tabela 4 - Composição porcentual da dieta à base de caseína (Dieta Basal)	35
Tabela 5 - Composição das misturas salina e vitamínica utilizadas no preparo das dietas	36
Tabela 6 - Composição elementar do hidrolisado dessalinizado e seco.....	41
Tabela 7 - Teores de cloreto de sódio no hidrolisado	41
Tabela 8 - Rendimento, em função da relação molar entre o nitrogênio (N) e o íon férrico (Fe^{+3}), do hidrolisado dessalinizado e seco, na produção do complexo.....	44
Tabela 9 - Rendimento, em função da relação molar entre aminoácido glicina (AA) e o íon férrico (Fe^{+3}), na produção do complexo.....	45

Tabela 10 - Rendimento, em função da relação molar entre o aminoácido lisina (AA) e o íon férrico (Fe^{+3}) na produção do complexo.	45
Tabela 11 - Rendimento, em função da relação molar entre o aminoácido metionina (AA) e o íon férrico (Fe^{+3}) na produção do complexo.....	46
Tabela 12 - Teores de ferro obtidos por absorção atômica para os produtos de relação molar N/Fe 1:1.	54
Tabela 13 - Biodisponibilidade de ferro proveniente do sulfato ferroso e do complexo orgânico de ferro, calculado através do Índice de Recuperação de Hemoglobina em ratos anêmicos.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema de produção do hidrolisado	26
Figura 2 - Sistema de destilação para evaporação a vácuo do ácido clorídrico utilizado na hidrólise.....	28
Figura 3 - Curva de titulação da solução de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e hidrolisado com hidróxido de sódio 0,5 M (1 mol de N / mol de ferro).....	43
Figura 4 - Curva de titulação da solução de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e hidrolisado com hidróxido de sódio 0,5 M (2 moles de N / mol de ferro)	43
Figura 5 - Curva de titulação da solução de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e hidrolisado com hidróxido de sódio 0,5 M (3 moles de N / mol de ferro).....	43
Figura 6 - Espectro de infra-vermelho do hidrolisado dessalinizado e seco (105°C / 4 horas).....	48
Figura 7 - Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) mais hidrolisado. Relação molar de 1 mol de N / mol de ferro	48
Figura 8 - Espectro de infra-vermelho do aminoácido glicina.....	49

Figura 9 - Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) mais glicina. Relação molar de 1 mol de N / mol de ferro.....	49
Figura 10 - Espectro de infra-vermelho do aminoácido metionina.....	50
Figura 11 - Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) mais metionina. Relação molar de 1 mol de N / mol de ferro.	50
Figura 12 - Espectro de infra-vermelho do aminoácido lisina.....	51
Figura 13 - Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) mais lisina. Relação molar de 1 mol de N / mol de ferro.....	51
Figura 14 - Espectro de fluorescência de raio-X do complexo obtido do hidrolisado mais íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Relação molar 1:1).	53

RESUMO

A anemia por deficiência de ferro, é ainda hoje, um problema sério, de alta prevalência em muitas regiões do mundo, o qual resulta em graves consequências para a saúde e o desenvolvimento econômico e social das comunidades. A principal causa da anemia ferropriva é a alimentação com baixa ingestão e/ou pouca biodisponibilidade do ferro. Como solução ao problema, tem-se procurado desenvolver novos compostos que apresentem boa disponibilidade do íon ferro para utilização como enriquecedores alimentares.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um complexo orgânico de Fe^{+3} com hidrolisado ácido da torta de extração do óleo de milho com baixo teor de sal, seguido de avaliação de sua biodisponibilidade.

O hidrolisado foi obtido utilizando-se 30% de matéria prima, 20% de HCl, temperatura de 100°C e tempo de agitação de 8 horas. A remoção do ácido residual foi obtida por destilação à vácuo com injeção de vapor de água por trinta minutos. Atingindo-se um nível de cloreto de sódio de 3,9% no produto seco (105 °C /4h).

O composto orgânico foi produzido utilizando-se uma relação molar de 1:1 de aminoácidos e ferro, apresentando um teor de ferro de 25,9%, quando analisado por absorção atômica. A espectroscopia na região do infra-vermelho indicou serem os grupamentos carboxílicos os principais sítios de ligação.

A biodisponibilidade do ferro do composto foi avaliada através do método de depleção e repleção de hemoglobina em ratos anêmicos, estimado através do índice de Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (HRE %). O composto apresentou uma biodisponibilidade de 112,80% em relação ao sulfato ferroso.

ABSTRACT

The anaemia caused by iron deficiency is a serious and highly prevalent nutritional problem in many parts of the world which has important health, social and economic consequences.

The main cause of iron deficiency anaemia is low dietary iron usually associated with low bioavailability. In an attempt to remediate the problem, new compounds which present good iron availability have been developed in recent years for food fortification.

This work was aimed at the production of a an organic complex of Fe^{+3} with a low-sodium, acid-hydrolysed of corn-oil cake, followed by product chemical characterization and bioavailability assay.

The hydrolyzate was obtained from a mixture of 30% corn cake, 20% of HCl, heated at 100°C for 8 hours with shaking. The excess acid was removed by vacuum distillation with steam injection for 30 minutes. A level of 3.9% of sodium chloride was reached in the dry product (105°C) after 4h.

The organic compound was produced from a 1:1 (molar ratio) amino acid: iron system. The product was 25.9% in iron, as analysed by atomic absorption spectroscopy. The infrared spectra indicated that carboxylic groups were the main link sites with the ion.

The bioavailability of the compound's iron was evaluated through the haemoglobin depletion and repletion method in anaemic mice, estimated through the Haemoglobin Regeneration Efficiency Index (HRE%). The compound exhibited 112.80% bioavailability with respect to ferrous sulphate.

1. INTRODUÇÃO

A deficiência de ferro é um grave problema nutricional em muitas regiões do planeta. Embora a falta de diversos nutrientes possa ser responsável por anemias nutricionais, o ferro é o de maior importância na saúde pública pois determina aproximadamente 90% das anemias carenciais, ocorrendo tanto em países do Terceiro Mundo como em países desenvolvidos (WHO, 1993). A anemia ferropriva atinge cerca de 1 milhão de pessoas, especialmente crianças e mulheres em idade fértil (BAYNES e BOTHWELL, 1990; TURCONI e TURCONI, 1992).

As principais causas deste tipo de anemia são a baixa ingestão e, principalmente, a pouca biodisponibilidade do ferro alimentar, ou seja, a pequena quantidade de ferro da dieta que é de fato metabolizável (LAYRISSE e MARTINEZ-TORRES, 1983). A biodisponibilidade do ferro tem se mostrado extremamente variável e muitos fatores influenciam sua absorção como: forma química do ferro, composição da dieta na qual está sendo consumido, necessidades individuais, etc... (MANTOVANI, 1986).

Na tentativa de se controlar e/ou prevenir a deficiência de ferro, algumas propostas tem sido avaliadas, tais como: suplementação medicamentosa, fortificação de alimentos ou água e diversificação alimentar. A longo prazo, a fortificação de alimentos tem se apresentado como a forma mais efetiva de se prevenir a anemia ferropriva a um baixo custo (COOK e REUSSER, 1983; WHO, 1993).

O sucesso do enriquecimento alimentar depende tanto do veículo a ser escolhido, como do composto a ser utilizado. Para tanto, deve-se levar em consideração não apenas a quantidade do mineral mas, também, sua forma química (BJORN-RASMUSSEN, 1977).

Atualmente, têm se pesquisado complexos organo-metálicos obtidos através de ligações químicas de metais com proteínas, peptídeos, aminoácidos e outras substâncias a fim de se obter compostos alternativos adequados para a fortificação de alimentos (KRATZER e VOHRA, 1986).

A formação destes complexos ocorre quando o metal ou íon é rodeado por um grupo de íons ou moléculas orgânicas, unidas a este através de mais de duas posições (BASOLO e JOHNSON, 1980). O elemento é assim isolado de reações com outros compostos o que o torna mais estável nos alimentos. Assim o complexo é absorvido intacto pelo intestino uma vez que não reage com outros compostos presentes na dieta. Desta forma, obtém-se uma alta biodisponibilidade associada a baixa reatividade (ASHMEAD *et al.*, 1994).

Assim sendo, é interessante obter-se complexos orgânicos de ferro com alta biodisponibilidade a partir de uma fonte protéica acessível e de baixo custo para o uso como enriquecedores alimentares.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. NECESSIDADES NUTRICIONAIS DE FERRO E TOXIDEZ

O ferro é um microelemento essencial à vida desempenhando papel central em processos vitais. Como parte do pigmento respiratório hemoglobina, o ferro é fundamental para o funcionamento de todos os órgãos e tecidos do organismo. A maior parte deste nutriente, ocorre combinado com proteínas, sendo indispensável, na formação de hemoglobina, mioglobina, citocromos, citocromo oxidase, peroxidase, catalase e outras enzimas. A quantidade de ferro total em um indivíduo adulto é de cerca de 4g. Aproximadamente temos: 65% sob forma de hemoglobina, 4% como mioglobina, 1% como vários compostos hêmicos, 0,1% combinados com transferrina (proteína de transporte) e 15-30% armazenados como ferritina no sistema reticuloendotelial e células parenquimatosas do fígado (GUYTON, 1991; GUTHRIE, 1986).

As necessidades de ferro do organismo variam grandemente durante as etapas da vida. As quantidades de ferro recomendadas pela RDA (Recommended Dietary Allowances, 1989) para indivíduos de diferentes idades e sexo são apresentadas na Tabela 1. Um homem adulto exige cerca de 40 mg de ferro por dia para as funções metabólicas normais, sendo provenientes de três fontes: dos depósitos do corpo, o reutilizado da degradação da hemoglobina e o absorvido pelo aparelho gastrintestinal. A maior parte do ferro é fornecido pela reciclagem fisiológica (destruição normal dos eritrócitos) e somente 1 a 1,5 mg deve ser oriunda da alimentação (CARPENTER e MAHONEY, 1992). O balanço nutricional de ferro é regulado pela manutenção do processo de absorção com as necessidades de ferro corpóreo. Para manter este equilíbrio, a ingestão diária deve repor a quantidade perdida diariamente (0,7-1,2 mg/dia) pelas vias fisiológicas

(descamação da superfície epitelial, excreção biliar, perda gastrointestinal e menstrual) (GUTHRIE, 1986).

O ferro está largamente distribuído na natureza e existe em quantidades relativamente grandes na maioria dos alimentos consumidos pelo ser humano (REILLY, 1991). Contudo, a anemia por deficiência de ferro permanece como um sério problema nutricional, atingindo especialmente crianças e mulheres em idade fértil (BAYNES e BOTHWELL, 1990; VANNUCHI *et al.*, 1992; SPOLIDORO, 1994). A NAS (National Academy of Science, 1989) estabelece, através das Doses Diárias Recomendadas (Recommended Dietary Allowances - RDA), em 10-15 mg/dia a quantidade de ferro a ser ingerida por adultos. No Brasil por meio do Conselho Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA, 1978) recomenda-se também como dose diária para adultos de 10-15 mg/dia. Estas quantidades são cerca de dez vezes maiores que a quantidade exigida para a maioria das mulheres adultas para manutenção da homeostase (FAO, 1970). Contudo, dificilmente essa dose pode ser obtida pela alimentação normal devido à dificuldade do ser humano em absorver este metal pela mucosa intestinal.

A deficiência de ferro, se não corrigida, conduz à anemia ferropriva que, entre os inúmeros, problemas leva à redução da resistência imunológica e aumento de infecções, diminuição da capacidade muscular, comprometimento do desenvolvimento psicomotor, diminuição da atenção, dificuldades de aprendizado, aumento da pré disposição para doenças associadas a gravidez e parto, etc... (DALLMAN *et al.*, 1980).

Tabela 1 - Doses diárias de ferro recomendadas para indivíduos de diferentes idades e sexo

Grupo	idade (anos)	(mg/dia)
Bebês	0-0,5	6
	0,5-1	10
Crianças	1-10	10
Homens	11-18	12
	19-50	10
	51- +	10
Mulheres	11-50	15
	51- +	10
	gravidez	30
	lactação	15

Fonte: RDA, 1989

Determinadas condições fisiológicas podem predispor à deficiência de ferro. Nas mulheres a perda de sangue durante a menstruação faz com que a necessidade de ferro aumente de 0,5 a 1 mg neste período. Na gravidez, parto e puerpério a mulher perde cerca de 1 g de ferro exigindo 3-6 mg/dia no período de gestação. O crescimento dos bebês, crianças e adolescentes também requer doses maiores de ferro. Ao nascer a criança tem uma quantidade total de ferro de aproximadamente 0,3 g, aumentando para 4,0-5,0 g no adulto, exigindo, portanto, um aumento médio de 0,6 mg/dia (num período de desenvolvimento de cerca de vinte anos) (GUTHRIE, 1986). Existem ainda, as anemias hereditárias e as de fundo patológico onde se incluem todas as síndromes que afetam a absorção intestinal, sangramentos recorrentes e verminoses que provocam expoliação de eritrócitos (GROSS *et al.*, 1976).

A absorção do ferro também é bastante influenciada pelo estado nutricional. Indivíduos anêmicos absorvem duas a três vezes mais do que indivíduos normais (MONSEN *et al.*, 1978). Quando o organismo está saturado de ferro, a velocidade de absorção pelo tubo intestinal diminui acentuadamente. Sendo assim, o ferro corporal é regulado, em grande parte, pela variação da velocidade de absorção, não havendo um controle homeostático que regule sua absorção/excreção (GUYTON, 1991).

Excessos de ferro no organismo são altamente tóxicos. A sobrecarga de ferro, que é um grande catalisador de radicais livres, resulta na incidência de câncer, angina pectoris, infarto do miocárdio, derrame cerebral e infecções em adultos acima dos 40 anos, idade onde começam a se elevar os níveis de radicais livres (PERCÁRIO e FELIPPE, JR, 1994).

A intoxicação pelo ferro pode ser resultado de excessiva absorção desse nutriente por ingestão crônica de seus compostos ou grandes quantidades de ferro, especialmente heme, ou também, por suplementação medicamentosa exagerada (CARPENTER e MAHONEY, 1992). Há ainda os indivíduos com hiperabsorção devido a erros inatos de metabolismo, como a siderose ou hemosiderose que atinge cerca de 0,25% da população e hemocromatose que afeta aproximadamente 0,1% dos indivíduos (GUTHRIE, 1986).

Estas observações em relação à sobrecarga de ferro, têm levado à controvérsias a respeito dos benefícios versus os efeitos negativos que podem resultar de uma difusão de alimentos fortificados com ferro (CARPENTER e MAHONEY, 1992; GIESE, 1995). Deve-se discriminar os alimentos enriquecidos com ferro para uso nas diversas faixas etárias e alertar o consumidor para estas diferenças (PERCÁRIO e FELIPPE, JR, 1994).

2.2. BIODISPONIBILIDADE DE FERRO

Nenhum nutriente é totalmente absorvido e utilizado, sempre ocorrendo perdas do processos fisiológicos normais de absorção e metabolismo. Diversos autores tem definido biodisponibilidade como a proporção do nutriente presente no alimento que o organismo é capaz de absorver e utilizar nos processos fisiológicos (LATUNDE-DADA e NEALE, 1986; CONSAUL e LEE, 1983; CARPENTER e MAHONEY, 1992).

Contudo, os fatores nutricionais constituem a principal causa da anemia ferropriva, principalmente nos países em desenvolvimento, onde ocorrem carências qualitativa e quantitativa de ferro. Devido a baixa biodisponibilidade do ferro, ou seja, ao teor reduzido deste mineral que é realmente absorvido pelo trato gastrointestinal, com subsequente estocagem ou incorporação à hemoglobina, tem-se um pequeno aproveitamento do ferro existente na dieta (LAYRISSE e MARTINEZ-TORRES, 1983).

Diversos trabalhos (CLYDESDALE, 1983; COOK, 1983; LAYRISSE, *et al.*, 1984; BIANCHI *et al.*, 1992; HALLBERG, 1981) indicam que a quantidade de ferro disponível nos alimentos não depende somente do conteúdo total do ferro mas, da forma química do elemento e composição da dieta com a qual esta sendo consumido. Sob muitos aspectos, as exigências dietéticas, no que toca aos minerais, são mais difíceis de se definir do que para nutrientes orgânicos. Vários fatores exercem influência sobre a utilização dos minerais. As inter-relações entre minerais ou correlações entre frações orgânicas e minerais poderão resultar em diminuição ou aumento da biodisponibilidade dos minerais (ASHMEAD *et al.*, 1985). Sendo assim, o conteúdo total de ferro na dieta não é um indicador preciso da eficácia do ferro dietético (LATUNDE-DADA e NEALE, 1986).

Os alimentos, considerando-se a biodisponibilidade do ferro presente, podem ser divididos em três categorias: os de baixa, média ou alta biodisponibilidade (Tabela 2). Contudo, a absorção final do ferro é resultado da ação de diversos fatores (BAYNES e BOTHWELL, 1990).

A forma química do ferro afeta profundamente sua disponibilidade para o aproveitamento metabólico. Baseando-se no mecanismo de absorção existem duas formas principais: a forma "heme" e a "não heme" que melhor explicam a biodisponibilidade do ferro no alimento.

O ferro "heme" está presente nos alimentos de origem animal sob forma de hemoglobina e mioglobina correspondendo em média a cerca de 40% do total de ferro nos tecidos animais, incluindo produtos cárneos, fígado, aves e peixes. O ferro "não heme" é encontrado nos alimentos de origem vegetal, leite e derivados, carnes (aproximadamente 60% do ferro total) e alimentos industrializados fortificados com sais de ferro.

O ferro "heme" é solúvel no intestino delgado sendo absorvido diretamente para dentro do enterócito na forma de complexo ferro-porfirina intacto onde é liberado por ação enzimática e daí segue os caminhos do ferro "não heme".

O ferro "não heme" é transportado para dentro da célula da mucosa por ação da apotransferrina formando a transferrina. Mais tarde ocorre a liberação do ferro pelas células para a corrente sanguínea sob a forma de transferrina plasmática (FINCH e COOK, 1984; GUTHRIE, 1986).

Tabela 2 - Biodisponibilidade relativa do ferro presente em alguns alimentos

Alimentos	Biodisponibilidade do ferro		
	Baixa	Média	Alta
Cereais	milho aveia arroz sorgo	farinha de milho farinha de trigo	
Frutas	maçã abacate banana uva pêssego pêra ameixa morango	melão manga abacaxi	goiaba limão mamão papaia tomate
Legumes e Verduras	vagem lentilha espinafre	cenoura batata	beterraba brócolis couve couve flor abóbora nabo
Nozes	amêndoa castanha do Pará amendoim noz		
Alimentos c/ alto teor protéico	ovo isolado protéico de soja farinha de soja		peixe aves carnes

Fonte: BAYNES e BOTHWELL, 1990.

A absorção do ferro "heme" sofre pouca influência da dieta e possui uma absorção superior à do ferro "não heme" devido ao seu mecanismo absorvitivo e solubilidade elevada no pH intestinal (BIANCHI, 1988). Já o ferro "não heme" tem absorção inferior e é bastante suscetível à presença de vários fatores dietéticos que melhoram ou pioram a absorção. Fitatos, fibras, taninos, oxalatos são conhecidos por reduzirem a absorção de ferro. Entretanto, a

presença de ácido ascórbico e outros ácidos como o cítrico podem aumentar a absorção de ferro "não heme" dos alimentos (COOK, 1983; CLYDESDALE, 1983; LEIGH e MILLER, 1983; HALLBERG e ROSSANDER, 1984; ISMAIL-BEIGI *et al.*, 1977).

O ácido ascórbico e a carne, ou tecido animal, têm grande significado nutricional em relação ao aumento da biodisponibilidade. O ácido ascórbico como um agente redutor, mantém o ferro dos alimentos no estado ferroso, que é mais solúvel e com melhor absorção do que o estado férrico e, também, forma o quelato ferro-ascorbato que permanece solúvel com o aumento do pH no intestino delgado. A carne é um componente importante de uma dieta, não somente por contribuir com ferro heme, altamente disponível, mas também, porque pode aumentar de 2 a 4 vezes a absorção do ferro "não heme". Este aumento de biodisponibilidade é chamado de "fator carne" e acredita-se ser devido a formação de complexos entre os produtos da hidrólise digestiva das proteínas e o ferro presente no lúmen intestinal (COOK, 1983; GORDON e GODBER, 1989).

JACKSON e LEE (1992) concluem que o leite e derivados também afetam a biodisponibilidade de ferro. Há uma diminuição da absorção do elemento, porém os mecanismos que promovem esta queda ainda não estão bem esclarecidos.

O ferro "heme" (produtos cárneos) como já mencionado, apresenta uma absorção na ordem de 10 a 25% sendo bastante superior ao ferro "não heme" (produtos de origem vegetal) que é na faixa de 1 a 6%. Uma dieta a base de cereais, raízes ou tubérculos, com falta quantitativa de carnes e frutas (ácido ascórbico) é uma alimentação com baixa biodisponibilidade de ferro (BAYNES e BOTHWELL, 1990). Porém, sendo os produtos de origem animal caros, os alimentos de origem vegetal contribuem com cerca de 90%, ou mais,

do total de ferro da dieta, especialmente em populações carentes (CARPENTER e MAHONEY, 1992).

O ferro pode sofrer significativas mudanças na sua biodisponibilidade como resultado de interação com o alimento assim como o tipo de processamento utilizado (LEE e CLYDESDALE, 1979a; BIANCHI, 1992; LEE e CLYDESDALE, 1980a).

LEE e CLYDESDALE (1980b) observaram a ação de processos de secagem por pulverização ("spray-drying") e por congelamento ("freeze-drying") sobre diversas fontes de ferro em bebidas e concluíram que o "perfil" do ferro de certas fontes se alterava, como resultado de reações com outros componentes existentes nas bebidas, após 3 dias de estocagem. Estas mudanças foram aceleradas pela secagem por pulverização. O mesmo não foi observado na secagem por congelamento.

A ação do aquecimento sobre o ferro endógeno e o adicionado em purê de espinafre enlatado foi estudado por LEE e CLYDESDALE (1981). Foram utilizados 8 fontes de ferro em produtos não processados, processados com ascorbato e o controle. O ferro endógeno do espinafre puro estava 93% na forma insolúvel enquanto o ferro adicionado variou largamente no seu grau de insolubilidade.

HAZELL e JOHNSON (1987) avaliaram a biodisponibilidade de ferro em diversos produtos processados e suco de frutas. Observou-se que certos processamentos alimentares produzem grande aumento de biodisponibilidade, muitos dos alimentos que foram cozidos, secos, fermentados ou tiveram aditivos adicionados, exibiram aumento da difusibilidade do ferro quando comparados com alimentos não processados.

KADAN e ZIEGLER (1986) avaliaram o efeito de ingredientes sobre a solubilidade e o estado químico do ferro em pães, concluindo que o sal (NaCl)

promovia um efeito inibidor sobre o ferro solúvel e conseqüentemente sobre sua biodisponibilidade. O fermento biológico utilizado demonstrou aumentar a biodisponibilidade do elemento.

JONNALAGADDA *et al.* (1991) analisando o efeito do aquecimento em farinha de trigo concluíram que o aquecimento prolongado reduz a oferta de ferro biodisponível.

Ainda na área da panificação, FAIRWATHER-TAIT e SYMSS (1987), trabalhando com processos de fabricação de pão: o tradicional e o "chorleywood" não encontraram mudanças significativas na absorção de ferro.

INDUMADHAVI e AGTE (1992) pesquisaram o efeito da fermentação sobre cereais e legumes através de 31 diferentes combinações de arroz, trigo, sorgo e outros. Os resultados indicam que a fermentação promove aumento de solubilização do ferro com melhora da disponibilidade do mineral.

2.3. ENRIQUECIMENTO DE ALIMENTOS COM FERRO

A anemia ferropriva é a mais comum desordem nutricional no mundo, mas com maior gravidade, em países em desenvolvimento. Com o propósito de se evitar as graves conseqüências oriundas desta anemia, alguns métodos vêm sendo testados tais como: suplementação medicamentosa, fortificação de alimentos ou água e ainda mudanças nos hábitos alimentares. Como programa de ação imediata a suplementação com medicamentos contendo ferro, tem a

vantagem de restabelecer mais rapidamente os níveis relativos do ferro. No entanto, a infra-estrutura exigida para a distribuição destes suplementos e os efeitos colaterais limitam sua implantação. Mudanças nos hábitos alimentares exigem, por sua vez, uma motivação e participação eficiente da população. A longo prazo, a fortificação de alimentos tem sido a forma mais eficiente de se reduzir a anemia ferropriva a um custo reduzido (COOK e REUSSER, 1983; WHO, 1993; LATUNDE-DADA e NEALE, 1986; BORENSTEIN, 1971).

A partir das décadas de 30/40, com base nos estudos da população dos Estados Unidos, que indicaram deficiência nutricional de algumas vitaminas e minerais como: tiamina, riboflavina, niacina e ferro, surgiu a necessidade de se estudar a fortificação para alimentos básicos (YETLEY e GLINSMANN, 1983).

Os programas nacionais para o enriquecimento de alimentos com ferro iniciaram em 1941, quando os Estados Unidos e Inglaterra enriqueceram farinha de trigo com ferro. Logo nos anos seguintes, o enriquecimento de farinha de trigo com ferro estendeu-se a outros países como Canadá, Dinamarca, Japão e Suécia, sendo o ferro reduzido (metálico) o mais comumente utilizado. Neste período não se dispunha de uma metodologia apropriada para medir a utilização biológica deste mineral e só 30 anos mais tarde comprovou-se uma absorção de pequena significância (0,06 mg de ferro com ingestão de 200 g de pão/dia, produzido com farinha fortificada na ordem de 1,6 mg de ferro/100 g de farinha) (LAYRISSE e MARTINEZ-TORRES, 1983).

As pesquisas para o enriquecimento alimentar, vem sendo desenvolvidas no sentido de estabelecer os alimentos que devem ser fortificados, teores e forma química do elemento ferro a ser utilizada, uma vez que diversos autores têm apontado que a suplementação de alimentos com ferro é a melhor forma de eliminar a anemia ferropriva (HALLBERG e ROSSANDER, 1984; COOK e

REUSSER, 1983; PABON e LONNERDAL, 1992; OLOGUNDE *et al.*, 1991; DAHIYA e KAPOOR, 1994).

Os cuidados com o enriquecimento de produtos alimentares devem recair na escolha do alimento a ser fortificado, obedecendo alguns critérios básicos, entre os quais: ser acessível e consumido regularmente pela população, a quantidade ingerida deve ter pouca variação individual, e pequena variação regional, e a forma do elemento ferro, de modo a ser adequadamente absorvido, sem alteração de sabor, odor e aparência dos alimentos durante o processamento e a estocagem (BORENSTEIN, 1971; BJORN-RASMUSSEN *et al.*, 1977; RUSIG, 1994a; AMINE e HEGSTED, 1974).

Dentre o diversos veículos que tem sido pesquisados para a utilização como "carreadores" de ferro podemos citar: água (FERREIRA *et al.*, 1991), suco de laranja (SERON e GUZMAN, 1993), leite (STEKEL *et al.*, 1986; RUSIG, 1994b), açúcar (LAYRISSE e MARTINEZ-TORRES, 1976), biscoitos (WALTER, 1993), farinha de trigo (HALLBERG *et al.*, 1989), sal de cozinha (WORKING GROUP, 1982) entre outros.

O enriquecimento de alimentos com ferro é tecnicamente difícil porque formas mais biodisponíveis são frequentemente mais reativas quimicamente e muitas vezes produzem efeitos sensoriais e/ou nutricionais indesejáveis (COOK, 1983). A Tabela 3 apresenta os compostos de ferro mais utilizados na fortificação de alimentos e seus valores biológicos relativos.

A forma química dos compostos usados para a fortificação dos alimentos tem um grande efeito na sua biodisponibilidade, como já citado em vários trabalhos (JONNALAGADA *et al.*, 1991; BIANCHI, 1992; BJORN-RASMUSSEN *et al.*, 1977). Desta forma, o tipo de sal, de mineral ou o elemento químico a ser utilizado para o enriquecimento alimentar influi muito na escolha devido a sua disponibilidade biológica, bem como o custo,

solubilidade, reatividade, granulometria, cor, gosto, densidade, odor e outros (RUSIG, 1994a). A solubilidade de vários compostos de ferro está diretamente relacionada com a sua biodisponibilidade, pois o ferro para ser absorvido precisa chegar à parte superior do intestino delgado na forma solúvel. O estado de oxidação é uma característica que também afeta a absorção. Sais de íons ferrosos são mais facilmente utilizados pelo homem do que sais férricos, provavelmente pela maior solubilidade dos sais ferrosos (SMITH, 1983; LEE e CLYDESDALE, 1979a; LEE e CLYDESDALE, 1979b). Há a possibilidade ainda, da formação de complexos com diversos compostos orgânicos existentes no alimento ou na dieta que podem ligar-se ao ferro aumentando ou diminuindo sua absorção (SMITH, 1983; COOK, 1983; AISEN, 1976).

Tabela 3 - Valor biológico relativo (VBR) de ferro de várias fontes minerais

Fonte	VBR	
	Média	Limites
Citrato de ferro e amônio	107	98-115
Citrato de ferro e colina	102	-
Cloreto férrico	44	26- 67
Citrato férrico	73	70- 76
Glicerofosfato férrico	93	86-100
Pirofosfato férrico	45	38- 52
Ortofosfato férrico	14	7- 32
Oxido férrico	4	0- 6
Sulfato férrico	83	65-100
Sulfato de ferro e amônio	99	99-100
Carbonato ferroso	2	0- 6
Cloreto ferroso	98	-
Fumarato ferroso	95	71-133
Gluconato ferroso	97	-
Sulfato ferroso hepta hidr.	100	-
Sulfato ferroso anidro	100	-
Tartarato ferroso	77	70-83
Ferro reduzido	37	8- 66
Pirofosfato de sódio e ferro	14	2- 23
NaFe EDTA*	99	97-100

Fonte: FRITZ *et al* (1970)

* Sal de EDTA monosódico e monoférrico

2.4. COMPLEXOS DE FERRO

O tratamento da anemia de ferro, bem como a fortificação de alimentos está sendo feito principalmente com sulfato ferroso. Mais recentemente, tem se verificado o desenvolvimento de compostos alternativos que apresentam alta biodisponibilidade de ferro e ausência ou redução de efeito adversos, comumente observados, do sulfato ferroso.

Tem sido relatado que pode-se melhorar a biodisponibilidade do ferro através de uma quelação ou complexação com agentes quelantes de baixa massa molecular com capacidade de impedir a formação de complexos insolúveis ou outras reações que afetam negativamente a absorção (LEE e CLYDESDALE, 1979a). A quelação ou a complexação de cátions é um processo empregado no sentido de aumentar a absorção dos elementos, sem interferir qualitativamente no metabolismo.

O termo "quelação" se deriva da palavra grega "chele" que significa garra ou pinça. Quimicamente a quelação é o resultado da ligação entre cargas positivas de certos cátions e um, dois ou mais sítios de alta eletronegatividade de moléculas ditas ligantes com formação de uma espécie complexa (ASHMEAD, 1987).

Os quelatos ou complexos representam a "transformação" química dos elementos em compostos organo-metálicos com características de superior biodisponibilidade. Os macro e microelementos, como na forma inorgânica de óxidos, sulfatos, carbonatos, comumente utilizados como fonte de minerais, tendem a ficar menos disponíveis ao reagirem com outros nutrientes da dieta, tornando-se insolúveis e não assimiláveis pelo organismo. Os complexos de minerais são compostos especiais com massa molecular reduzida (abaixo de 1500 Daltons) que favorece seu transporte e a absorção pelo organismo (ASHMEAD *et al.*, 1985).

Tem se verificado o uso de diversas substâncias como agentes capazes de se ligar a metais formando compostos estáveis e com boa biodisponibilidade (KRATZER e VOHRA, 1986). Os agentes complexantes de interesse nutricional mais utilizados tem sido: proteínas e derivados (caseína, produtos oriundos da soja, albumina, etc...), ácidos orgânicos (ascórbico, cítrico, etc...), aminoácidos e compostos correlatos, carboidratos, etc... (GALDI e VALENCIA, 1988; SUBBA RAO e NARASINGA RAO, 1985). De modo geral, todos os aminoácidos são efetivos como agentes ligantes com metais. São também, de significativa importância no transporte destes elementos do lúmen para células da mucosa intestinal. Como faz parte da espécie formada, o aminoácido ligante passa a agir como um transportador de metal (ASHMEAD, 1987).

A habilidade de um mineral em sofrer o processo de quelação é muito dependente do meio reacional. As propriedades químicas e físicas de todos os componentes do sistema determinam o quanto de complexação irá ocorrer no ambiente químico (KRATZER e VOHRA, 1986). Portanto, várias são as condições necessárias para ocorrer a complexação entre aminoácidos e minerais, podendo-se citar:

- 1) Os compostos devem ser solúveis e estarem num meio com água suficiente para ocorrer a solubilização e promover a interação entre as substâncias.
- 2) Deve haver uma relação propícia entre mineral e agente quelante. Na falta desta adequação, pode ocorrer formação de hidróxidos em excesso, além de problemas de rendimento.
- 3) pH próprio. O meio onde se dará a quelação exige uma condição ótima ácido/base para um máximo de complexação, onde a maioria dos grupamentos carboxílicos dos aminoácidos fiquem desprotonados facilitando a complexação. O pH muito elevado favorece também a formação de hidróxidos

dos metais, 1986; (KRATZER e VOHRA, 1986; ASHMEAD *et al.*, 1985; BASOLO e JOHSON, 1980).

Diversos trabalhos têm sido propostos com o objetivo de se obter compostos de ferro que apresentem boa absorção, para o uso como enriquecedores de alimentos.

BATES *et al.* (1972) desenvolveram um complexo de ferro e frutose que proporcionou um aumento de absorção do ferro em comparação com o sulfato ferroso. Este complexo apresentou propriedades físico-químicas e biológicas adequadas para uso como aditivos de vários alimentos.

JONES *et al.* (1975) trabalhando com um polifosfato de ferro obtido a partir da ligação à proteína de soro de leite criaram um produto com aproximadamente 10% de ferro, 13% de fósforo e 50% proteína. Em ensaios biológicos obtiveram 92-100% de eficiência relativa ao sulfato de ferro, na avaliação através da repleção dos níveis de hemoglobinas em ratos e frangos. O produto foi considerado como adequado para a complementação alimentar podendo ser utilizado em farinha de trigo, leite, produtos para bebês e outros.

Um complexo de ferro e EDTA (Fe(III)-EDTA) estudado por LAYRISSE e MARTINEZ-TORREZ (1977), que avaliou a absorção de ferro, apresentou vantagens sobre outros sais de ferro, contudo, não foi determinada a utilização biológica do total do ferro absorvido.

RAUCH *et al.* (1990), determinaram a biodisponibilidade de três complexos de ferro e sacarose. Estes foram obtidos pela reação com sacarose e cloreto férrico com pH corrigido para 7,4, pela adição de ácido cítrico, ou de ácido ascórbico ou de ácido ascórbico mais ácido cítrico. Conseguiram valores superiores de biodisponibilidade na comparação com sulfato ferroso na faixa de 119-165% sendo possível a utilização dos mesmos como enriquecedores alimentares principalmente para bebidas.

Há ainda, o trabalho de ASHMEAD e LITTLE (1977) que descreve a produção de complexos orgânicos de cobalto, cobre, manganês, ferro, zinco, cálcio e magnésio a partir da reação de hidrolisado ácido de soja e sais dos metais. O ensaio estabelece para obtenção dos complexos um pH mínimo de 7,5, considerando entretanto, que o pH ideal estaria na faixa de 8,0 - 10,0 para ocorrer uma desprotonação completa dos grupamentos de ligação dos aminoácidos. Através de ensaios com animais observa um melhor aproveitamento dos elementos.

Em 1987, NASSAR e TIERNEY relatam a produção de quelatos de metais (cálcio, magnésio, ferro, zinco, manganês, cobre, cobalto, etc...) utilizando um hidrolisado protéico de soja obtido por ação enzimática a pH neutro (7,0-7,4) e a temperatura ambiente para fins de enriquecimento alimentar.

CHAUD (1993) trabalhando com quelato peptídeo de ferro, formado a partir da reação com hidrolisado enzimático parcial de caseína, obteve, através de testes com ratos, nível de biodisponibilidade um pouco inferior (63%) quando comparado ao sulfato ferroso (69%), calculado através dos índices de recuperação de hemoglobina em ratos anêmicos. A porcentagem de biodisponibilidade em relação ao sulfato ferroso foi de 91,0%. Porém, sem ter realizado testes, acreditou haver redução de efeitos colaterais geralmente descritos para sulfato ferroso. O quelato desenvolvido apresentou melhor absorção, proporcionando níveis plasmáticos mais duradouros que o sulfato ferroso e restabeleceu níveis de hemoglobina, embora de forma menos eficiente que o sulfato ferroso. Isto indicou que o quelato foi capaz de, rapidamente, proporcionar quantidades suficientes de ferro disponível para os processos fisiológicos e enzimáticos ferro dependentes, bem como para a síntese de hemoglobina. CHAUD (1993) manteve durante o período reacional, na produção do complexo, um pH igual a 7,8. Seu produto era formado pela

ligação de peptídeos e aminoácidos de um hidrolisado parcial de caseína com ions Fe^{+3} . O autor considerou que neste valor de pH a maioria dos grupamentos carboxílicos dos peptídeos e aminoácidos permanecessem desprotonados facilitando a complexação.

FAIRWEATHER-TAIT *et al.* (1992), avaliando a biodisponibilidade do ferro quelatado com aminoácidos glicina ("Chelazone" da Albion Laboratories New Jersey, USA) em experimentos com animais, apresentou níveis superiores para o quelato em comparação com o sulfato ferroso. A concentração de hemoglobina apresentada pelo grupo alimentado com dietas contendo ferro quelatado foi significativamente ($p < 0,001$) maior do que a concentração de hemoglobina dos animais alimentados com dietas onde o sulfato ferroso estava presente.

PINEDA, (1993) em estudos sobre biodisponibilidade de ferro com aminoácidos quelatados ("Chelazone" da Albion Laboratories New Jersey, USA), demonstrou que em bebês anêmicos 75% do ferro destes aminoácidos quelatados foi absorvido e em relação ao ferro de origem do sulfato ferroso, houve uma absorção de apenas 27%. Em indivíduos não anêmicos, apenas 4% do ferro do sulfato ferroso foi absorvido, em comparação com mais de 15% de ferro absorvido do quelato. Isto indicou uma melhor absorção de ferro do quelato, de cerca de 3 a 4 vezes, ao ferro originado do sulfato ferroso.

Os trabalhos com complexos de ferro têm apontado duas grandes vantagens para sua utilização como suplemento alimentar que são: estabilidade molecular e maior biodisponibilidade do ferro.

A complexação ou a quelação promove a formação de uma estrutura em forma de anel que "protege" os cátions de reações com outros compostos. Diferentes dos sais metálicos, os complexos não reagem com outras substâncias presentes nos alimentos. Não interagem com vitaminas, o que

comumente resulta na destruição destas últimas, e não participam de reações químicas que possam alterar o produto, ao qual são adicionados. Os cátions tornam-se “pouco reativos”, pois estão ligados aos aminoácidos. Esta ligação do mineral ao aminoácido, que impede diversas reações químicas indejesáveis nos alimentos, traz outro benefício que é a maior biodisponibilidade (ASHMEAD *et al.*, 1994). A estabilidade do complexo, permite a absorção do metal pelo intestino de forma intacta, por transporte ativo, como parte de uma molécula semelhante a um aminoácido ou a um dipeptídeo. O complexo não se sujeita às inúmeras reações químicas que interferem na absorção dos íons metálicos inorgânicos (ASHMEAD *et al.*, 1985). Assim, hidrolisados protéicos complexados com ferro têm surgido como uma boa alternativa para o enriquecimento de alimentos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Obter um complexo de ferro, a partir de síntese com hidrolisado protéico ácido de torta de extração do óleo de milho (protenose) com baixo teor de cloreto de sódio com caracterização química e avaliação da biodisponibilidade do ferro ligado.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Determinação das condições exigidas para a formação dos complexos utilizando, além do hidrolisado protéico, os aminoácidos: metionina, lisina e glicina como agentes quelantes.
- * Caracterização química dos complexos formados.
- * Quantificação do percentual de ferro presente nos complexos obtidos.
- * Avaliação da biodisponibilidade do ferro complexado com hidrolisado ácido através da determinação do Índice da Eficiência de Regeneração da Hemoglobina (HRE %) em ratos anêmicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

A matéria-prima utilizada para produção do hidrolisado protéico foi a torta de extração do óleo de milho (protenose) doada pela RMB - Refinações de Milho Brasil Ltda.

Os aminoácidos lisina, glicina e metionina e demais reagentes foram de grau P.A.

“FERROCHEL” (quelato de ferro glicina) cedido pela Albion Laboratories, New Jersey, U.S.A.

Os animais do experimento biológico foram ratos (*Rattus norvegicus*) machos, da linhagem Wistar, var. Albinos (*Rodentia mammalia*), recém desmamados (21 dias) pesando entre 45 e 54 g, provenientes da criação do Bioterio Central do Campus da Universidade Estadual de Campinas.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Determinação da Proteína Bruta

O teor de proteína, na matéria prima utilizada para produção do hidrolisado (protenose) foi determinada através do método semi-micro Kjeldahl. Para cálculo da proteína o teor de nitrogênio foi multiplicado pelo fator de correção de 6,25 de acordo com a AOAC (1984).

4.2.2. Produção do Hidrolisado Protéico Ácido com Baixo Teor de Cloreto de Sódio.

4.2.2.1. Produção do Hidrolisado

A preparação do hidrolisado foi feita segundo metodologia desenvolvida por PRAÇA (1995), que estabelece o teor de matéria-prima de 30% e o de ácido clorídrico de 20%, temperatura de 100°C e tempo de agitação de 8 horas, de modo a obter-se hidrólise das proteínas presentes.

No preparo do hidrolisado, a matéria prima foi adicionada em tambor de polipropileno de alta densidade com capacidade para 50 litros. Em seguida, juntou-se o ácido clorídrico, previamente diluído com água destilada aquecida. Neste recipiente foi instalada uma resistência elétrica industrial, para aquecer a mistura hidrolítica, e um termostato para controlar a temperatura, sendo que, tanto a resistência como o sensor do termostato, foram colocados dentro de tubos de vidro termo-resistentes para evitar o contato direto com o ácido utilizado na hidrólise.

A agitação da mistura para hidrólise, foi feita por uma haste de policloreto de vinila (PVC) em forma de pá e com aleta superior adaptada a um motor elétrico com redução de rotação, de modo que a velocidade fosse de 60 rotações por minuto (Fig. 1).

A contagem de tempo de hidrólise (8 horas) foi iniciada quando a mistura atingiu a temperatura de refluxo, que era aproximadamente de $100 \pm 2^\circ\text{C}$. Após a hidrólise e resfriamento do produto obtido, foi feita uma pré-filtração em sacos de pano e, a seguir, uma filtração em papel de filtro. As filtragens tiveram a função de eliminar as huminas, subproduto sólido de coloração escura formado durante a hidrólise ácida pela condensação de produtos de degradação (oxidação) do triptofano e os carboidratos.

A seguir, procedeu-se a evaporação do ácido clorídrico por destilação à vácuo com injeção de vapor de água.

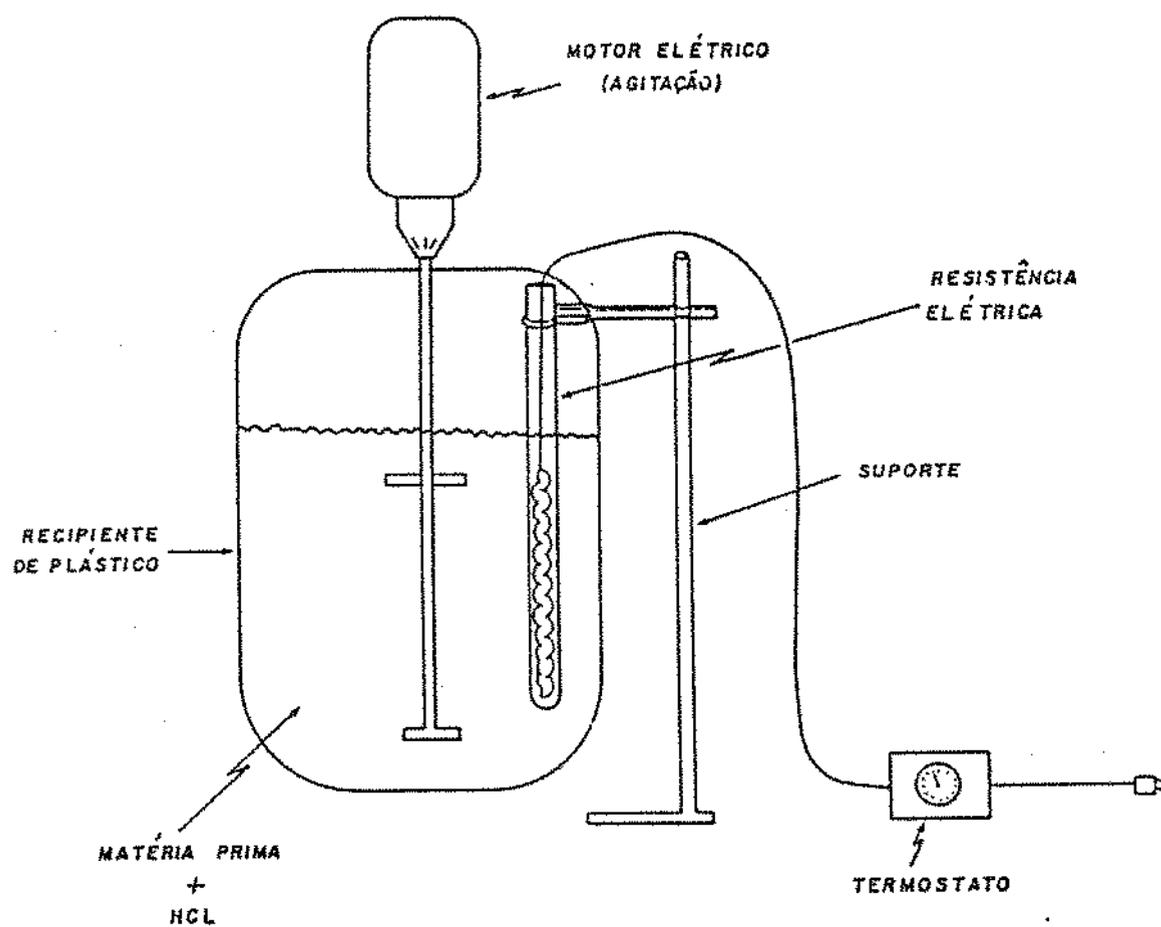


Figura 1 - Sistema de produção do hidrolisado

4.2.2.2. Destilação à Vácuo com Injeção de Vapor de Água

O conjunto de destilação era constituído por uma caldeira (balão de fundo redondo de 2 litros aquecido por manta de aquecimento), um sistema de injeção de vapor, um balão de 1.000 mL que continha a amostra (balão de destilação), um condensador de serpentina (resfriamento) e um sistema para medir vácuo (Fig. 2). Nesse método, o vapor era produzido pelo aquecimento de água destilada até a ebulição e injetado, através do sistema de injeção de vapor, no fundo do balão com amostra, de modo a promover a agitação do hidrolisado.

O vapor de água passava por uma serpentina de alumínio imersa em banho de óleo aquecido a 140°C, para produção de vapor super aquecido.

O balão de destilação era mantido durante todo o processo em banho-maria ($98 \pm 2^\circ\text{C}$) de modo que, o aquecimento do hidrolisado era promovido tanto pelo banho de aquecimento, como pela injeção de vapor, permitindo concentrar o hidrolisado no decorrer da destilação. O tempo de destilação para remoção do ácido clorídrico era de 30 minutos com vácuo de 26 mmHg.

O volume da amostra a ser destilado era de 500 mL, sendo a contagem do tempo de destilação iniciada quando o vácuo em todo o sistema atingia 26 mmHg.

Após a destilação, para a determinação da eficiência do sistema de destilação à vácuo, o volume da amostra foi reconstituído em balão volumétrico e procedida a análise de determinação do teor de cloreto de sódio.

Para os testes de complexação, o hidrolisado dessalinizado foi seco em estufa à 105°C por 4 horas.

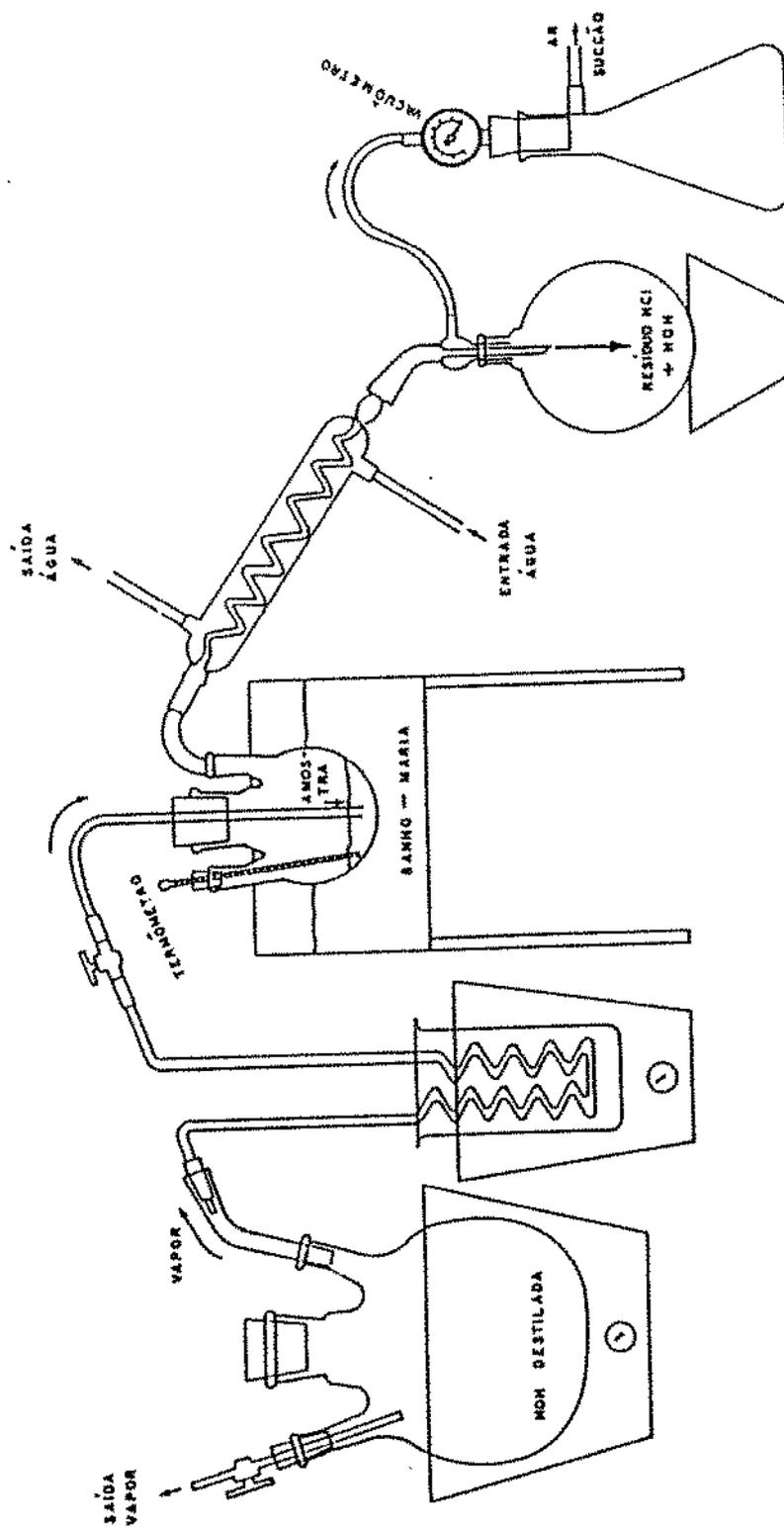


Figura 2 - Sistema de destilação para evaporação a vácuo do ácido clorídrico utilizado na hidrólise.

4.2.3. Determinação do Teor de Cloreto de Sódio

A porcentagem de cloreto de sódio no hidrolisado foi determinada por titulação potenciométrica utilizando-se um potenciômetro B-374 Micronal com eletrodo combinado de prata 6.0404100 (OF) Metrohm específico para cloreto.

Nessa análise mediu-se 10 mL de hidrolisado, com pipeta volumétrica, neutralizou-se a pH 7,0 com hidróxido de sódio e completou-se o volume para 500 mL com água destilada (diluição 1:50). Em seguida foi tomada uma amostra de 20 mL do hidrolisado diluído e titulou-se com solução de nitrato de prata 0,1 M.

4.2.4. Obtenção dos Complexos Orgânicos de Ferro

Devido à complexidade da composição do hidrolisado, foram utilizados, também, os aminoácidos lisina, glicina e metionina na produção de complexos de ferro para comparação com produto obtido pela reação de ferro com o hidrolisado.

A produção dos complexos foi feita a partir da reação de soluções de ferro III, obtidos pela dissolução de cloreto férrico hexaidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), com o hidrolisado protéico ou com os aminoácidos (agentes ligantes ou quelantes). Usou-se o cloreto férrico hexaidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) pois é bastante solúvel, com grau de pureza adequado, acessível no mercado e libera íons férricos (Fe^{+3}). Os complexos obtidos por íons ferrosos (Fe^{+2}) são instáveis na presença de oxigênio, oxidando-se rapidamente (FITZIMMONS, 1.985). As soluções de ferro III foram feitas utilizando-se água destilada de modo a obter-se uma relação constante entre íons Fe^{+3} e os agentes ligantes.

modo a obter-se uma relação constante entre íons Fe^{+3} e os agentes ligantes. Para cada grama de cloreto férrico, utilizava-se 10 mL de água destilada. As condições estudadas no processo foram:

- **pH do meio reacional:** Baseado em trabalhos para a produção de complexos de ferro (CHAUD, 1993; ASHMEAD e LITTLE, 1977; NASSAR e TIERNEY, 1987), observou-se a utilização, de modo geral, de uma faixa de pH entre 7,0 e 8,0, sendo o pH de 7,5 estabelecido para as reações de complexação. Foram feitas misturas de soluções de hidrolisado mais cloreto férrico nas preparações abaixo, as quais foram tituladas com hidróxido de sódio 0,5M:

- 1 mol de N / mol de ferro
- 2 moles de N / mol de ferro
- 3 moles de N / mol de ferro

- **relação molar entre ferro e "agente quelante":** Partindo da suposição arbitrária que os aminoácidos presentes contenham, nas suas moléculas, apenas um átomo de nitrogênio (N), e que a ligação com o ferro deva ocorrer principalmente pelos grupamentos carboxílicos, foram feitos estudos para determinar a relação estequiométrica ferro/aminoácidos.

O teor de nitrogênio foi determinado através de análise elementar C, H, N, num aparelho Perkin-Elmer mod 2400. Baseado no valor obtido, foram feitos ensaios para obtenção dos "compostos de ferro", usando as proporções acima mencionadas.

A avaliação da melhor relação molar foi feita em função de rendimento de produto. Em escala laboratorial obedeceu-se a seguinte metodologia: em soluções de ferro III, obtido pela dissolução de cloreto férrico hexaidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), adicionava-se lentamente os agentes ligantes à temperatura

(FeCl₃ 6H₂O), adicionava-se lentamente os agentes ligantes à temperatura ambiente (25°C) sob agitação constante. Acertava-se o pH para 7,5 com hidróxido de sódio - 0,5 M, havendo então, a formação de um precipitado. Este era filtrado em funil de vidro sinterizado com auxílio de bomba à vácuo. O precipitado era seco à 105°C por 4 horas em estufa e pesado. O cálculo de rendimento foi feito pela comparação entre o peso obtido dos precipitados e o peso teórico esperado. Considerava-se como peso esperado a quantidade de agente ligante somado ao ferro presente no cloreto férrico hexaidratado.

4.2.5. Caracterização dos Complexos Formados

4.2.5.1. Espectroscopia de Infra-Vermelho

A caracterização dos complexos de ferro formados foi feita através da espectroscopia de infra-vermelho. Esta metodologia diz respeito aos movimentos de torção, rotação, deformação e vibração das ligações dos átomos ou grupos de átomos de uma molécula. Quando a radiação infra-vermelha incide sobre a molécula, a mesma absorve energia originando uma multiplicidade de vibrações que ocorrem simultaneamente e, fornecendo um espectro de absorção característico de grupos funcionais e da configuração geral da molécula (COLTHUP *et al.*, 1964). Os espectros de infra-vermelho podem indicar se o ferro está ligado aos aminoácidos e qual o provável sítio desta ligação.

Na preparação das amostras foi utilizada a técnica de pastilha, onde a amostra é finamente pulverizada, misturada com brometo de potássio (KBr) e comprimida em prensa hidráulica (Schwing Siwa - 15 toneladas) para a produção de uma pastilha.

O aparelho utilizado foi Perkin-Elmer FTIR mod. 1505.

4.2.5.2. Espectroscopia de Fluorescência de Raio-X

A espectroscopia de fluorescência de raio-X foi utilizada na análise qualitativa dos complexos, ou seja, na avaliação da presença de metal. A formação do espectro característico de fluorescência de raio-X, é consequência da irradiação da amostra, por exemplo, por um feixe primário de um tubo de raio-X. A excitação resultante da absorção fotoelétrica de um fóton de raio-X, promove a ejeção de um elétron de uma camada interna do átomo. O átomo, ao regressar ao estado fundamental, pela transferência de um elétron de camadas externas para interna, promove a emissão de energia sob forma de raio-X, equivalente à diferença de potencial entre os dois estados (WILLARD, 1974).

O aparelho utilizado foi Espectrômetro de Fluorescência de Raio-X de Energia Dispersiva-Spectrace 5000.

As amostras foram finamente pulverizadas (400 mesh) e comprimidas na forma de pequenos bastonetes.

4.2.6. Determinação do Teor de Ferro

As análises do teor de ferro, presente nos complexos formados e nas dietas utilizadas no ensaio biológico, foram feitas pela técnica de absorção atômica, usando o aparelho Perkin-Elmer, mod 5000.

Na espectroscopia de absorção atômica, a amostra é introduzida numa chama onde sofre dessolvatação, vaporização e atomização. Há emissão de irradiação, proveniente de uma fonte externa, correspondente à energia

necessária para a transição eletrônica do estado fundamental a um estado excitado. A absorção das radiações é dependente da população dos átomos no estado fundamental, ou seja, à concentração da solução distribuída na chama. A quantificação é feita pela diferença entre o sinal transmitido na presença e na ausência do elemento a se quantificar (WILLARD, 1974). As leituras foram realizadas nas soluções de amostras calcinadas à 550°C em mufla, solubilizadas com ácido clorídrico e diluídas com água deionizada segundo normas do Instituto Adolfo Lutz. O aparelho foi calibrado segundo as condições abaixo recomendadas (PERKIN-ELMER, 1982) para determinação de ferro:

Comprimento de onda 248,3 nm

Corrente da lâmpada 30 mA

Abertura espectral da fenda 0,2 nm

Chama (oxidante) Ar-acetileno

Vazão 50 -45 L/min

Como padrão, foi utilizado óxido de ferro P.A. (Fe_2O_3) nas concentrações 2 a 4 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.7. Determinação do Nitrogênio

O teor de nitrogênio foi determinado através da análise elementar C, H, N do hidrolisado dessalinizado e seco. A análise foi realizada em Analisador Elementar Perkin-Elmer mod 2400.

4.2.8. Recuperação dos Níveis de Hemoglobina em Ratos Anêmicos.

A metodologia empregada para avaliar o aproveitamento biológico do ferro de alimentos em ratos, foi baseada no método da recuperação dos níveis de hemoglobina conforme referido nas normas da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1984).

O ensaio biológico utilizado para estudar a biodisponibilidade do ferro presente no complexo orgânico de hidrolisado protéico é curativo e, portanto, é dividido em duas fases: obtenção dos anêmicos e recuperação dos níveis de hemoglobina.

A dieta basal (pobre em ferro) utilizada no período de depleção foi preparada segundo as especificações da AOAC (1984).

A composição percentual da dieta é apresentada na Tabela 4 e as composições das misturas mineral e vitamínica na Tabela 5.

As rações utilizadas no período de recuperação foram preparadas pela adição, à dieta basal, de sulfato ferroso heptaidratado (grupo padrão) e de complexo orgânico de ferro do hidrolisado protéico (grupo teste) numa concentração tal que fornecesse 35 mg de ferro por quilo de dieta. As concentrações de ferro nas dietas foram determinadas por espectroscopia de absorção atômica.

Tabela 4 - Composição porcentual da dieta à base de caseína (Dieta Basal)

Componentes	g/100g
Glicose	49,38
Amido	20,00
Gelatina	15,00
Óleo de milho	5,00
Fosfato monossódico	5,00
Carbonato de cálcio	2,00
Cloreto de potássio	2,00
Sal iodado	0,50
Cloreto de colina	0,15
L. Metionina	0,10
Mistura Mineral (1)	0,27
Mistura Vitamínica (2)	0,10

(1) (2) Composição específica na Tabela 5

Fonte: AOAC, 1984

Tabela 5 - Composição das misturas salina e vitamínica utilizadas no preparo das dietas

MISTURAS

(1) Mineral	g/100g
Sulfato de magnésio	73,816
Sulfato de zinco	19,657
Sulfato de manganês	5,733
Sulfato de cobre	0,731
Iodeto de potássio	0,0625
(2) Vitamínica	
Vitamina A 500.000 UI/g	1,00
Vitamina D3 200.000 UI/g	0,75
Acetato de tocoferol	5,00
Menadiona	0,04
Cloridrato de tiamina	0,30
Riboflavina	0,30
Cloridrato de piridoxina	1,00
Pantotenato de cálcio	1,00
Niacina	3,00
Ácido fólico	0,10
Vitamina B 12 0,1 % em gelatina	2,00
Sacarose	85,51

Fonte: AOAC, 1984

Na formulação das rações necessárias ao experimento utilizou-se somente material de vidro, plástico ou aço inoxidável, previamente imersos em ácido nítrico à 30% por 2 horas e, posteriormente, enxaguados abundantemente com água deionizada e secos em estufa.

Os compostos sólidos das dietas eram misturados manualmente em recipientes plásticos e passados em tela plástica. O material retido era triturado e novamente peneirado. Após acrescentar óleo, a ração obtida era peneirada por mais seis vezes. As dietas prontas foram armazenadas em sacos plásticos e conservadas em câmara fria (4°C).

Fase de Depleção

Nesta primeira fase, ratos machos recém-desmamados foram colocados em gaiolas individuais de aço inox em condições de temperatura (22°C), umidade e ciclo de luz controladas, recebendo dieta basal pobre em ferro (8 ppm) e água deionizada "ad libitum" durante trinta e cinco dias. Após este período o sangue foi colhido da cauda através de pequeno corte. A hemoglobina foi dosada e os animais pesados. Os ratos foram considerados anêmicos quando a média de hemoglobina estava ao redor de 6 g/dL.

Fase de Recuperação

Na fase de recuperação dos níveis de hemoglobina, com duração de quatorze dias, os animais anêmicos foram distribuídos em três grupos de seis animais cada, observando a concentração de hemoglobina (g/dL) e peso (g) de modo a obter a menor variação possível intra e inter grupos.

Grupo Controle: Formado por 6 animais que consumiram ração basal (pobre em ferro) e água deionizada "ad libitum" por 14 dias.

Grupo Padrão: Formado por 6 animais que receberam dieta basal suplementada com sulfato ferroso (35 mg/kg de ração) e água deionizada "ad libitum" por 14 dias.

Grupo Teste: Formado por 6 animais que tiveram a dieta basal adicionada de complexo orgânico de ferro do hidrolisado (35 mg/kg de ração) e água deionizada "ad libitum" por 14 dias.

Após este período, o sangue foi novamente colhido da cauda, através da secção de um pequeno segmento para determinação do nível de hemoglobina.

4.2.8.1. Dosagem de Hemoglobina

Os níveis de hemoglobina foram determinados pelo método de cianometahemoglobina (CROSBY *et al.*, 1954).

O sangue coletado dos animais (0,02 mL) foi transferido para tubo de ensaio com 5 mL de solução de Drabkin (AOAC, 1984). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotometro (Beckmam, mod.D.U. 70) na região do visível, comprimento de onda 540 nm. Os resultados em absorbância foram convertidos em gramas de hemoglobina por decilitros através do produto da absorbância por um fator, calculado a partir de um padrão de hemoglobina.

4.2.8.2. Determinação da Utilização Biológica do Ferro

Utilizando os dados colhidos no ensaio biológico determinou-se a biodisponibilidade do ferro através do Índice da Eficiência de Regeneração da Hemoglobina (HRE %) segundo MAHONEY *et al.* (1974).

A porcentagem de biodisponibilidade foi calculada em termos da eficiência de conversão do ferro dietético para ferro hemoglobínico. Para isso, dividiu-se o ganho de ferro hemoglobínico (mg) pelo total de ferro ingerido durante o período de repleção e o resultado expresso em porcentagem.

O peso dos animais (g) e os níveis de hemoglobina (g/dL) foram utilizados para calcular o ferro hemoglobínico. Considerou-se que o volume total de sangue no rato fosse de 6,7% do peso corpóreo e que o conteúdo de ferro hemoglobínico fosse de 3,35 mg de ferro elementar para cada grama de hemoglobina (MAHONEY *et al.*, 1980).

Depois de calculada a porcentagem de biodisponibilidade do ferro da ração padrão (sulfato ferroso), a porcentagem da biodisponibilidade relativa ao sulfato ferroso foi obtida dividindo-se a porcentagem da biodisponibilidade do ferro da ração teste (complexo orgânico de ferro) pela biodisponibilidade de ferro do sulfato ferroso e multiplicado por 100.

4.2.8.3. Análise Estatística

Depois de calculada a porcentagem da biodisponibilidade do ferro em termos de Eficiência de Conversão de Hemoglobina os dados foram analisados estatisticamente (ANOVA) para verificação da existência de diferença significativa entre a biodisponibilidade do sulfato ferroso e do complexo de ferro.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRODUÇÃO DO HIDROLISADO ÁCIDO COM BAIXO TEOR DE CLORETO

A princípio, toda matéria prima protéica pode ser submetida à uma hidrólise, sendo as de origem vegetal comumente utilizadas, (PRENDERGAST, 1974). Em função da disponibilidade, baixo custo e teor de proteína (64%), a protenose foi utilizada como matéria-prima no preparo do hidrolisado. Contudo, diversos produtos protéicos, oriundos de resíduos industriais, podem ser aproveitados para a obtenção de hidrolisados.

O hidrolisado protéico foi obtido com a finalidade de ser uma fonte de aminoácidos de custo reduzido para produção de complexos de ferro. Metais complexados exigem, para um bom aproveitamento biológico, que a molécula formada tenha uma massa molecular total, incluindo o metal, abaixo de 1500 Daltons, para que penetre na célula da membrana intestinal sem requerer uma hidrólise intra-luminal adicional (ASHMEAD *et al.*, 1985). Desta forma, optou-se por uma hidrólise ácida, para que houvesse um maior número de aminoácidos livres disponíveis para a complexação e, também, pelo fato de ser, a hidrólise ácida, o método mais utilizado industrialmente para a produção de hidrolisados protéicos (PRENDERGAST, 1974).

Procedeu-se à remoção do ácido clorídrico residual, para que se evitasse gastos excessivos de hidróxido de sódio, durante ajuste de pH, necessário para a formação dos complexos. Com este procedimento impediu-se também que o produto final tivesse altos teores de sódio.

A metodologia utilizada na preparação do hidrolisado proporcionou a obtenção de um produto desidratado com alto teor protéico (45,4%). A tabela 6 apresenta a composição elementar do hidrolisado dessalinizado e seco.

A tabela 7 demonstra os teores de cloreto de sódio, indicando uma redução de 76,36% no teor de sal.

Tabela 6 - Composição elementar do hidrolisado dessalinizado e seco.

Elemento	Porcentagem em base seca (%)*
Carbono (C)	33,87 ± 0,27
Hidrogênio (H)	5,95 ± 0,07
Nitrogênio (N)	7,27 ± 0,06

* Média de três determinações ± desvio padrão

Tabela 7 - Teores de cloreto de sódio no hidrolisado

Tempo (min)	% de NaCl #	% de NaCl eliminado *#
0	16,5	---
30	3,9	76,36

NaCl residual

* % Na Cl eliminado=100 -

% NaCl inicial

Média de três determinações.

5.2. PRODUÇÃO DOS COMPLEXOS DE FERRO

Os hidrolisados protéicos são constituídos por uma mistura de compostos, além dos aminoácidos. Pode-se encontrar aldeídos, furanos e em menores quantidades lactonas, fenóis e outras. Os hidrolisados ácidos apresentam portanto, uma complexidade de substâncias químicas (MANLEY e FERGERSON, 1970). Por isto fez-se a opção por trabalhar também, com aminoácidos puros para a produção dos complexos com a finalidade de facilitar a compreensão das modificações químicas em virtude da complexação e avaliação do rendimento.

Na reação de complexação com ferro, observou-se a melhor proporção entre mineral/agente quelante e o pH mais adequado, uma vez que são condições importantes para promoção da ligação química entre as substâncias.

Em vista de uma série de experimentos (ASHMEAD e LITTLE, 1977; NASSAR e TIERNEY, 1987; CHAUD, 1993), onde se trabalhou com hidrolisados protéicos para a produção de complexos de metais bivalentes, numa faixa de pH próximo a 7,5, foram feitos, no presente trabalho, titulações com hidróxido de sódio em soluções de hidrolisado protéico mais cloreto férrico (Figuras 3, 4 e 5), considerando o pH de 7,5 adequado para a reação de complexação.

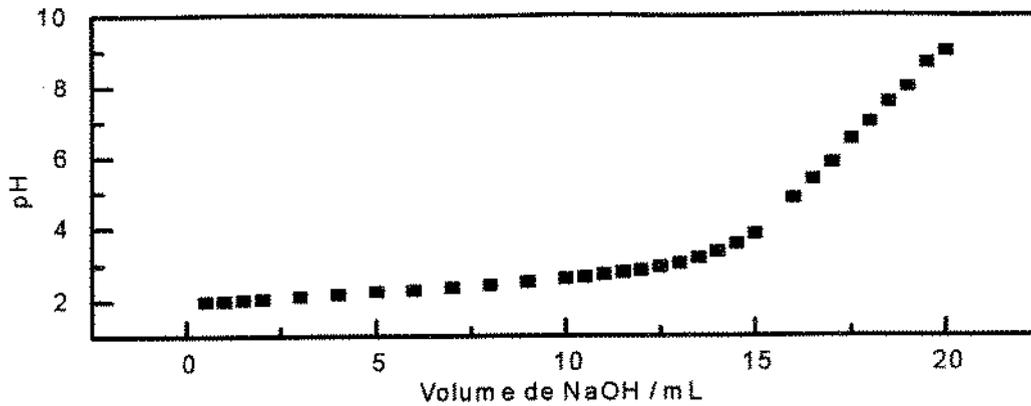


Figura 3 - Curva de titulação da solução de íons Fe^{3+} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e hidrolisado com hidróxido de sódio 0,5 M (1 mol de N / mol de ferro).

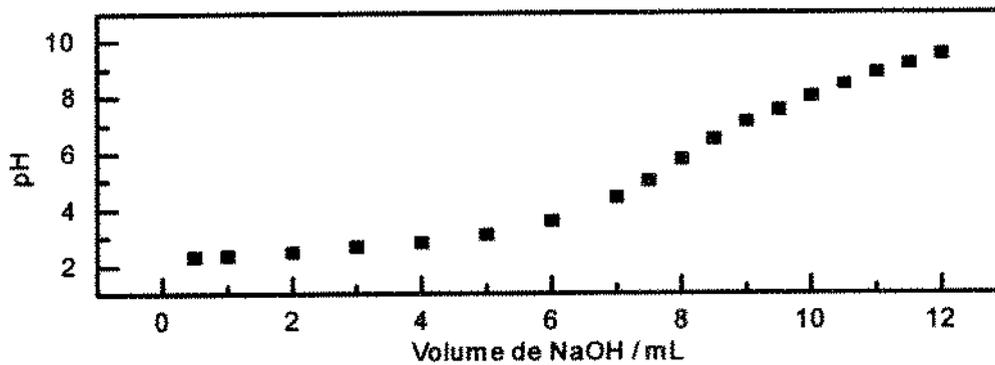


Figura 4 - Curva de titulação da solução de íons Fe^{3+} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e hidrolisado com hidróxido de sódio 0,5 M (2 moles de N / mol de ferro).

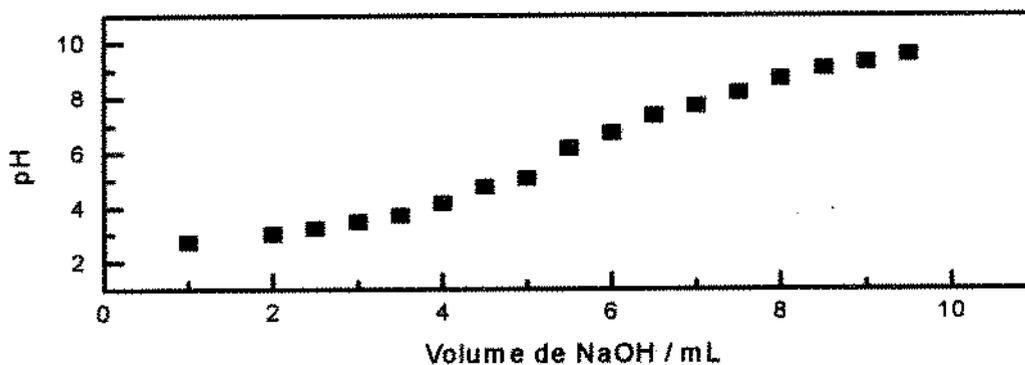


Figura 5 - Curva de titulação da solução de íons Fe^{3+} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e hidrolisado com hidróxido de sódio 0,5 M (3 moles de N / mol de ferro).

Na estimativa da reação entre aminoácidos e íons férricos, considerou-se que cada nitrogênio era formador de um aminoácido e este teria como principal sítio de ligação os grupamentos carboxílicos (ASHMEAD, 1987). O teor de nitrogênio do hidrolisado seco foi de 7,27 %. Portanto cada grama possui aproximadamente 0,07 g de nitrogênio. Cada 200 g de hidrolisado possui cerca de 14,5 g de nitrogênio o que corresponde a aproximadamente 1 mol de nitrogênio. Estes valores foram utilizados para cálculo da relação molar do hidrolisado.

As tabelas, (8, 9, 10 e 11) a seguir ilustram os experimentos realizados para determinação do melhor rendimento, em função da relação molar entre o cloreto férrico e aminoácidos na complexação. Em vista da quantidade do produto final, ou seja, da porcentagem de produto obtido em função de produto esperado concluiu-se que, das relações molares estudadas entre aminoácidos e íons férricos, a mais adequada foi de 1:1.

Tabela 8 - Rendimento, em função da relação molar entre o nitrogênio (N) e o íon férrico (Fe^{+3}), do hidrolisado dessalinizado e seco, na produção do complexo

Hidrolisado (g)	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (g) *MM = 270	Relação N/Fe	Rendimento %
2,0106	2,7557	1:1	84,5
4,0675	2,7759	2:1	53,5
6,0450	2,7045	3:1	39,9

*MM = Massa Molar

Tabela 9 - Rendimento, em função da relação molar entre aminoácido glicina (AA) e o íon férrico (Fe^{+3}), na produção do complexo.

Glicina (g) *MM = 75,07	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (g) *MM = 270	Relação AA/Fe	Rendimento %
0,7570	2,7582	1:1	80,5
1,5052	2,7552	2:1	67,0
2,2521	2,7352	3:1	42,0

*MM = Massa Molar

Tabela 10 - Rendimento, em função da relação molar entre aminoácido lisina (AA) e o íon férrico (Fe^{+3}) na produção do complexo

Lisina (g) *MM = 146	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (g) *MM = 270	Relação AA/Fe	Rendimento
1,4635	2,7591	1:1	85,5
2,9828	2,7047	2:1	62,0
4,4785	2,7010	3:1	46,4

*MM = Massa Molar

Tabela 11 - Rendimento, em função da relação molar entre o aminoácido metionina (AA) e o íon férrico (Fe^{+3}) na produção do complexo

Metionina (g) *MM = 149	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (g) *MM = 270	Relação AA/Fe	Rendimento %
1,4945	2,7609	1:1	83,8
2,9839	2,7598	2:1	62,5
4,4713	2,7078	3:1	45,0

* MM = Massa Molar

5.3. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS FORMADOS

A caracterização dos complexos formados foi realizada através de métodos espectrográficos, contudo, ainda nos dias de hoje, não há uma metodologia oficial para avaliação das estruturas dos complexos orgânicos com metais, sejam quelatos ou proteínatos (HOLWERDA, 1995).

5.3.1. Espectrometria de Infra-Vermelho

Foram feitos espectros dos aminoácidos puros, dos aminoácidos complexados na relação molecular estabelecida, do hidrolisado ácido e do complexado (Figuras 6 à 13). Para comparação do comportamento, no infra-

vermelho, foram analisados os espectros do quelato ferro-glicina da Albion Laboratories e de um acetato básico de ferro produzido nas mesmas condições que os demais complexos, obtidos da relação molar de 1 : 1 de ácido acético e cloreto ferrico hexaidratado (anexo nº 05). As análises indicam que, possivelmente, houve a formação de um "aminocarboxilato" de ferro, ou seja a estrutura química obtida, provavelmente, envolve o ferro ligado aos aminoácidos através da carboxila.

A região do infra-vermelho de 4.000 à 1.300 cm^{-1} é denominada de "zona das frequências de grupos", na qual pode-se atribuir unidades vibracionais que dependem do grupo funcional que provocou a absorção. A posição do grupamento carbonila se estende na região de 1825 à 1575 cm^{-1} (WILLARD, 1974). Pela comparação dos espectros dos aminoácidos e dos complexos, percebe-se que ocorrem alterações das bandas nesta região. Isto se deve, provavelmente, à coordenação do grupo carboxila. Bandas na região de 2.100 cm^{-1} características do grupamento NH_3^+ (FITZSIMMONS, 1985) estão ausentes no espectro dos complexos, indicando desprotonação e possível coordenação do grupamento NH_2 . Por outro lado, o espectro de infra-vermelho do acetato básico de ferro (vide anexo nº 5) que foi preparado nas mesmas condições que os "complexos" do hidrolisado, é muito semelhante aos espectros destes últimos. Isto poderia indicar que não há ligação do NH_2 ao ferro. Se isto for verdadeiro, teremos "aminocarboxilatos" e não complexos propriamente ditos.

Os dados fornecidos por literatura (KRATZER e VOHRA, 1986; ASHMEAD *et al.*, 1985) indicam como principal sítio de ligação o grupamento carboxílico. O quelato produzido por CHAUD (1993) também apresentou grupamentos carboxílicos como principal sítio de ligação e em menor extensão os grupamentos amínicos.

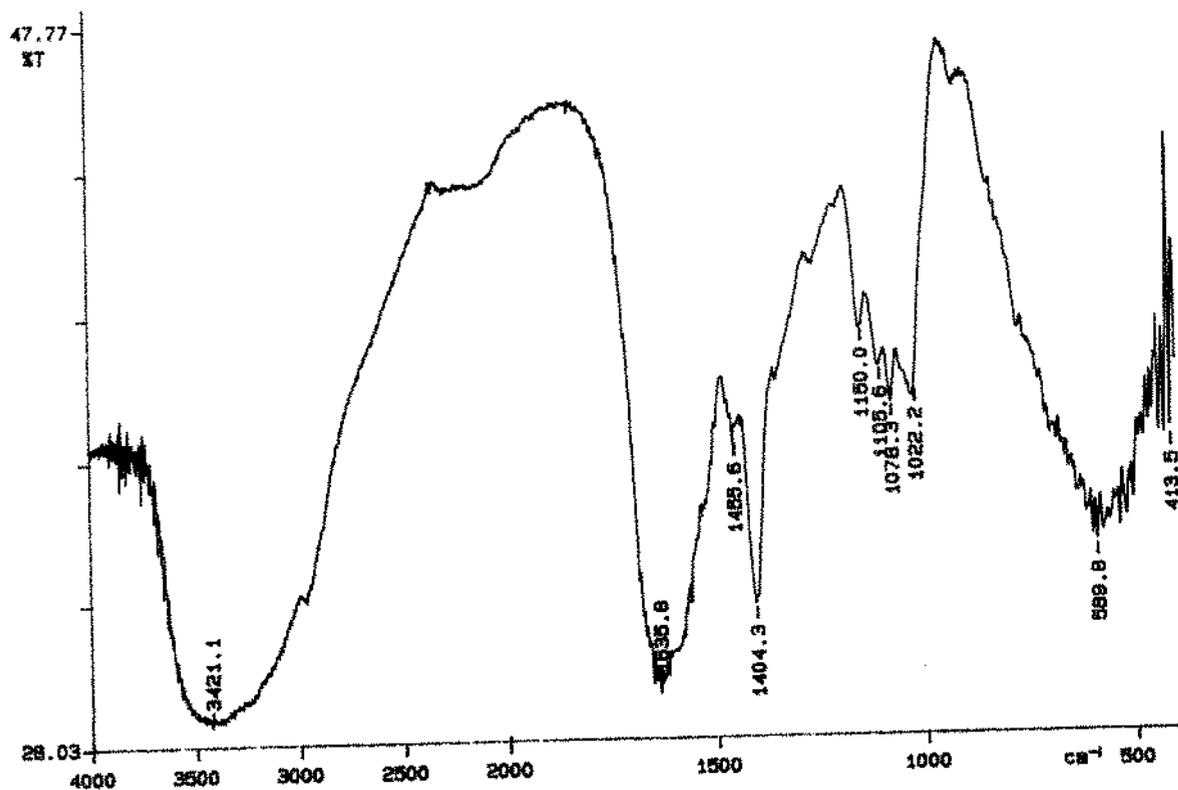


Figura 6 - Espectro de infra-vermelho do hidrolisado dessalinizado e seco (105°C / 4 horas)

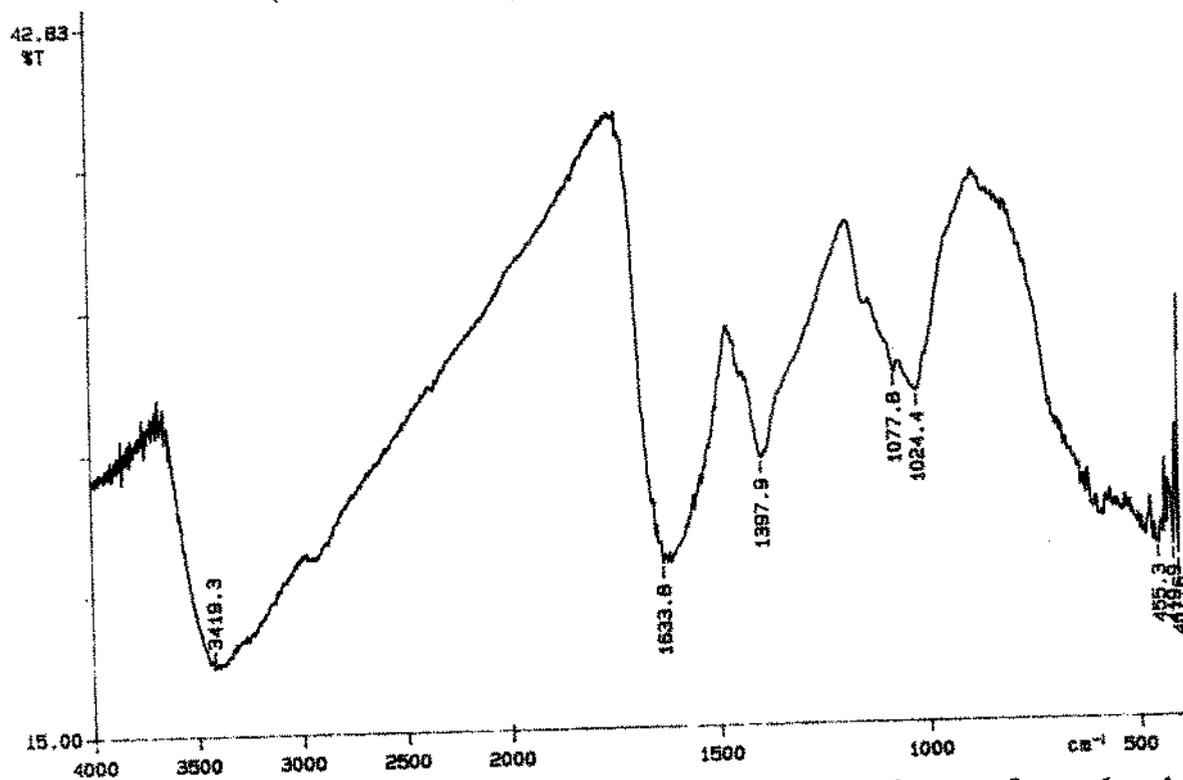


Figura 7 - Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons $\text{Fe}^{+3}(\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ mais hidrolisado. Relação molar de 1 mol de N/ mol de ferro.

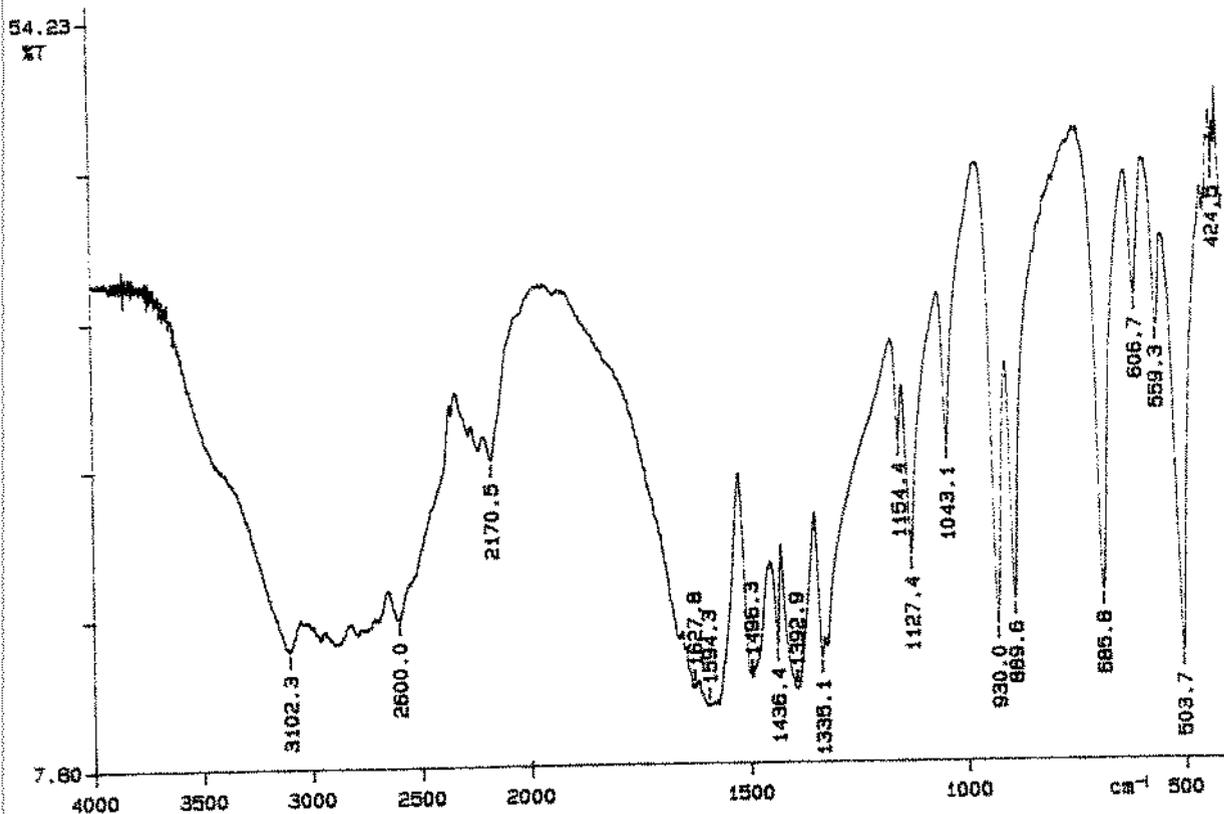


Figura 8 - Espectro de infra-vermelho do aminoácido glicina.

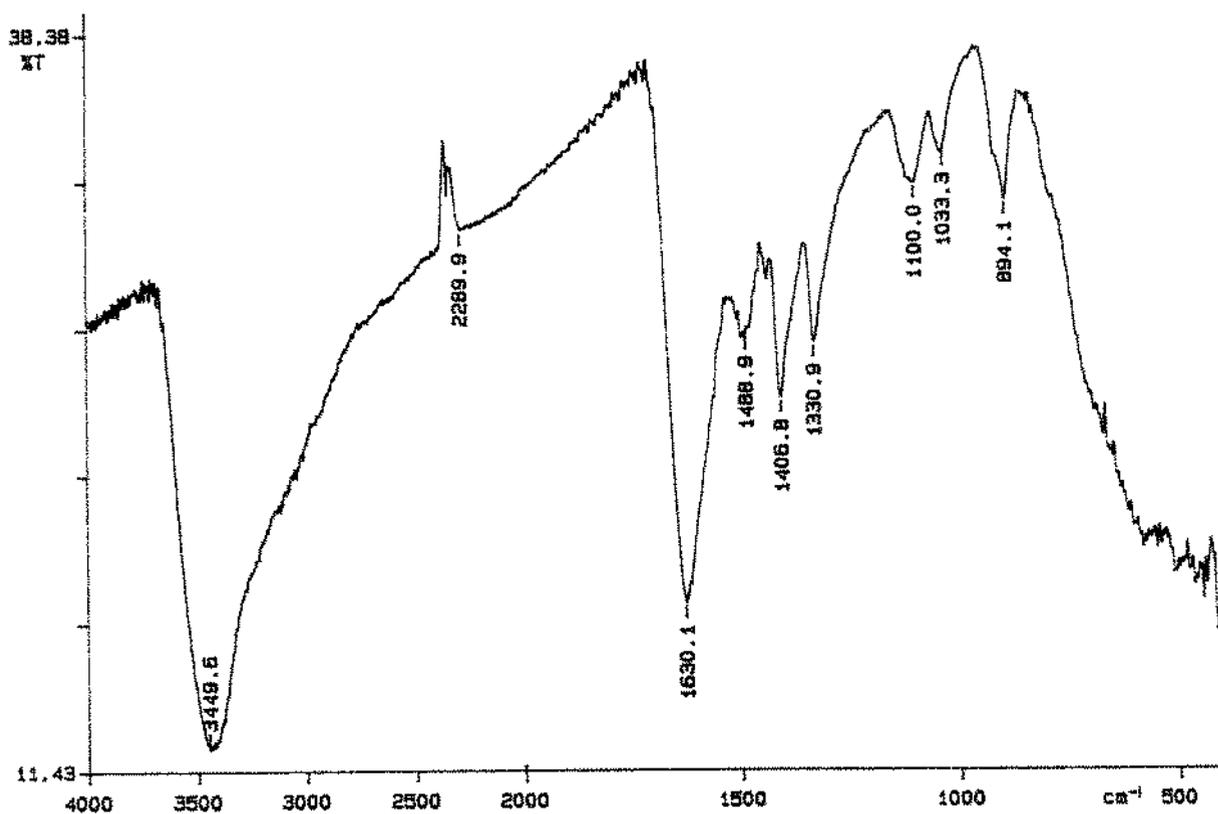


Figura 9 - Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons Fe³⁺ (FeCl₃ 6H₂O) mais glicina. Relação molar de 1 mol de N / mol de ferro.

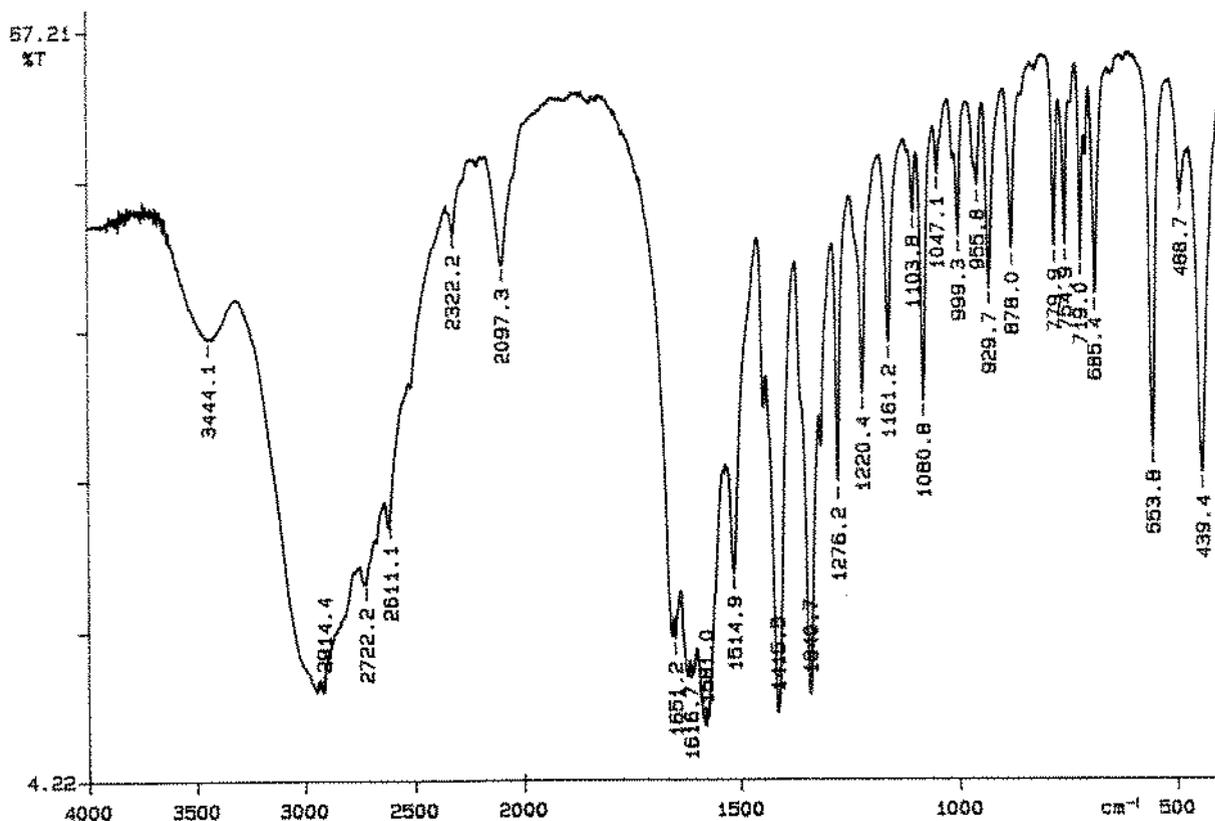


Figura 10 - Espectro de infra-vermelho do aminoácido metionina.

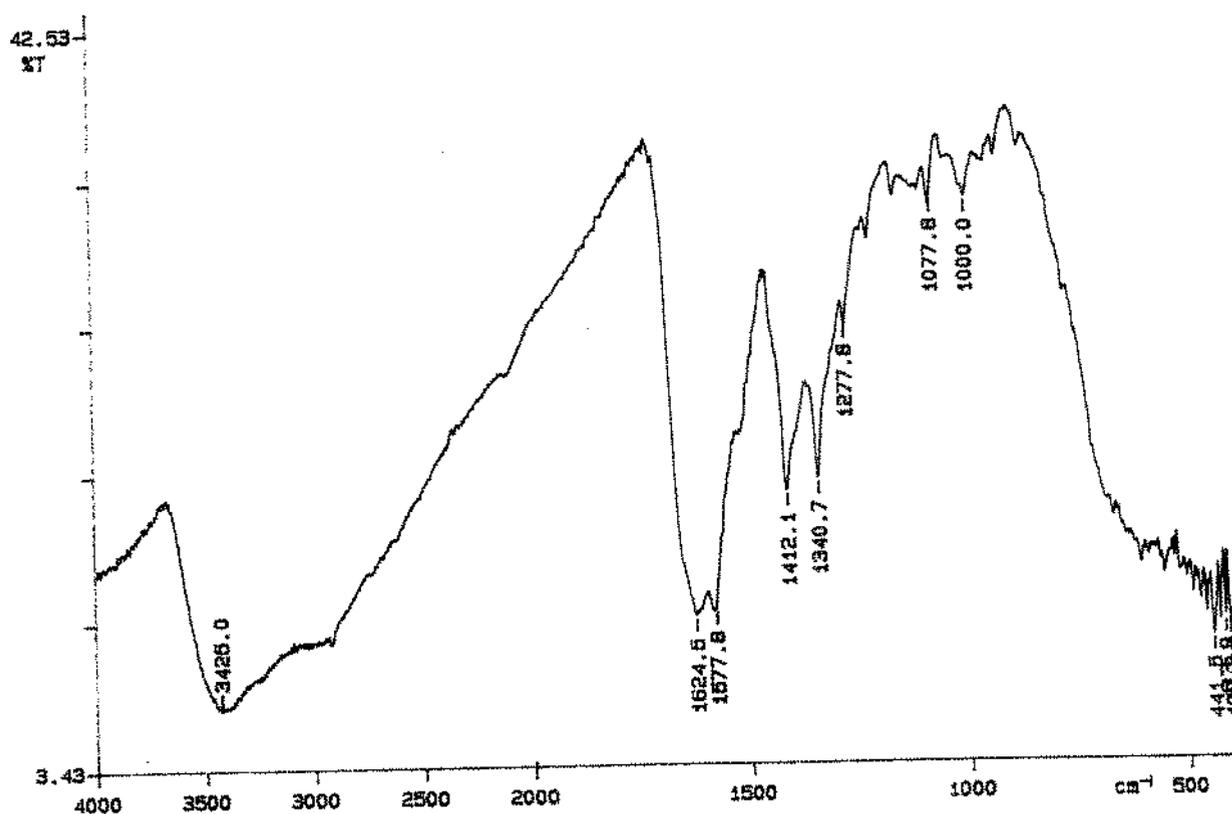


Figura 11 - Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons Fe³⁺ (FeCl₃ 6H₂O) mais metionina. Relação molar de 1 mol de N / mol de ferro.

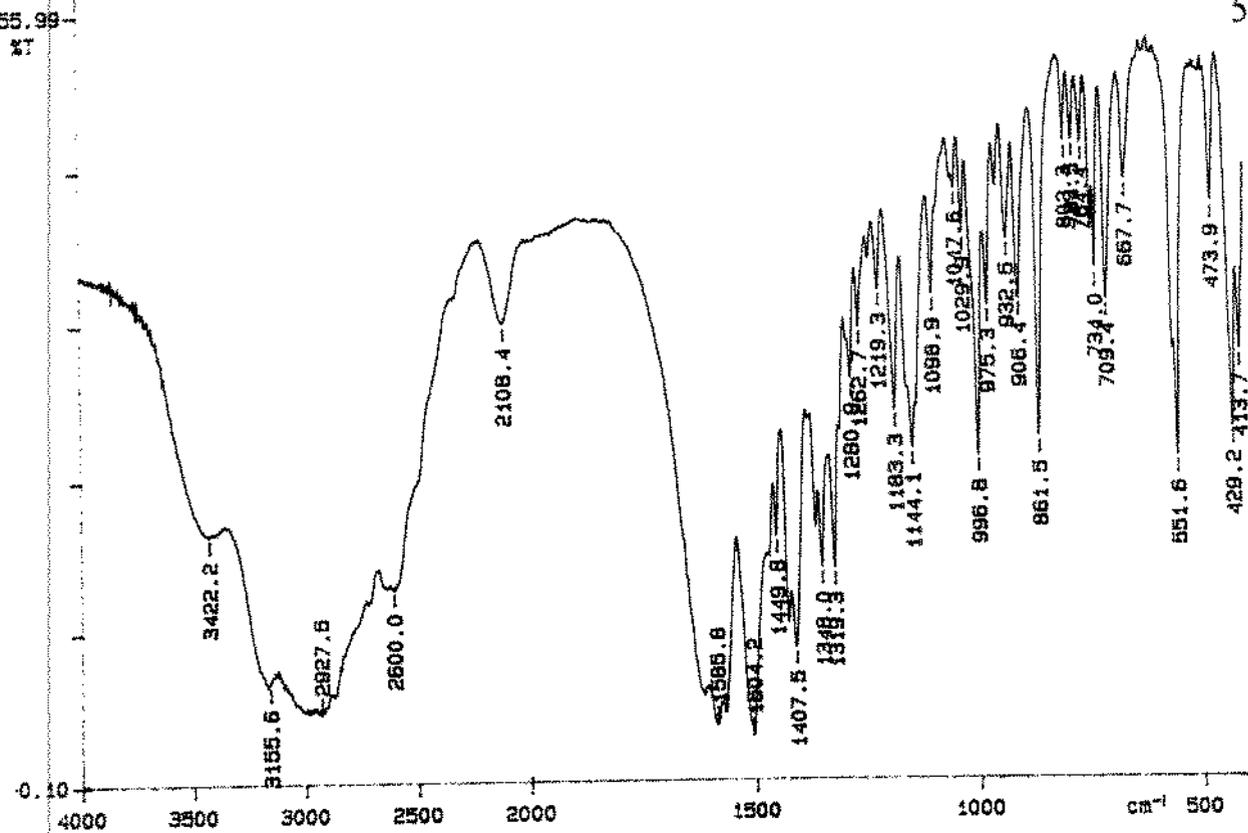


Figura 12 - Espectro de infra-vermelho do aminoácido lisina.

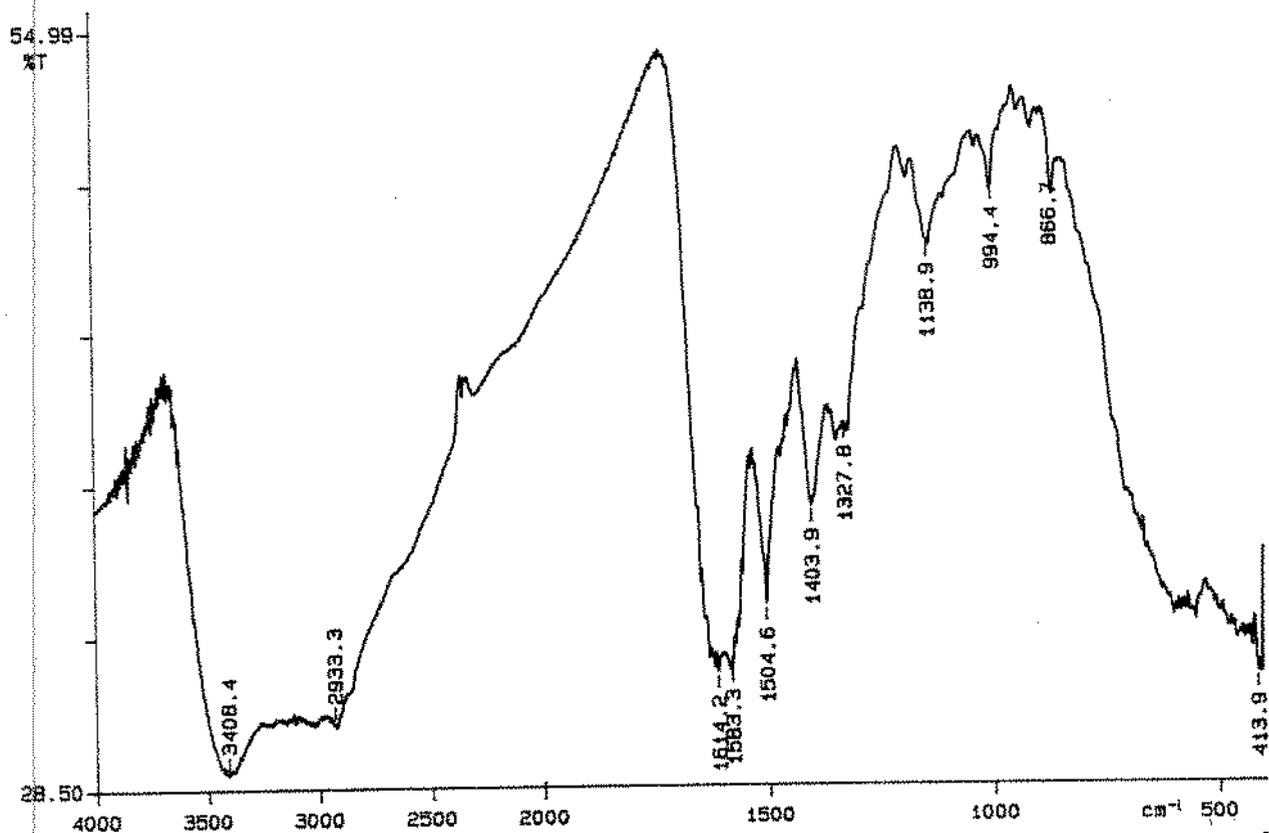


Figura 13 - Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) mais lisina. Relação molar de 1 mol de N / mol de ferro.

5.3.2. Espectrometria de Fluorescência de Raio X

O espectro de fluorescência de raio-X (Figura 14) obtido para o hidrolisado complexado indica de modo qualitativo a presença do ferro no hidrolisado. Esta metodologia fornece apenas informações sobre a presença do elemento ferro no produto, mas não indica se o ferro está ligado ou livre. As linhas espectrais são características do elemento ferro e correspondem, respectivamente, ao $FeK\alpha$ e $FeK\beta$.

Não foi possível a quantificação por esta análise devido à dificuldade encontrada na preparação de uma curva padrão. O material (hidrolisado seco) usado como matriz onde se adicionaria os padrões de ferro (óxido de ferro) em diferentes proporções, devido ao seu caráter higroscópico, não oferecia condições adequadas para obtenção de uma curva padrão.

5.3.3. Espectrometria de Absorção Atômica

A determinação do teor de ferro nos complexos foi feita pela espectrometria de absorção atômica e estão apresentados na tabela 12. Os valores obtidos nos complexos de aminoácidos simples foram superiores ao do complexo de hidrolisado. Isto talvez se deva à própria pureza dos aminoácidos, não havendo possíveis interferentes nas reações de complexação. O complexo do hidrolisado com um teor de $25,9\% \pm 0,27$ apresenta um valor bastante próximo ao do quelato produzido por CHAUD (1993) que é de 25%, apesar do metodologia de produção ser ligeiramente diferente.

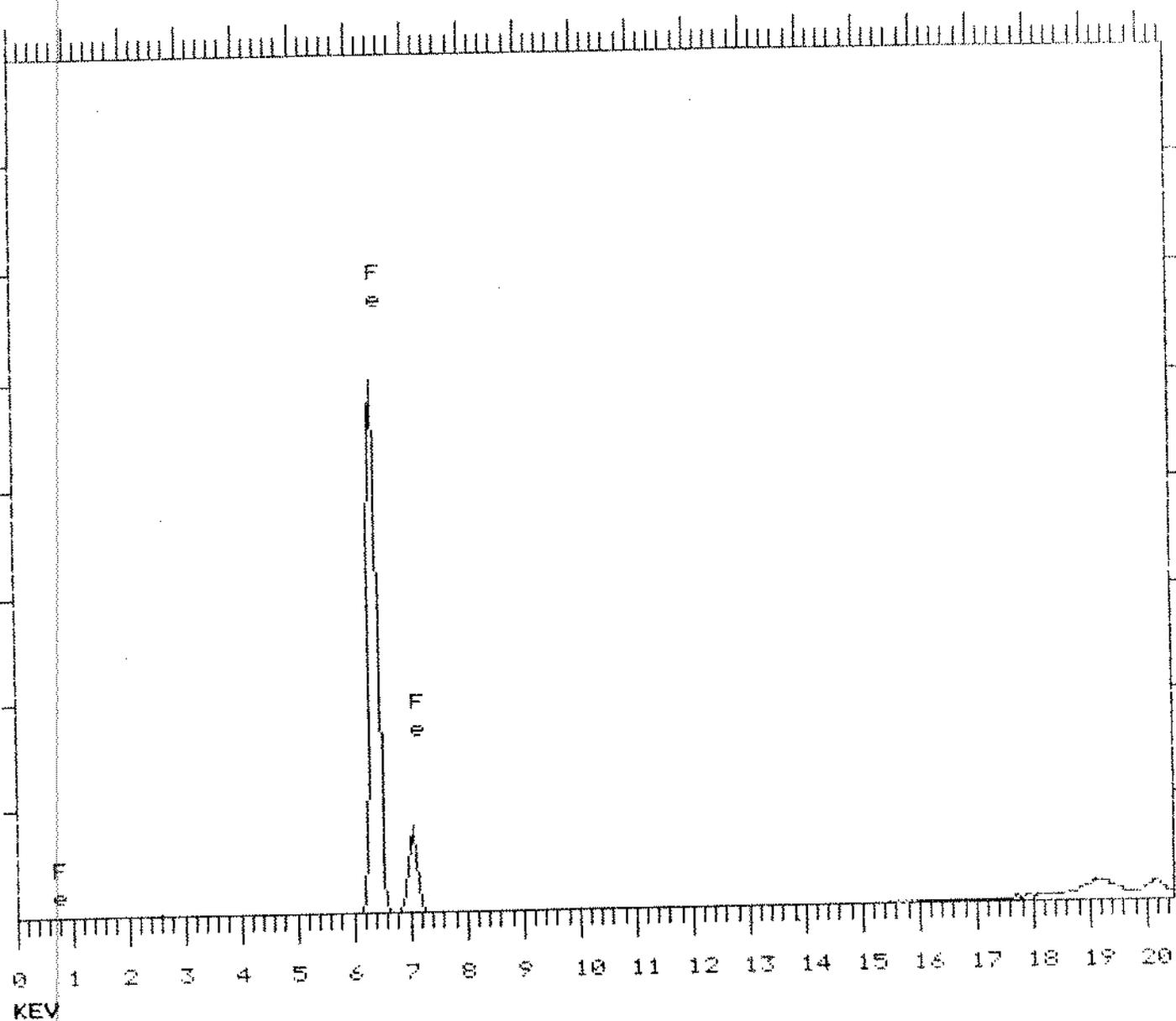


Figura 14 - Espectro de fluorescência de raio-X do complexo obtido do hidrolisado mais íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Relação molar 1:1).

Tabela 12 - Teores de ferro obtidos por absorção atômica para os produtos de relação molar N/Fe 1:1

Produto	Porcentagem de ferro (%)*
Complexo do hidrolisado	25,90 ± 0,27
Complexo de glicina	29,50 ± 0,60
Complexo de metionina	29,70 ± 0,62
Complexo de lisina	29,30 ± 0,37
Ferrochel	20,20 ± 0,12

* Média de três determinações ± desvio padrão

5.4. AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DO FERRO DO COMPLEXO DO HIDROLISADO PROTÉICO PELO ÍNDICE DE REPLEÇÃO DE HEMOGLOBINA

A biodisponibilidade de um nutriente reflete a soma dos efeitos de todos outros fatores de absorção, transporte, organização celular, estoque e excreção do elemento. Assim sendo, nenhuma técnica ou modelo animal é perfeito para um estudo de biodisponibilidade de um nutriente (GREGER, 1992).

As limitações no rato como modelo para seres humanos na avaliação da biodisponibilidade de ferro em alimentos se devem a diferença de utilização deste metal entre ratos e humanos. O metabolismo do rato é mantido principalmente pelo ferro dietético, na sua forma "não heme" e apresentado também, maiores perdas basais (DALLMAN *et al.*, 1982). Entretanto, para estudos de metabolismo mineral, o paralelismo com humanos e ratos são geralmente bastante consistentes (GREGER, 1992). Diversos trabalhos, como os desenvolvidos por SCHRICKER *et al.* (1981) e FORBES *et al.* (1989), têm

demonstrado que testes com ratos têm sido um bom modelo para prever a biodisponibilidade de ferro em diferentes fontes de alimentos, através de dados relativos à utilização de uma fonte referência, geralmente o sulfato ferroso.

A biodisponibilidade de ferro em alimentos expressa em termos de eficiência de sua conversão em ferro hemoglobínico, segundo MAHONEY (1974), é útil porque é capaz de prever respostas hematínicas para qualquer quantidade de ferro do alimento consumido, além disso, tem a vantagem de utilizar apenas um quarto dos animais exigidos no método da AOAC (1984), pois apenas um nível de ferro na dieta é testado (FORBES *et al.*, 1989).

Os resultados encontrados na determinação do aproveitamento biológico do complexo de ferro obtido a partir do hidrolisado protéico, em relação ao sulfato ferroso estão apresentados na tabela 13. Todos os animais tiveram ganho de peso no período de repleção.

No presente ensaio a porcentagem de biodisponibilidade do sulfato ferroso foi de 54,4%, com nível de ferro nas dietas de 35 mg/kg de ração, sendo bastante próximos aos valores obtidos por BIANCHI (1988) de 52,80%. CABRAL (1990) obteve 50,60% de biodisponibilidade do sulfato ferroso para rações com nível de suplementação bastante próximo (36 mg/kg). MAHONEY (1974) apresentou uma biodisponibilidade do sulfato ferroso de 51,0% trabalhando com dieta padrão com 27,8 mg de ferro por quilo de ração.

A biodisponibilidade do complexo orgânico de ferro em relação ao sulfato ferroso foi superior em 12,8% representando uma diferença significativa ($p < 0,001$) por análise de variância, indicando que o composto produzido proporcionou um melhor aproveitamento do ferro.

CHAUD (1993) num experimento com um "quelato" de peptídeos e ferro obteve um aproveitamento de 91% de ferro em relação ao sulfato ferroso. Este valor um pouco inferior aos resultados apresentados nesta pesquisa,

provavelmente, deve-se ao fato do complexo desenvolvido por CHAUD (1993) ter sido produzido utilizando-se um hidrolisado obtido por hidrólise enzimática onde o composto era, em sua maior parte, formado por peptídeos que dificultariam a absorção do quelato.

Num ensaio biológico com “quelato” de ferro (bi-glicinato de ferro da Albion Laboratories) FAIRWEATHER-TAIT *et al.* (1992) demonstrou superior biodisponibilidade do quelato em relação ao sulfato ferroso da ordem de 13% ($p < 0,001$). Contudo, estes resultados não podem ser comparados aos nossos devido ao delineamento experimental diferente. Os animais, após desmame foram alimentados com rações contendo 30 mg Fe/kg sendo um grupo (padrão) e o outro teste (bi-glicinato de ferro). Após 4 semanas, foram sacrificados e colhidos os dados. Não foi feita depleção de ferro.

Tabela 13 - Biodisponibilidade de ferro proveniente do sulfato ferroso e do complexo orgânico de ferro, calculado através do Índice de Recuperação de Hemoglobina em ratos anêmicos.

	Grupos		
	Basal	Padrão	Teste
Peso (g)			
Inicial	201 ± 17	191 ± 16	195 ± 11
Final	215 ± 12	237 ± 25	244 ± 17
Hemoglobina (g/dl)			
Inicial	6,3 ± 0,7	5,9 ± 0,5	6,3 ± 0,5
Final	5,6 ± 0,5	13,1 ± 0,9	14,5 ± 0,9
Consumo dieta (g)			
	180 ± 39	232 ± 32	243 ± 37
Fe ingerido (mg)			
	---	8,1 ± 1,2	8,5 ± 1,3
Fe hemoglob.(mg)			
	---	4,4 ± 0,5	5,2 ± 0,7
% Biodisponibilidade			
do sulfato ferroso	---	54,4 ± 4,5	61,3 ± 5,6
% Biodisponibilidade			
do complexo em			
relação ao sulfato			
ferroso	---	---	112,8 ± 5,2

Os valores são média ± desvio padrão para n=6.

Grupo Basal = os ratos recebem ração pobre em ferro (8 mg/kg)

Grupo Padrão = os ratos recebem ração com sulfato ferroso (35mg/kg)

Grupo Teste = os ratos recebem ração com complexo ferro (35mg/kg)

6. CONCLUSÕES

A avaliação dos dados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

1. A metodologia de preparação do hidrolisado ácido com baixo teor de cloreto de sódio, demonstrou ser uma alternativa viável. Obteve-se um produto seco com 45% de proteína, 3,9% de cloreto de sódio. Sua utilização como "fonte de aminoácidos" para a formação de complexos de ferro, mostrou-se adequada por permitir a utilização de um resíduo industrial de baixo custo na produção de um complexo de ferro com fins alimentícios. Dessa forma o uso do hidrolisado, em lugar de aminoácidos "puros", para a preparação de "complexos", parece ser uma alternativa viável.
2. Dentre as relações molares avaliadas entre aminoácidos e íons Fe^{+3} de 1 : 1, 1 : 2 e 1 : 3, a relação molar de 1 : 1 proporcionou um rendimento final de produto mais alto, sendo assim, considerada a mais adequada.
3. O complexo de ferro obtido da reação entre hidrolisado protéico e íons Fe^{+3} apresentou um teor de ferro de 25,9%, sendo eficaz no restabelecimento dos níveis de hemoglobina de modo superior ao sulfato ferroso.
4. A utilização biológica do ferro do complexo protéico em relação ao sulfato ferroso, estimado através do Índice de Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (HRE %) foi superior ao sulfato ferroso em 12,8%. Isto indica que o complexo foi mais eficiente em fornecer ferro disponível para os processos fisiológicos que o sulfato ferroso.
5. Os complexos de glicina, metionina e lisina produzidos apresentaram maior teor de ferro que o produto comercial importado.

Pode-se concluir, portanto, que o complexo de ferro obtido a partir de hidrolisado protéico preparado neste trabalho, parece ser bastante promissor para o uso como fonte de ferro em alimentos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AISEN, P. Some physicochemical aspects of iron metabolism In: **Iron metabolism**, London: Ciba Foundation Symposium, 1976, 1-16
2. AMINE, E. K. & HEGSTED, D. M. Biological assessment of available iron in food products. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, **22(3)**:470-476, 1974.
3. ASHMEAD, H. H. & LITTLE, P. U.S. Patent nº 4020.158, **Increasing metals in biological tissue**, 26 abr., 1977.
4. ASHMEAD, H. D.; RAPP, E. J.; NAME, J. J. **Uso de aminoácido quelatos na fortificação de alimentos**. In: I Seminário Brasileiro de Alimentos Enriquecidos, 1994. Campinas, S.P.
5. ASHMEAD, H. D.; GRAFF, D.J.; ASHMEAD, H.H. **Intestinal absorption of metal ions and chelates**, Illinois: Charles C. Thomas Publisher, 1985, 213p.
6. ASHMEAD, H. D. **The roles of amino acid chelates in animal nutrition**, New Jersey: Noyes Publications., 1987, 475p.
7. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, **Official methods of analysis**, 14 ed. Arlington, 1984, 1141p.
8. BASOLO, F. & JOHNSON, R. **Química de los compuestos de coordinacion**. Barcelona: Editorial Reverté, SA., 1980, 174p.
9. BATES, G. M.; BOYER, J.; HEGENAUER, J. C.; SALTMAN, P. Facilitation of iron absorption by ferric fructose. **Am. J. Chem. Nutr.**, Bethesda, **25**:983-986, 1972
10. BAYNES, R. D. & BOTHWELL, T. H. Iron deficiency. **Ann. Rev. Nutr.**, New York, **10(2)**:133-148, 1990.
11. BIANCHI, M.L.P.; SILVA, H.C.; OLIVEIRA, J. E.D. Considerações sobre a biodisponibilidade do ferro dos alimentos. **Arch. Lationamer. Nutr.**, Caracas, **42(2)**:94-100, 1992.

12. BIANCHI, M.L.P. **Biodisponibilidade de ferro em produtos industrializados em soja**. São Paulo, 1988. 140p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
13. BJORN-RASMUSSEN, E.; HALLBERG, L.; ROSSANDER, C. Absorption of "fortification" iron. **Br. J. Nutr.**, London, **37**:375-388, 1977.
14. BORENSTEIN, B. Rationale and technology of food fortification with vitamins, minerals and amino acids. **CRC Crit. Rev. Food Technol.** Cleveland **2**(2):171-185, 1971.
15. CABRAL, M.M.V.N. **Utilização biológica de ferro do feijão "Carioca 80 S.H" (*Phaseolus vulgaris*, L), na repleção da hemoglobina em ratos anêmicos**. Campinas, 1990. 109p. Tese (Mestrado em Ciência da Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
16. CARPENTER, C.E. & MAHONEY, A. W. Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition **CRC Crit.Rev. Food Sci. Nutr.**, Cleveland, **31**(4):333-376, 1992.
17. CHAUD, M. V. **Quelato peptídeo ferro: uma alternativa para aumentar a biodisponibilidade de ferro**, Rib. Preto, 1993. 87p. Tese (Mestrado em Fármacos e Medicamentos: Química e Biologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
18. CLYDESDALE, F.M. Physiochemical determinants of iron bioavailability. **Food Technology**, Chicago, **37**(10):144, 1983.
19. COLTHUP, N.B.; DALY, L.N.; WIBERLEY, S.E. **Introduction to infrared and raman spectroscopy**. New York. Academic Press, 1964. 511p.
20. CONSAUL, J. R. & LEE, K. Extrinsic tagging in iron bioavailability research: a critical review. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, **31**(4):684-689, 1983.

21. Conselho Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) Diário Oficial da União Resolução nº 12/78. Alimentos Enriquecidos 24.07.78.
22. COOK, J. D. Determinants of nonheme iron absorption in man. **Food Technol.**, Chicago, **37**(10):124-126, 1983.
23. COOK, J.D. & REUSSER, M.L. Iron fortification: an update. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, **38**:648-659, 1983.
24. CROSBY, W. H.; MUNN, S.F.; FURTY, F. W. Standardized method for clinical hemoglobinometry. **U.S. Armed Forces Med. J.**, Washington, **51**:693-703, 1954.
25. DAHIYA, S. e KAPOOR, A. C. *In vitro* and *in vivo* availability of iron from home processed supplementary foods. **J. Food Sci. Technol.**, **31** (2):122-125, 1994.
26. DALLMAN, P.R.; REFINO, C.; YLAND, M. J. Sequence of development of iron deficiency in the rat. **Am. J. Clin. Nutr.**; Bethesda **35**(4):671-677, 1982.
27. DALLMAN, P.R.; SIIMES, M.A.; STEKEL, A. Iron deficiency in infancy and childhood. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, **33**:86-118, 1980.
28. FAIRWEATHER-TAIT, S.J. & SYMSS, L.L. Iron availability from bread. Traditional versus chorleywood. **J. Sci. Food Agric. Washington** **38**: 83-89, 1987.
29. FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; FOX, T.E.; WHARF, S.G. et al. A preliminary study of the bioavailability of iron and zinc-glycines chelates. **Food Additives and Contaminants** **9**(1):97-101, 1992.
30. FAO/WHO. **Requirements of ascorbic acid, vitamin D, vitamin B₁₂, folate and iron**. Geneva, 1970, 94p. (World Health Organization Technol Report Series nº 452)
31. FERREIRA, J.F.; ARANDA, R.A.; BIANCHI, J.L.P. et al. Utilização da água potável como veículo de nutrientes: estudos experimentais com ferro. **Arch. Latinoam. Nutr.**, Caracas, **41**(3):400-408, 1991.

32. FINCH, C.A. & COOK, J. D. Iron deficiency. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, **39(3):471-477**, 1984.
33. FITZSIMMONS, B.W.; HUME, A; LARKWORTHY, L. F. et al. The preparation and characterisation of some complexes of iron (II) with amino acids. **Inorganic Chimica Acta**, Switzerland, **106(2):109-114**, 1985.
34. FORBES, A.L.; ADAMS, C.E.; ARNAUD, M. J. et al. Comparison of in vitro, animal and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutritional Anemia Consultative Group Task Force report on iron bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, **49(2):225-238**, 1989.
35. FRITZ, J.C.; PLA, G.W.; ROBERTS, T. et al. Biological availability in animal of iron from common dietary sources. **J. Agr. Food Chem.**, Washington, **18(4):647-651**, 1970.
36. GALDI, M. & VALENCIA, M.E. Stability of iron (III) chelates of nutritional interest. **J. Food Sci. Chicago** **53(6): 1844-1847**, 1988.
37. GIESE, J. Vitamin and mineral fortification of foods. Essential for nutrition, but often surrounded with controversy, vitamins and minerals are a special category of food ingredients. **Food Technol.**, Chicago, **49 (5): 109-122**, 1995.
38. GORDON, D.T. & GODBER, J.S. The enhancement of nonheme iron bioavailability by beef protein in the rat. **J. Nutr.**, Bethesda, **119(3):446-452**, 1989.
39. GREGER, J.L. Using animals to assess bioavailability of minerals: implications for human nutrition. **J. Nutr.**, Bethesda: **122(10):2047-2052**, 1992.
40. GROSS, S.S.; STUART, M.J.; SWENDER, P.T. et al. Malabsorption of iron in children with iron deficiency. **The Journal of Pediatrics.**, St Louis, **88(5):795-799**, 1976.
41. GUTHRIE, J.A. Micronutrient elements In: **Introductory Nutrition**, St. Louis: C.V. Mosby Company, 1986, cap. II, p. 289-303.

42. GUYTON, A. **Tratado de Fisiologia Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 1991, 864p..
43. HALLBERG, L. Bioavailability of dietary iron in man. Palo Alto, **Ann. Rev. Nutr.** 1:123,147, 1981.
44. HALLBERG, L.; ROSSANDER, L.; GRAMATKOUSKI, E. et al. Iron fortification of flour with a complex ferric orthophosphate. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, **50(1)**:129-135, 1989.
45. HALLBERG, L. & ROSSANDER, L. Improvement of iron nutrition in developing countries: comparison in adding meat, soy protein, ascorbic acid, citric and ferrous sulphate on iron absorption from a simple Latin American type of meat. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, **39**:577-583, 1984.
46. HAZELL, T. & JOHNSON, T. Effects of food processing and fruit juices on in-vitro estimate of iron availability from cereals, vegetables and fruits **J. Sci. Food. Agric.** Washington **38**:73-82, 1987.
47. HOLWERDA, R.; ALBIN, R.C.; MADSEN, F.C. Chelation effectiveness of zinc proteinates demonstrated, **Feedstuffs**, **19**:12-14, 1995.
48. INDUMADHAVI, M. & AGTE, V. Effect of fermentation on ionizable iron in cereal-pulse combinations. **Int. J. Food Sci. Tech.** **27**:221-228, 1992.
49. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, 3. ed. São Paulo, 1985, v. 1, 533p.
50. ISMAIL-BEIGI, F.; FARAJI, B.; REINHOLD, J. G. Binding of zinc and iron to wheat bread, wheat bran, and their components. **Am. J. Clin. Nutr.** Bethesda. **30**:1721-1725, 1977.
51. JACKSON, L.S. & LEE, K. The effect of dairy products on iron availability. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Cleveland, **31(4)**:259-270, 1992.
52. JONES, S. B.; KALAN, E. B.; JONES, J.C. et al. Ferripolyphosphate-whey protein powders. Their potential as nutritional iron supplements. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, **23(5)**:981-985, 1975.

53. JONNALAGADDA, S.S.; SABHARWAL, P.; PRATT, C.A. et al. The effect of dry heat on the bioavailability of iron in soy flour. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, **68**(12):944-948, 1991.
54. KADAN, R.S. & ZIEGLER, G.M. Effects of ingredients on iron solubility and chemical state in experimental breads **Cereal Chem.** St. Paul **63**(1):47-51, 1986.
55. KRATZER, F.H. & VOHRA, P. **Chelates in nutritions**, Flórida: Academic Press, 1986, 169p.
56. LATUNDE-DADA, G.O. & NEALE, R.J. Review: availability of iron from foods. **J. Food Technol.**, London, **21**(3):255-268, 1986.
57. LAYRISSE, M.; MARTINEZ-TORRES, C.; LEETS, I. et al. Effect of histidine, cysteine, glutathione or beef on iron absorption in humans. **J. Nutr. Bethesda** **111**(2):217-223, 1984.
58. LAYRISSE, M. & MARTINEZ-TORRES, C. Fe (III)-EDTA Complex as iron fortification **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, **30**:1166-1177, 1977.
59. _____ **Absorción del hierro a partir de los alimentos**. Editorial Arte. Caracas, 1983, 99p.
60. _____ Sugar a vehicle for iron fortification **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, **25**:8-18, 1976.
61. LEE, K. & CLYDESDALE, F.M. Iron sources used in food fortification and their changes due to food processing **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** , Cleveland, **11**(2):117-153, 1979a.
62. _____ Quantitative determination of the elemental, ferrous, ferric soluble and complexed iron in foods. **J. Food Sci.**, Chicago, **44**(2):549-554, 1979b.
63. _____ Effect of baking on the forms of iron enriched flour. **J. Food Sci.** Chicago **45**(6):1500-1504, 1980a.
64. _____ Chemical changes of iron in food and drying process. **J. Food Sci.**, Chicago, **45**(3):711-715, 1980b.

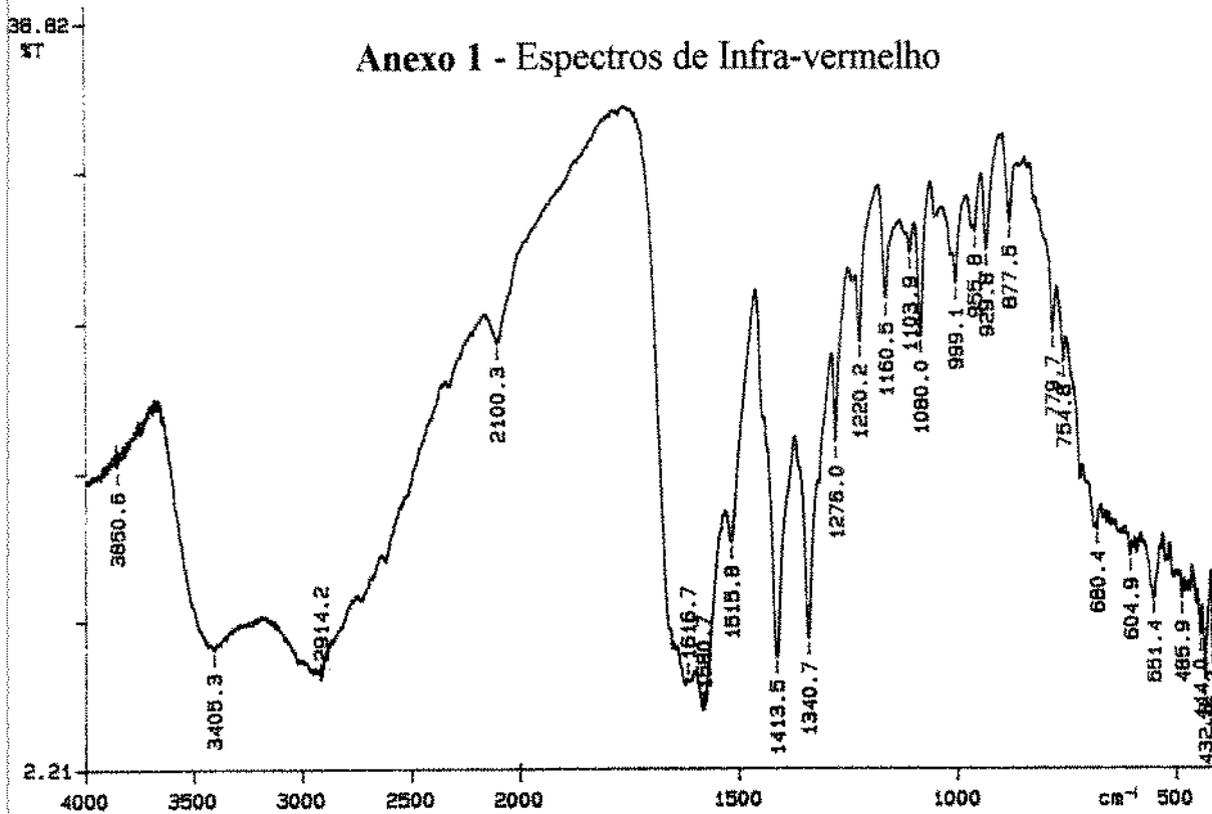
65. _____ Effect of thermal processing on endogenous and added iron in canned spinach **J. Food Sci.**, Chicago, **46(4)**: 1064-1073, 1981.
66. LEIGH, M.J. & MILLER, D.D. Effects of pH and chelating agents on iron binding by dietary fiber: implications for iron availability. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, **38**:202-213, 1983.
67. MANTOVANI, D.M. Ferro em alimentos: a importância da sua especificação. **Bol. Ital.**, Campinas, **23(4)**:381-389, 1986.
68. MAHONEY, AW; FARMER, B. R.; HENDRICKS, D. G. Effects of level and source of dietary fat on the bioavailability of iron from turkey meat for the anemic rat. **J. Nutr.**, Bethesda, **110**:1703-1708, 1980.
69. MAHONEY, A.W.; VAN ORDEN, C.C.; HENDRICKS, D. Efficiency of converting food iron into hemoglobin by the anemic rat. **Nutr. Metabol. Basel** **17(2)**:223-230, 1974.
70. MANLEY, C.H. & FAGERSON, I.S. Major volatile neutral and acid compounds of hydrolysate soy protein. **J. Food Sci.**, Chicago, **35**:286-291, 1970.
71. MONSEN, E.R.; HALLBERG, L. LAYRISSE, M. et al. Estimation of available dietary iron. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, **31(1)**:134-141, 1978.
72. NASSAR, M. F. & TIERNEY, R. US Patent nº WO 87/02867, **Hidrolized protein chelates**, 21 may, 1987.
73. NAS (National Academy of Science) Recommended Dietary Allowances. Committee on Dietary Allowances. **Food and Nutrition Board**, Washington D.C. 10th ed. 1989.
74. OLOGUNDE, M.O.; SHEPARD, R.L.; AFOLABI, A.; OKE, O.L.C Bioavailability to rats of iron from fortified grain amaranth flour. **Int. J. Food Sci. Technol.** **26**:493-500, 1991.
75. PABON, M.L. & LONNERDAL, B. Distribution of iron and its bioavailability from iron-fortified milk and formula. **Nutrition Research**, New York, **12(8)**:875-894, 1992.

76. PERCÁRIO, S. & FELIPPE JR, J. Fisiologia dos Nutrientes In: I Seminário Brasileiro de Alimentos Enriquecidos, 1.994. Campinas-SP.
77. PERKIN-ELMER. **Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry** Connecticut, Perkin-Elmer. Co, 1982.
78. PINEDA, O. **Study on the absorption of iron in infants.** In: Brazilian Congress of Clinical Medicine. São Paulo-SP, 1993.
79. PRAÇA, E.F. **Obtenção e avaliação de uso de hidrolisados protéicos ácidos com baixo teor de sal, em alimentos.** Campinas, 1995, 125p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP, 1995, 127p.
80. PRENDERGAST, K. Protein hydrolysate: a review. **Food Trade Review**, 1:16-21, 1974.
81. RAUCH, P.; KAS, J.; RANNY, M. Iron bioavailability from its complex with sucrose. **Food Chem.** 36(2):129-134, 1990.
82. REILLY, C. **Metal contaminants of food** 2^a. ed. New York: Elsevier Applied Sc. New York, 1991, 1284p.
83. ROSSANDER, L.; HALLBERG, L.; BJORN-RASMUSSEN, E. Absorption of iron from breakfast meal. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, 32:2484-2489, 1979.
84. RUSIG, O. **Formas comerciais de vitaminas e minerais** In: I Seminário Brasileiro de Alimentos Enriquecidos, 1994a. Campinas-SP.
85. _____ **Enriquecimento de leite e derivados** In: I Seminário Brasileiro de Alimentos Enriquecidos, 1994b. Campinas-SP.
86. SCHRICKER, B.R.; MILLER, D.D.; RASMUSSEN, R.R. et al. A comparasion of in vivo and in vitro methods for determining availability of iron from meals. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, 34:2257-2263, 1981.
87. SERON, L.H.; GUZMAN, E.S. Suco de laranja com ferro: aspectos químicos e nutricionais (Uma alternativa no combate à anemia). **Química Nova**, Campinas, 18(1):23-27, 1993.

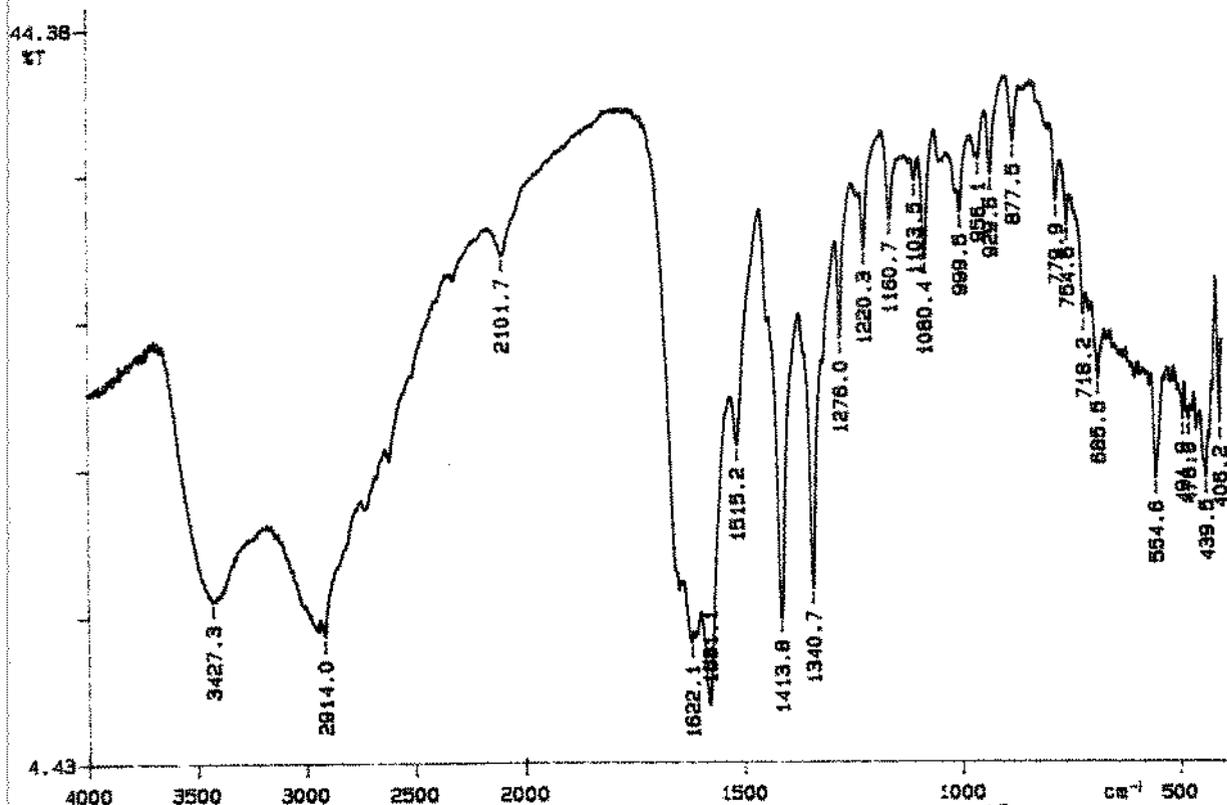
88. SMITH, K.T. Effects of chemical environment on iron bioavailability measurements **Food Technol.**, Chicago, **37**(10):155-120, 1983.
89. STEKEL, A.; OLIVARES, M.; PIZARRO, et al. Prevencion de la carência de hierro em lactantes mediante la fortification de la leche. **Arch. Latinoam. Nutr.**, Caracas, **32**(4):654-661, 1986.
90. SPOLIDORO, F.L. **Enriquecimento de alimentos institucionais** In: I Seminário Brasileiro de Alimentos Enriquecidos, 1994. Campinas-SP
91. SUBBA RAO, K. & NARASINGA RAO, B.S. "In vitro" studies on chelating agents as potential iron absorption promoters. **Food Chem.**, Barking, **17**:13-23, 1985.
92. TURCONI, S.J. & TURCONI, V.L. Anemia ferropriva: incidência em uma população infantil, **Pediatria Moderna** **27**(2):107-102, 1992.
93. VANNUCHI, J.; FREITAS, M.L.S.; SZARFARC, S.C. Prevalência de anemias nutricionais no Brasil. **Cadernos de Nutrição** **4**:7-26, 1992.
94. WALTER, T.; HERTRAMP, H.; PIZARRO, F. et al. Effect of bovine hemoglobin fortified cookies on iron status of school children: a nation-wide program in Chile. **Am J. Clin. Nutr.**, Bethesda, **57**(2):190-194, 1993.
95. WHO, ACC/SCN. World Health Organization Administrative Committee on Coordination Subcommittee on Nutrition. Micronutrient deficiency. The global situation. Genova nº9, 1993.
96. WILLARD, H., MERRIT, JR. L.; DEAN, J. **Análise Instrumental** 2ª ed., Lisboa: Coloust Gulbenkian, 1974, 135p.
97. WORKING GROUP ON FORTIFICATION OF SAL WITH IRON. Use of common salt fortified iron in the control and prevention of anemia - a collaborative study. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, **35**:1442-1451, 1982.
98. YETLEY, E.A. & GLINSMANN, W.H. Regulatory issues regarding iron bioavailability. **Food Technol.**, Chicago, **37**(10):121-123, 1983.

ANEXOS

Anexo 1 - Espectros de Infra-vermelho

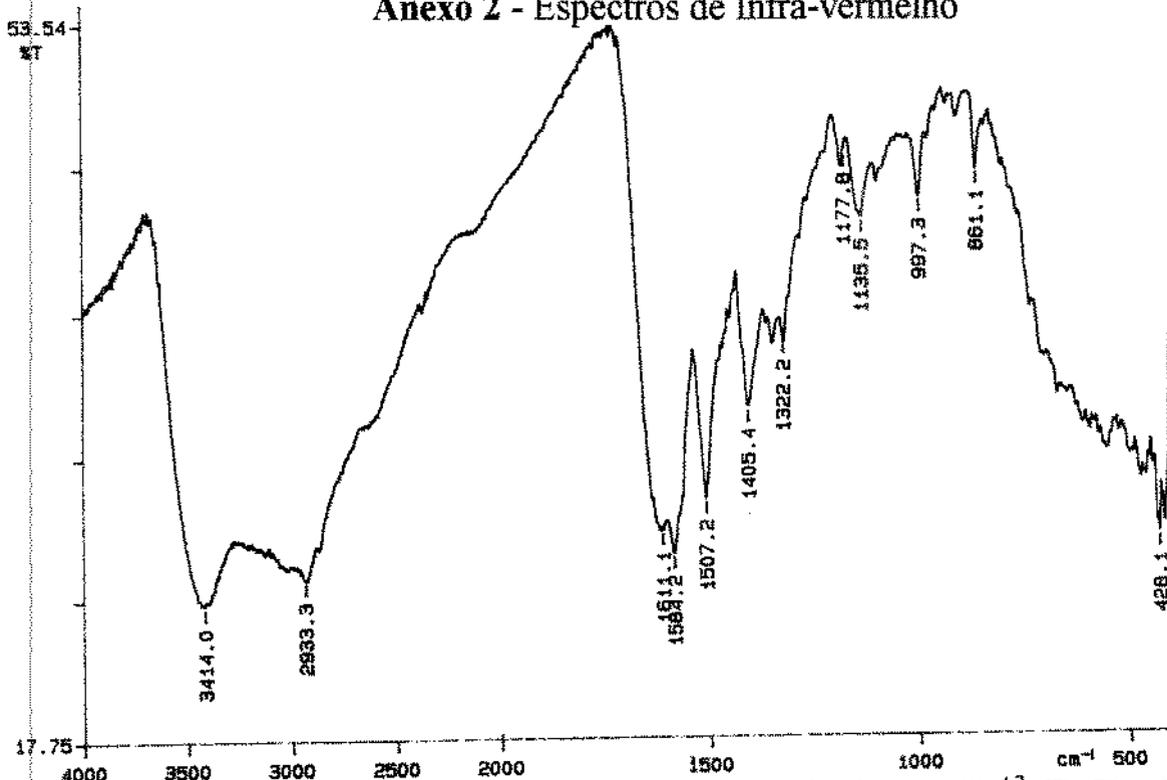


Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) mais metionina. Relação molar de 2 moles de N / mol de ferro.

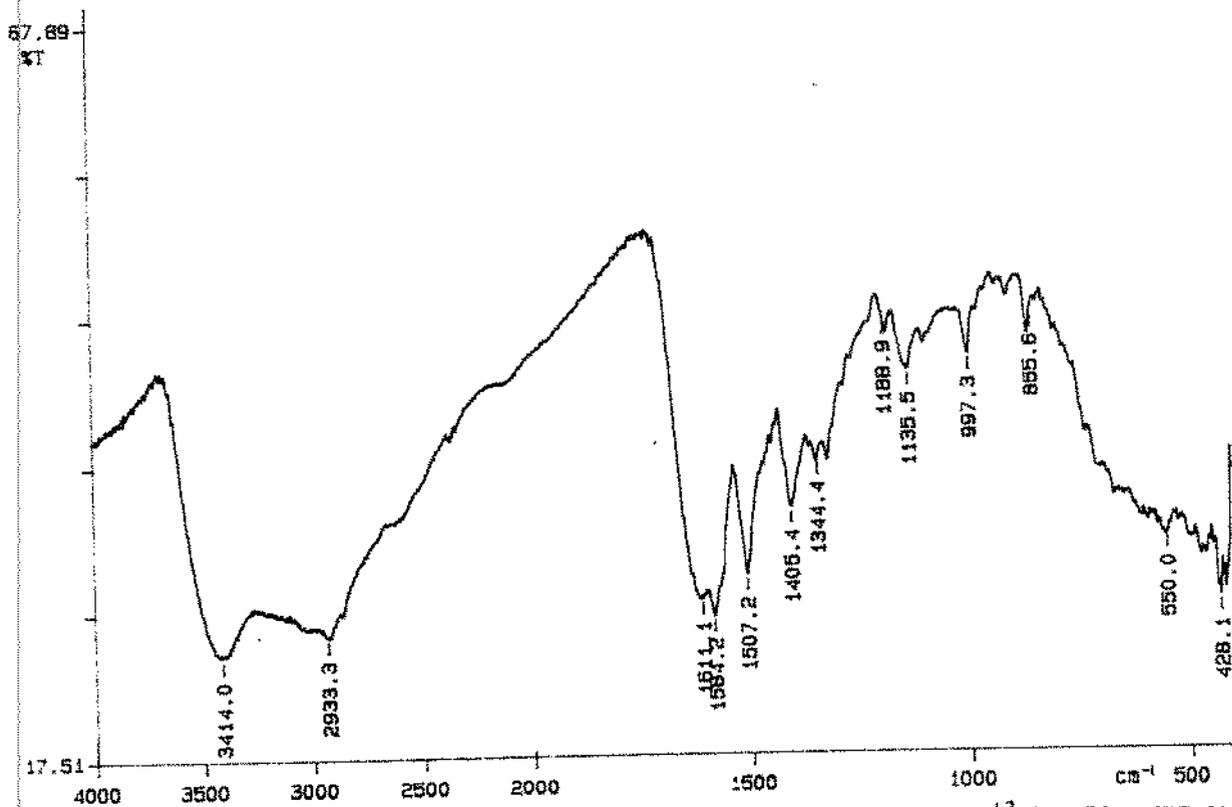


Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) mais metionina. Relação molar de 3 moles de N / mol de ferro.

Anexo 2 - Espectros de Infra-vermelho

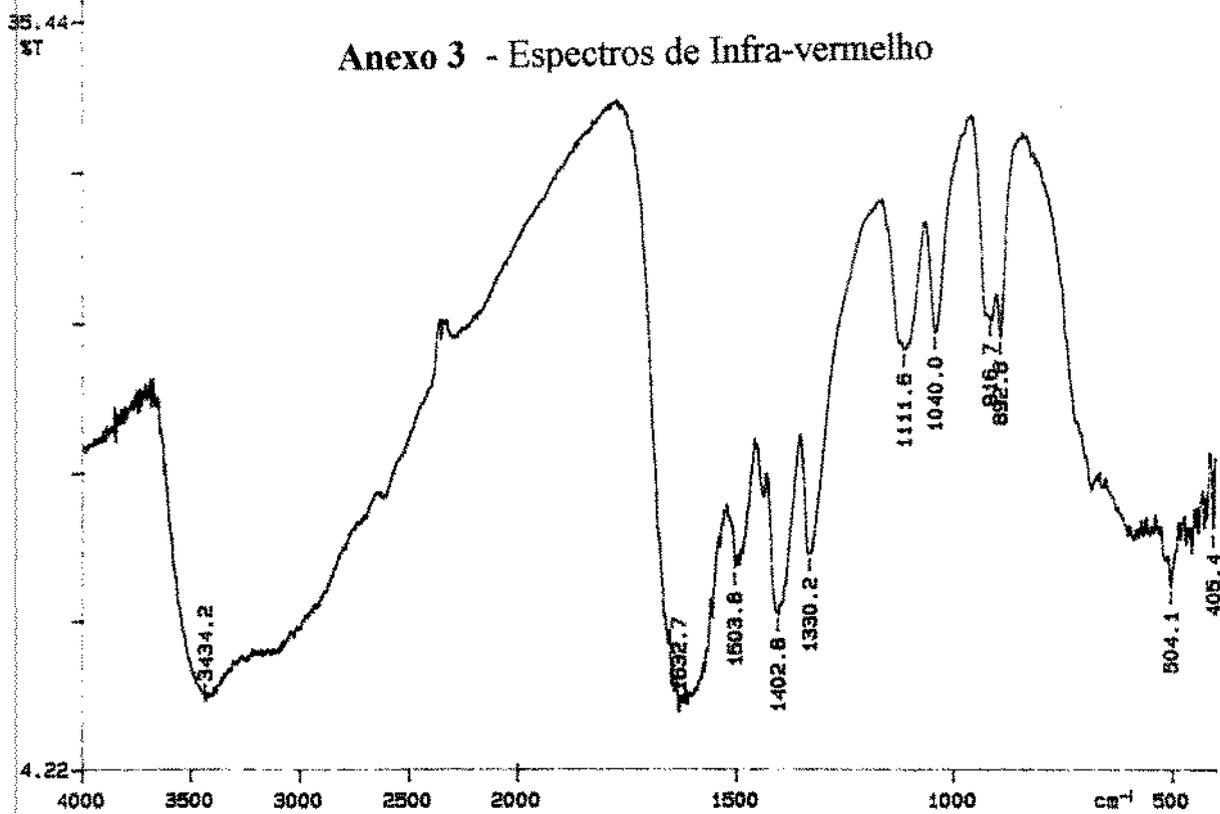


Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) mais lisina. Relação molar de 2 moles de N / mol de ferro.

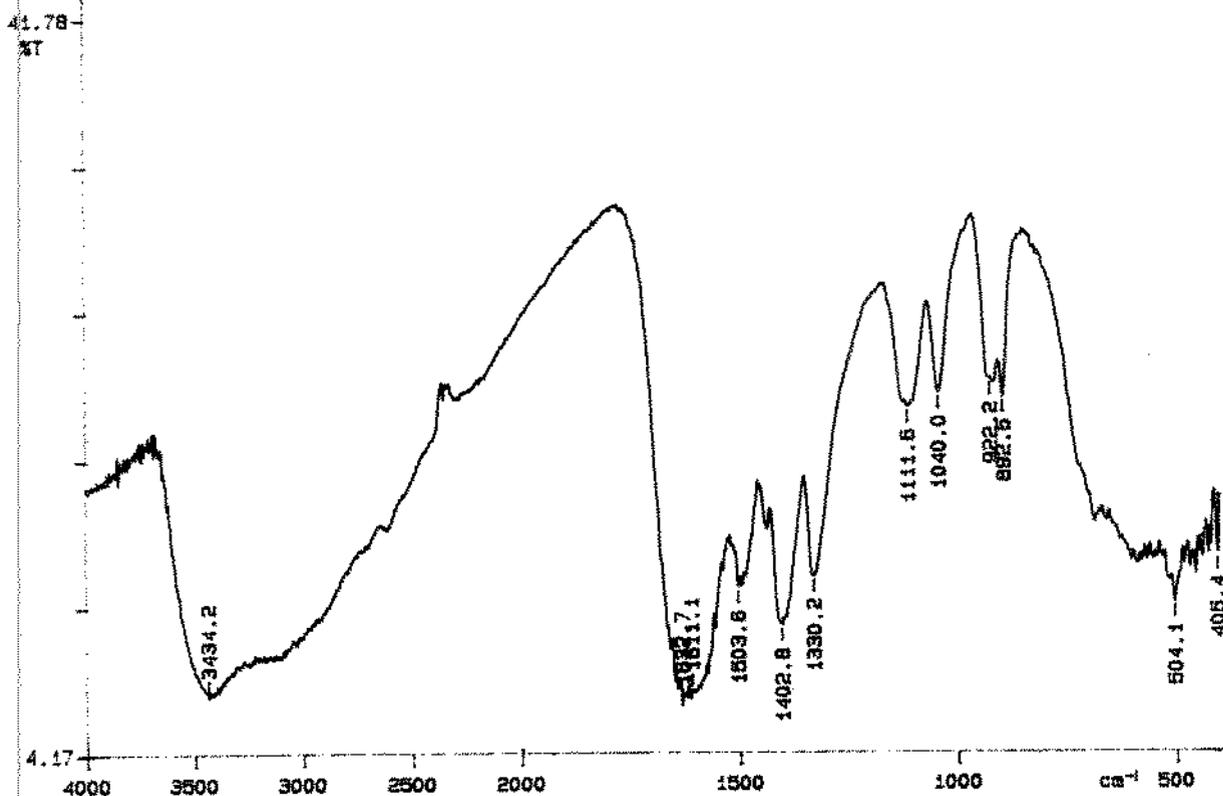


Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) mais lisina. Relação molar de 3 moles de N / mol de ferro.

Anexo 3 - Espectros de Infra-vermelho

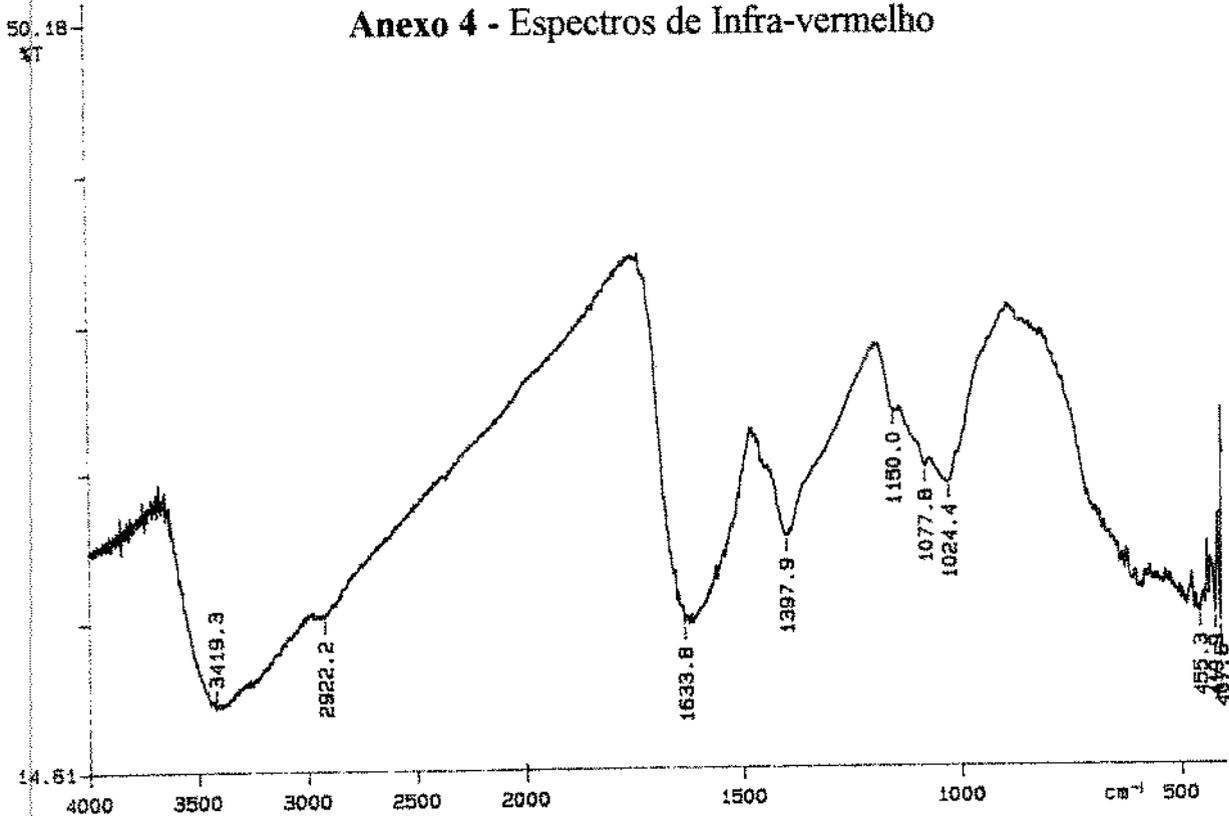


Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) mais glicina. Relação molar de 2 moles de N / mol de ferro.

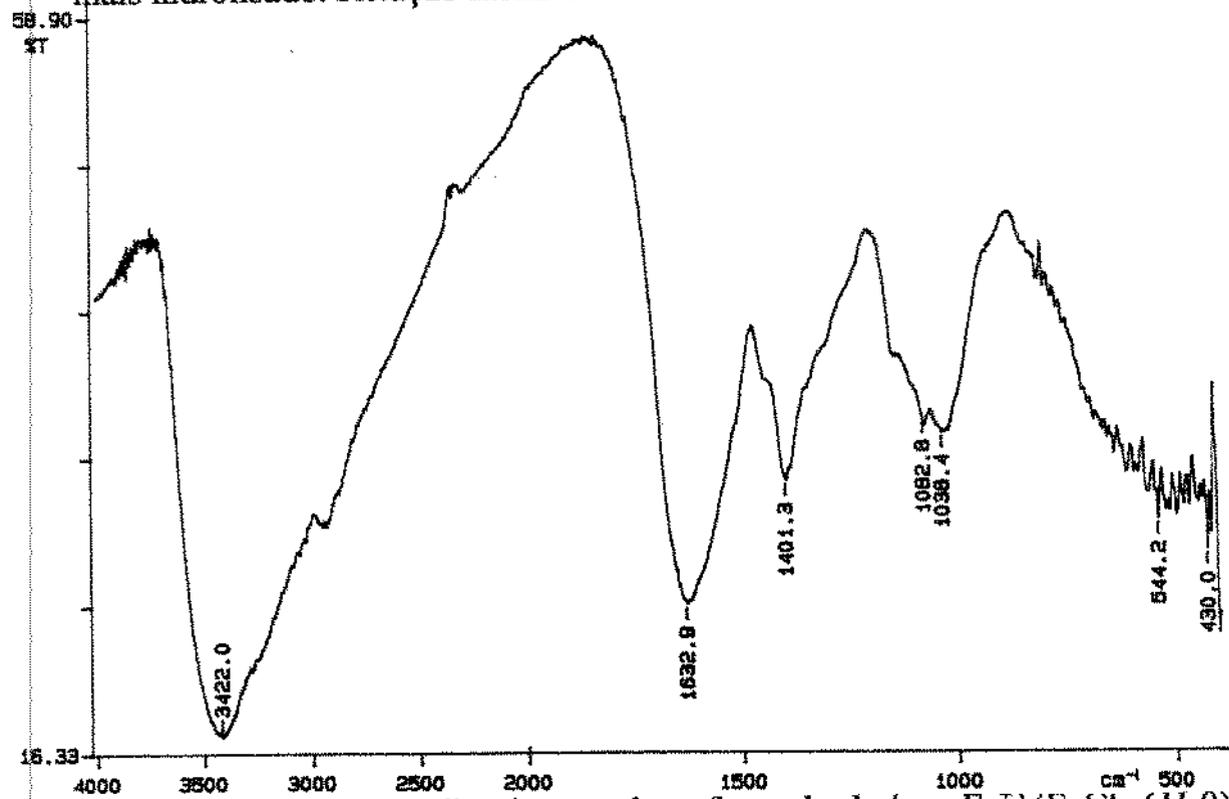


Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) mais glicina. Relação molar de 3 moles de N / mol de ferro.

Anexo 4 - Espectros de Infra-vermelho

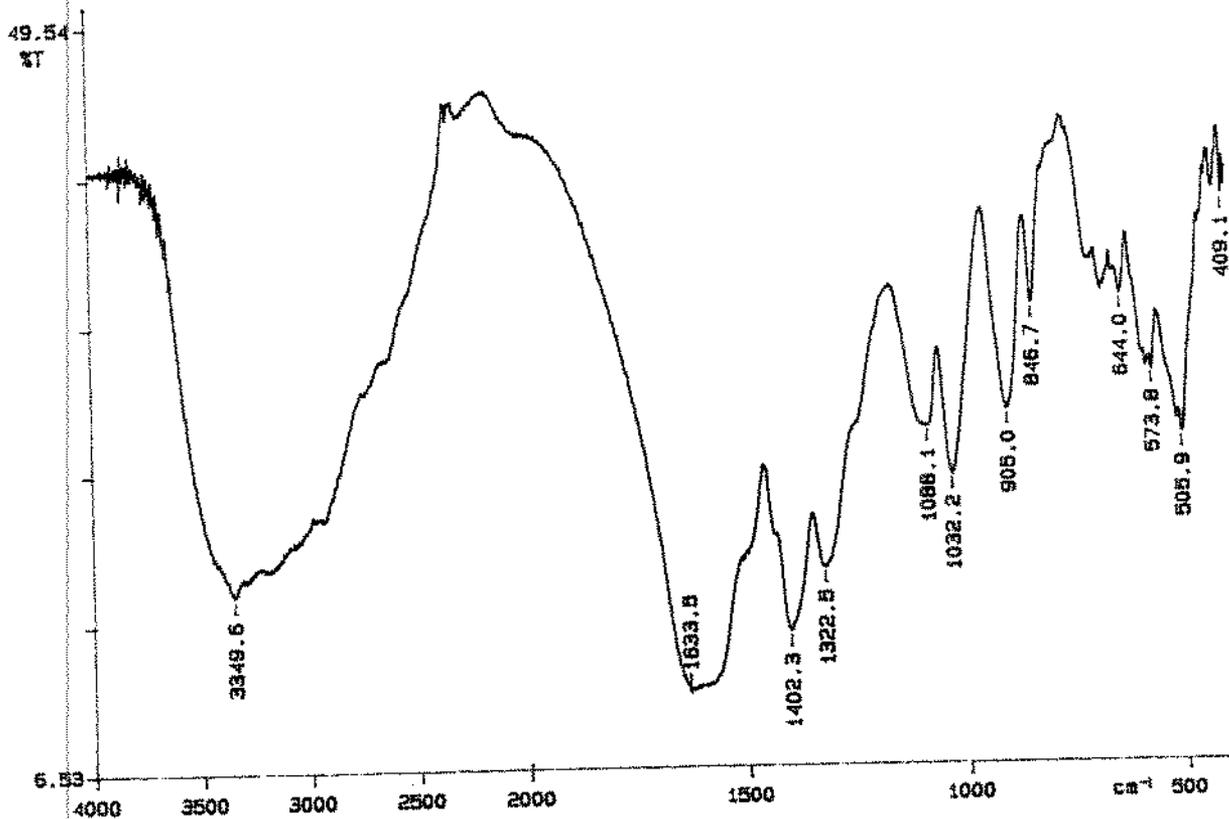


Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) mais hidrolisado. Relação molar de 2 moles de N / mol de ferro.

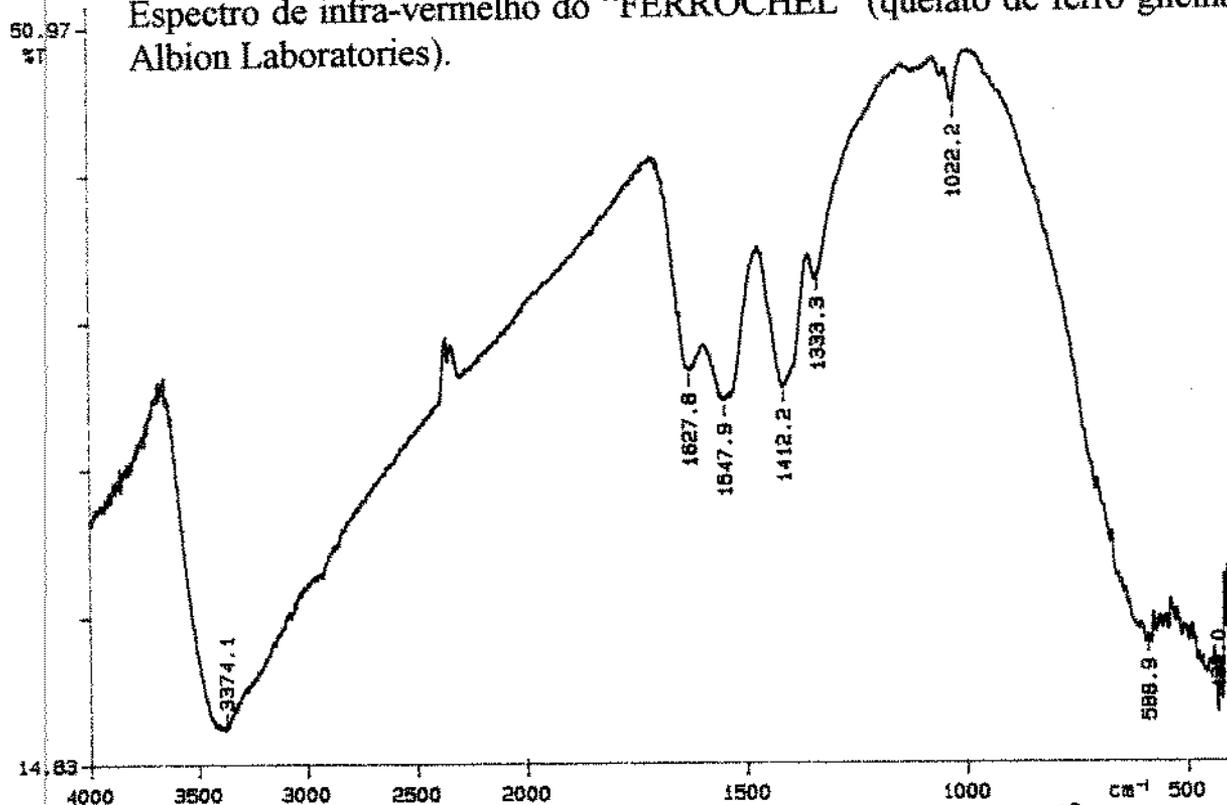


Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) mais hidrolisado. Relação molar de 3 moles de N / mol de ferro.

Anexo 5 - Espectros de Infra-vermelho



Espectro de infra-vermelho do "FERROCHEL" (quelato de ferro glicina da Albion Laboratories).



Espectro de infra-vermelho do complexo formado de íons Fe^{+3} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) mais ácido acético.