



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO**  
**“ALIMENTOS E NUTRIÇÃO”**  
**TESE DE MESTRADO**

**BIODISPONIBILIDADE DO FERRO NA PROTEÍNA**  
**TEXTURIZADA DE SOJA E EFEITO DA FORTIFICAÇÃO**  
**COM SULFATO E QUELATO FERROSO**

*Lilia Zago Ferreira dos Santos*

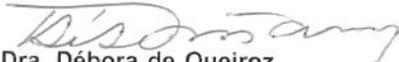
*Nutricionista*

*Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Débora de Queiroz Tavares*

**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Lilia Zago Ferreira dos Santos**, aprovada pela Comissão Julgadora em 22 de novembro de 2002.

Campinas, 22 de novembro de 2002.

  
Prof. Dra. Débora de Queiroz  
Tavares  
Presidente da Banca

Dissertação apresentada ao Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre.

Campinas, outubro de 2002

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	Sa59b
V	EX
TOMBO BCI	52187
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	13/02/03
Nº CPD	

CM00180097-1

Bibli. 283772

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

Santos, Lilia Zago Ferreira dos  
Sa59b Biodisponibilidade do ferro na proteína texturizada de soja e efeito da fortificação com sulfato e quelato ferroso / Lilia Zago Ferreira dos Santos. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Débora de Queiroz Tavares  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Nutrição. 2.Anemia. 3.Alimentos enriquecidos. 4.Proteína texturizada de soja. I.Tavares, Débora de Queiroz. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

## BANCA EXAMINADORA



---

Profª Drª Débora de Queiroz Tavares

DEPAN/FEA/UNICAMP



---

Profª Drª Semíramis Martins Álvares Domene

CCV/PUCCAMP



---

Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka

DEPAN/FEA/UNICAMP

---

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan

DEPAN/FEA/UNICAMP

200304720

## **Agradecimentos**

*Antes de tudo gostaria de agradecer a todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram com sugestões e críticas positivas que certamente foram oportunas na realização deste trabalho.*

*Agradeço à minha família, afinal, o que seria de nós se não tivéssemos uma família, seja ela grande ou pequena, esteja ela reunida ou espalhada por tantos lugares, enfim, família é sempre família e seguramente nos assiste em qualquer situação.*

*Agradeço aos meus amigos que de uma forma ou de outra estavam sempre presentes e interessados, incentivando o meu crescimento profissional e mais, torcendo tanto pelo meu sucesso (ou até mesmo mais) quanto eu.*

*Agradeço a Bunge Alimentos, pela oportunidade de realização deste trabalho. Ao colega Rogério por toda ajuda sempre eficiente e imediata.*

*Agradeço ao CNPq pela concessão do auxílio financeiro consideravelmente oportuno neste momento.*

*Agradeço aos laboratórios Lagro, CBO Assessoria & Análise, Albion Laboratories, os quais contribuíram direta e fortemente, cada qual com suas habilidades e competências.*

*Agradeço ao Laboratório de Hematologia/Hemocentro/Unicamp pelo pronto atendimento sempre. A colega Mônica pela valiosa assistência sempre instantânea, que definitivamente foi de grande utilidade.*

## **Agradecimentos Especiais**

*Ao Marcelo por todo respeito, apoio e incentivo à minha escolha profissional, por toda paciência e compreensão nos momentos mais difíceis e principalmente por todo amor e alegria.*

*Aos meus pais pela educação, incentivo e empenho exaustivo à minha formação .*

*A Débora pela enriquecedora orientação, por todo ensinamento e pelo incentivo ao desenvolvimento de habilidades indispensáveis à minha formação profissional.*

*A Semíramis pelo incontestável estímulo a esta realidade profissional, por todo incentivo e apoio à minha formação e principalmente pela amizade sincera e dedicada.*

*A Fernanda por me permitir uma amizade sincera, por todo apoio e incentivo ao meu trabalho seja aqui do meu lado ou não, afinal, iniciamos esta trilha juntas....*

*A Camila por sempre me ajudar a encontrar uma solução para os problemas impossíveis (impossíveis para mim...), por suportar minhas reclamações e desesperos e sobretudo pelas decisões objetivas e imediatas.*

*A Maria Helena por sempre estar pronta a me ajudar qualquer que seja a situação e por todo apoio e incentivo ao meu trabalho.*

*A Susana por toda ajuda indispensável, sobretudo pelos prazerosos momentos de risadas (aliás, foram tantos que nem consigo me lembrar das tristezas), sem os quais seria difícil enfrentar as dificuldades.*

*Ao Danni por me ensinar a parar, sentar e analisar os problemas de forma calma e equilibrada.*

*A Yara por todo auxílio técnico, profissionalismo e incentivo ao trabalho.*

*Aos membros da banca examinadora, Profa Semíramis, Prof. Célio e Prof. Jaime pelas críticas e sugestões convenientes para o aprimoramento do trabalho.*

*A todos os colegas do DEPAN/FEA/UNICAMP que com certeza contribuíram de forma importante para a realização deste trabalho.*

*“Porque um dia é preciso parar de sonhar, tirar os planos da gaveta e de alguma forma começar”.*

*Amyr Klink*

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	ix
ÍNDICE DE TABELAS ARTIGO I	x
ÍNDICE DE TABELAS ARTIGO II	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS ARTIGO I	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS ARTIGOS II	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Distribuição e Funções do Ferro	3
2. Mecanismos de Absorção, Fisiologia e Metabolismo do Ferro	5
3. Requerimento e Ingestão de Ferro	8
4. Deficiência de Ferro	12
5. Avaliação do Estado Corporal de Ferro	16
6. Programas Nutricionais de Suplementação e Fortificação	18
7. Valor da Soja na Alimentação Humana	23
7.1. Alguns Fatores Antinutricionais	27
7.1.1. Inibidores de Protease	27
7.1.2. Hemaglutininas ou Lectinas	28
7.1.3. Ácido Fítico	28
7.2. Soja no Brasil	29
ARTIGO I	31
RESUMO	33
ABSTRACT	35
1. INTRODUÇÃO	36
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1. Material	37
2.2. Animais e Manejo	37
2.3. Dietas	38
2.4. Determinações Químicas	40
2.5. Alimentação Intermitente	40

2.6. Fase de Depleção	41
2.7. Fase de Repleção	41
2.8. Determinação dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1. Fase de Depleção	44
3.2. Fase de Repleção	44
3.2.1. Evolução Ponderal e Aporte de Energia e Ferro	44
3.2.2. Regeneração da Hemoglobina	47
3.2.3. Situação do Ferro Absorvido e sob Transporte	50
4. CONCLUSÃO	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ARTIGO II	59
RESUMO	61
ABSTRACT	63
1. INTRODUÇÃO	64
2. MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1. Animais e Manejo	66
2.2. Dieta de Depleção	66
2.3. Dieta de Repleção	66
2.4. Determinações Químicas	67
2.5. Procedimentos Experimentais	67
2.6. Determinação dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos	68
2.7. Determinação da Absorção Aparente	69
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
3.1. Composição das Dietas	70
3.2. Fase de Depleção	72
3.3. Fase de Repleção	73
3.4. Análise dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos	78
4. CONCLUSÃO	84
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
CONCLUSÕES GERAIS	91
ANEXOS	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

## ÍNDICE DE TABELAS REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1. <i>Recommended Dietary Allowance (RDA)</i> para ferro segundo o <i>Food and Nutrition Board</i> (1989) .....	10
TABELA 2. <i>Dietary Reference Intakes (DRI)</i> para ferro segundo o <i>Food and Nutrition Board</i> (2000) .....	11
TABELA 3. Indicadores para a avaliação do estado de ferro propostos pelos quatro estudos do <i>NHANES I</i> (1971-1975), <i>NHANES II</i> (1976-1980), <i>HHANES</i> (1982-1984) e <i>NHANES III</i> (1988-1994) .....	17
TABELA 4. Concentração de ferro de alguns produtos derivados da soja .....	30

## ÍNDICE DE TABELAS ARTIGO I

TABELA 1.	Composição da Dieta de Depleção, pobre em ferro ( $\cong$ 15ppm) .....	38
TABELA 2.	Composição das Dietas de Repleção Experimentais e Controle confeccionadas com PTS + Mistura BA .....	40
Tabela 3.	Parâmetros hematológicos recomendados pela NANHES: técnicas de determinação no presente trabalho .....	43
TABELA 4.	Consumo médio de dieta e ferro e, ganho ponderal dos grupos experimentais e controles durante o período de repleção .....	45
TABELA 5.	Valores iniciais e finais de hemoglobina e Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (HRE) dos grupos experimentais e controles .....	48
TABELA 6.	Valores de VCM, HCM, CHCM e RBC dos grupos controles e experimentais após a fase de repleção ....	51
TABELA 7.	Parâmetros bioquímicos analisados nos grupos experimentais e controles ao término da Fase de Repleção .....	52

## ÍNDICE DE TABELAS ARTIGO II

TABELA 1.	Composição da Proteína Texturizada de Soja (PTS)...	65
TABELA 2.	Composição da Dieta de Depleção, pobre em ferro ( $\cong$ 15mg/kg).....	66
TABELA 3.	Parâmetros hematológicos, bioquímicos e morfológicos utilizados para avaliação da recuperação da depleção de ferro .....	69
TABELA 4.	Composição centesimal média das dietas de adaptação, depleção e repleção .....	70
TABELA 5.	Composição de aminoácidos (mg/kg de dieta) da dieta de repleção; fonte protéica: PTS; teor protéico médio: 17,04% .....	71
TABELA 6.	Concentração de ferro determinado nas dietas de depleção e repleção (experimentais e controle) .....	71
TABELA 7.	Consumo alimentar, consumo de ferro e ganho de peso dos grupos experimentais e do grupo controle durante a fase de repleção .....	73
TABELA 8.	Concentração inicial e final de hemoglobina dos grupos experimentais e do grupo controle durante os 18 dias da fase de repleção .....	74

TABELA 9. Consumo de ferro, ganho de hemoglobina e Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (HRE) dos grupos experimentais e do grupo controle na fase de repleção .....	77
TABELA 10. Valores hematimétricos médios dos quatro grupos experimentais e do grupo controle após a fase de repleção .....	78
TABELA 11. Valores médios de CH, CHDW, RDW e HDW dos grupos experimentais e grupo controle após a fase de repleção .....	79
TABELA 12. Valores médios de Ferro sérico, capacidade total de ligação de ferro (TIBC) e saturação da transferrina dos grupos experimentais e grupo controle após a fase de repleção .....	82
TABELA 13. Valores de ingestão e excreção fecal de ferro durante o período de repleção (14 dias) e % de Absorção Aparente dos grupos fortificados e controle.....	83

ÍNDICE DE GRÁFICOS ARTIGO I

GRÁFICO 1. Curva de ganho ponderal dos grupos experimentais e controles durante a fase de repleção .....	46
GRÁFICO 2. Consumo de ferro e ganho ponderal dos grupos experimentais e controles durante a fase de repleção	46
GRÁFICO 3. Valores de hemoglobina no início e no final da fase de repleção dos grupos experimentais e controles .....	47
GRÁFICO 4. Consumo de ferro e porcentagem Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (% HRE) dos grupos experimentais e controles após fase de repleção .....	49

ÍNDICE DE GRÁFICOS ARTIGO II

GRÁFICO 1. Curva de ganho ponderal dos ratos durante a fase de depleção em ferro .....	72
GRÁFICO 2. Curva de ganho ponderal dos grupos experimentais e do grupo controle (C) durante a fase de repleção .....	74
GRÁFICO 3. Concentração de Hb dos grupos experimentais e do grupo controle durante a repleção .....	75
GRÁFICO 4. Quantidade de reticulócitos nos grupos experimentais e no grupo controle durante a fase de repleção .....	76

*ÍNDICE DE FIGURAS REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*

FIGURA 1. Diferentes formas do ferro nos alimentos .....	3
--	---

*ÍNDICE DE FIGURAS ARTIGO II*

FIGURA 1. Citogramas que relacionam volume celular (eixo y) e concentração de Hb (eixo x) dos grupos controle e experimentais .....	80
---	----

A deficiência de ferro é um distúrbio econômico e educacional e constitui um dos maiores problemas de saúde pública. Muitas estratégias de intervenção para reduzir a prevalência são desenvolvidas por instituições competentes e responsáveis. A fortificação de alimentos é ferramenta indispensável para o controle de carências nutricionais, em especial a de ferro, e é praticada em diversos países. De modo geral, o sucesso da fortificação depende do tipo e da concentração do fortificante, bem como do alimento utilizado como veículo. Pelo fato do Brasil ser o segundo maior produtor mundial de soja, isto representa incentivo à utilização dos produtos de soja como veículos de fortificação. Devido a amplitude de produção decorrente da forte demanda do mercado interno a Proteína Texturizada de Soja (PTS) torna-se alvo de estudo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a biodisponibilidade do ferro presente na PTS isolada, em associação com proteína animal e posteriormente fortificada com Sulfato Ferroso-heptaidratado e Bisglicinato Quelato Ferroso em ratos depletados de ferro. O trabalho foi realizado em duas etapas, de forma que na primeira delas os objetivos foram avaliar a biodisponibilidade do ferro contido em uma associação de PTS e proteína animal na proporção 1:1 e, avaliar a fortificação da PTS com Sulfato Ferroso-heptaidratado (SF) e Bisglicinato Quelato Ferroso (QF). Os resultados demonstraram que a proteína animal associada a PTS foi suficiente para recuperar a anemia não severa. Diferenças de biodisponibilidade entre o SF e o QF não foram observadas. Na segunda etapa, os objetivos foram avaliar apenas a biodisponibilidade do ferro da PTS e, avaliar a fortificação com SF e QF. Os resultados indicaram que a fortificação mostrou-se efetiva, porém, diferenças de biodisponibilidade entre os fortificantes foram pequenas. Concluiu-se que dietas que contenham como fonte protéica, a associação de PTS e proteína animal (1:1), não necessitam de fortificação, e que dietas cuja fonte protéica seja exclusivamente PTS, são capazes de recuperar anemia em ratos Wistar, porém, a recuperação foi mais efetiva no tempo e quanto aos remanescentes de anisocitose e hipocromia quando a PTS foi fortificada para oferecer 0,97mg de Fe/dia.

Iron deficiency, an educational and economic disturbance, is one of the major public health problems. Many intervention strategies for reducing its prevalence have been developed by competent and responsible institutions. Food fortification represents an indispensable tool for controlling nutritional deficiencies, especially iron deficiency, and has been practiced in many countries. Broadly, the success of fortification depends on the type of iron compound type and its quantity and also on the food used as the vehicle. Considering that Brazil is the second soybean producer in the world, this should represent an incentive to research into the use of soybean products as alternative fortification vehicles. Due to an increase in production as result of a strong internal demand, texturized soy protein (PTS) has become a target of study. The objectives of this work were to evaluate iron bioavailability in PTS alone and with added meat, and subsequently to evaluate fortification with Ferrous Sulfate (SF) and Ferrous Bisglycinate Chelate (QF). This work was carried out in two stages. The first one aimed to evaluate iron bioavailability in PTS associated with meat and also the fortification of PTS with SF and QF. The results showed that meat protein associated with PTS is adequate to recover from mild anemia. Differences between SF and QF were not observed. The second stage aimed at evaluating iron bioavailability of PTS alone and, as in the first stage, to evaluate the fortification of PTS with SF and QF. The results showed that fortification was efficient, however bioavailability differences between SF and QF were not observed. We concluded that diets with PTS + meat (1:1) as protein source do not need fortification and that diets which have exclusively PTS as the protein source, are capable of curing anemia in wistar rats, although the recovery was more efficient when the PTS was fortified.

## INTRODUÇÃO

A Política Nacional de Alimentação e Nutrição tem como diretriz, a investigação de problemas nutricionais para subsidiar o planejamento e posterior avaliação das medidas de combate aos mesmos.

O Brasil possui extensos grupos populacionais, especialmente de crianças até 24 meses, que apresentam distúrbios nutricionais decorrentes de um quadro carencial crônico de nutrientes como Vitamina A, Iodo e sobretudo o Ferro.

A principal causa da deficiência de ferro é a escassez dietética do mineral, entretanto outros fatores primordiais devem ser levados em consideração, por exemplo, a incidência de aleitamento materno exclusivo, o qual apresenta índices insatisfatórios em todas as regiões do País (Ministério da Saúde. Política Nacional....., disponível em <http://www.saude.gov.br>).

Ao considerar que a carência de ferro afeta cerca de 2 bilhões de pessoas em todo mundo, sendo que destas, metade já podem ser consideradas anêmicas, a anemia ferropriva constitui um dos principais problemas de saúde pública. A necessidade de intervenção para o controle da prevalência da anemia é determinada pela importância dos efeitos da anemia sobre a qualidade de vida e morbimortalidade: a anemia ferropriva prejudica o desenvolvimento psicomotor, a coordenação e o aproveitamento escolar, diminui a atividade física e a capacidade de trabalho (Brunken & Szarfarc, 1999).

As estratégias de intervenção devem ser planejadas e executadas por equipes multidisciplinares com o intuito de aumentar o consumo de ferro dietético, por meio de dietas contendo ferro e dos nutrientes que estimulam a absorção do mesmo, podendo ocorrer necessidade de fortificação. O controle das infecções parasitárias é imprescindível; segue-se a necessidade do controle de outras

carências nutricionais, a partir da diversificação dietética e de programas de ensino sobre alimentação saudável.

Se for adotada a técnica de fortificação, esta deve ser tecnologicamente viável e ao alcance econômico do público alvo. Sendo assim, os alimentos mais comuns utilizados em programas de fortificação são farinha de trigo, sal, açúcar, arroz, condimentos, amido de milho, leite e seus derivados e cereais processados (Cook & Reusser, 1983; Mejía, 1994; Hurrell, 1997).

Com o intuito racional de chegar a redução de 2/3 o índice de anemia ferropriva nas crianças em idade escolar, o Ministério da Saúde designou planos de ação incluindo o enriquecimento de farinhas de trigo e milho com ferro, o qual foi permitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária conforme Resolução-RDC nº 15 de 21 de fevereiro de 2000, tornando-se, posteriormente, ação obrigatória (Consulta Pública nº 63 de 6 de agosto de 2001), a qual entrou em vigor no início deste ano como dispõe a Portaria nº 14 de 3 de janeiro de 2002.

A tendência atual da indústria de alimentos, destinada à alimentação institucional, é produzir alimentos nutricionalmente adequados, de baixo custo e boa aceitabilidade. Produtos à base de cereais destinados a refeições matinais são regularmente fortificados com ferro, mas são de custo relativo alto. Outra alternativa é utilizar uma fonte protéica mais barata, a proteína de soja, fortificando-a com ferro. O Brasil é o segundo produtor mundial de soja, cuja produção da última safra foi em torno de 37 milhões de toneladas, (R.C.W. Radar. Banco..... disponível em <<http://www.rcwconsultores.com.br/radarsoja>>), e o crescente emprego da soja em vários produtos está estimulando o consumo brasileiro.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Distribuição e Funções do Ferro

Cerca de 30% do ferro corporal está armazenado sob forma de ferritina (20%) ou de hemossiderina (10%). Quanto ao local, 30% estão no fígado, 30% na medula óssea e o restante no baço e músculos. O ferro essencial ou funcional está compondo a hemoglobina (60%), a mioglobina (5%) e as enzimas (5%). Ainda uma pequena parte (<0,1%) está ligada a transferrina na circulação (Fomon, 1993; Czakja-Narins, 1998; Latunde-Dada et al., 1998).

O ferro heme (hemoglobina e mioglobina) é incorporado através da ingestão de alimentos de origem animal e o ferro não heme provém principalmente dos alimentos de origem vegetal. Seja uma ou outra a origem, o fato é que o ferro estará em todos os alimentos sob as formas iônicas Fe II e Fe III (Lee e Clydesdale, 1980). Os diferentes estados de oxidação do ferro permitem a formação de diversos complexos que podem modificar sua biodisponibilidade ou alterar as propriedades organolépticas do alimento.

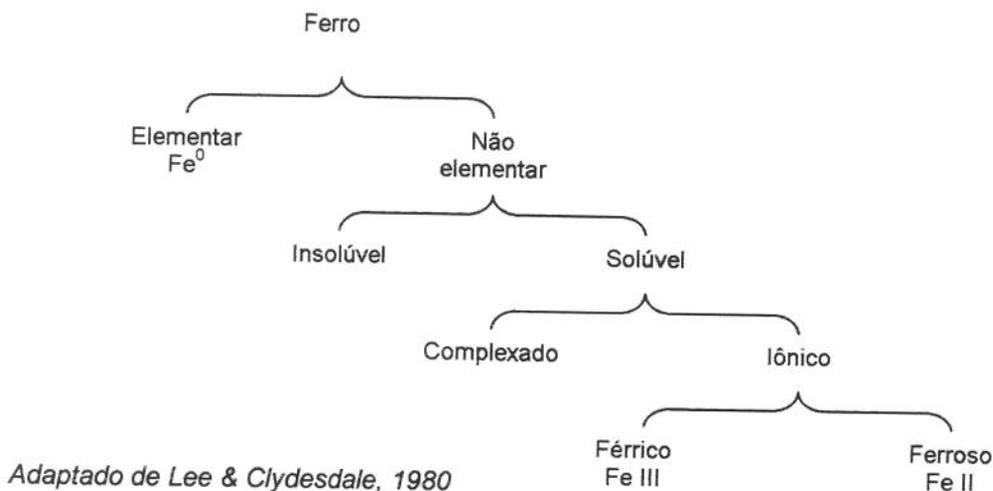


FIGURA 1. Diferentes formas do ferro nos alimentos

Embora existam numerosas proteínas contendo ferro em sua estrutura, as 4 classes de proteínas mais importantes são as enzimas heme (citocromos, sistema microsomal P-450 e peroxidases exceto glutaciona), enzimas não heme (ferro-enxofre e metaloproteínas), enzimas ferro-dependente (triptofano pirrolase) e proteínas heme (hemoglobina e mioglobina). Há várias formas de proteína heme, mas nos humanos, a forma predominante é a protoporfirina IX (PP-IX) (Czajka-Narins, 1998; Simões, 1998).

A função de maior importância desempenhada pelo ferro no organismo é o transporte de oxigênio e dióxido de carbono, os quais se ligam ao anel de protoporfirina IX (PP-IX) que contém 0,34% de ferro em sua estrutura, caracterizando o grupo prostético da hemoglobina no interior da célula vermelha. A hemoglobina é uma proteína tetramérica com 2 pares de subunidades idênticos ( $\alpha$  2 e  $\beta$  2), de forma que cada subunidade possui um grupo prostético Fe-PP-IX, o qual o ferro no estado Fe II se liga reversivelmente ao oxigênio (Fairweather-Tait, 1995; Beard et al., 1996).

A mioglobina tem como função o armazenamento de oxigênio no músculo garantindo a eficiência da contração muscular, uma vez que a atuação da mioglobina pode ocorrer independentemente da liberação de oxigênio circulante da hemoglobina (Cunha & Cunha, 1998).

Entre as 40 proteínas distintas que participam da cadeia respiratória, seis são heme proteínas e outras seis são proteínas ferro-sulfuradas. Prosseguindo-se quanto a participação do ferro, quase todas as peroxidases (exceção feita à glutaciona peroxidase) contém ferro em sua estrutura (Voet & Voet, 1995; Fairweather-Tait, 1995; Beard et al., 1996).

## 2. Mecanismos de Absorção, Fisiologia e Metabolismo do Ferro

Bothwell em 1995 citou que Mccance & Widdowson (1937) já tinha admitido que a capacidade de excreção de ferro pelo intestino era muito mais limitada do que eles haviam previsto. Hoje todos admitem que a economia do ferro é regida por muitos órgãos correlacionados. Para iniciar, está demonstrado que a absorção do ferro é previamente condicionada com o nível dos estoques de ferro e conseqüentemente taxa de eritropoiese. (Monsen & Balintfy, 1982; Bothwell, 1995). Pode-se, entretanto, afirmar que os níveis de estoques de ferro são muito influentes na absorção do mesmo (Bothwell, 1995). Skikne & Cook (1992) citados por Bothwell (1995) realizaram experimentos com humanos e observaram um aumento de cinco vezes na absorção de ferro não heme quando a atividade eritropoiética foi estimulada através de uma injeção de eritropoetina humana na medula.

A absorção do ferro ocorre predominantemente no duodeno e parte proximal do jejuno. Em geral apenas uma pequena parte do ferro dietético é absorvido: adultos com estado férrico normal absorvem cerca de 15% do ferro heme, podendo atingir absorção de 35-50% em indivíduos cujo estoques de ferro é deficiente; quanto ao ferro não heme, a absorção é em torno de 2% podendo atingir 20% quando o estado férrico está deficiente (Monsen & Balintfy, 1982; Fomon, 1993; Czajka-Narins, 1995).

Muitos trabalhos mostram que a absorção do ferro no trato gastrintestinal acontece em 2 estágios distintos: absorção do ferro heme, que fornecerá ferro para hemoglobina, mioglobina e enzimas e absorção do ferro não heme, destinado a todas os outros compostos de ferro. (Fomon, 1993; Fairweather-tait, 1995; Bothwell, 1995; Beard et al., 1996; Benito & Miller, 1998; Latunde-Dada et al., 1998).

Hoje pensa-se que a absorção do ferro heme não sofre influência de fatores dietéticos e é absorvido como um complexo heme intacto pela mucosa devido sua solubilidade em meio alcalino, através de receptores heme identificados nas vilosidades intestinais de forma a ser dissociado do anel de porfirina dentro da célula pela ação de uma heme oxigenase. Quanto à absorção do ferro não heme, esta se daria em 3 estágios: passagem do intestino para a mucosa celular, passagem através da célula e liberação para a circulação (Beard et al., 1996; Benito & Miller, 1998; Latunde-Dada et al., 1998).

**A) Fe: o passageiro que vai do lúmen intestinal ao interior do enterócito.** Sendo comum o ferro estar sob a forma férrica nos alimentos, ele estará sujeito à precipitação em pH acima de 3 caso não esteja quelado. Conrad et al. (1991) descreveram que mucinas gástricas desempenham um papel relevante na absorção do ferro, porque podem ligar-se ao nutriente em pH ácido mantendo-o solúvel em pH neutro e garantindo sua disponibilidade quando atingir lúmen duodenal. O processo mediado por carreadores é o passo mais elucidado da absorção do ferro e envolve proteínas transportadoras. Outras foram também descritas: Simpson et al. (1988) hipotetizaram que ácidos graxos livres poderiam estar envolvidos na absorção do ferro através da formação de um complexo Fe II – ácido graxo que atravessaria a membrana da célula. Outra hipótese apresentada por Huebers et al. (1983) refere-se a participação de transferrina na absorção do ferro. Suas hipóteses foram baseadas na liberação da apotransferrina no duodeno a qual se ligaria ao ferro e voltaria para a célula por endocitose. Dentro da célula o ferro seria liberado da transferrina e transportado para o sangue se necessário ou permaneceria em estoque. Existe também uma hipótese de que o ferro entraria no enterócito através dos receptores da lactoferrina, os quais já foram identificados nos enterócitos. Porém, considera-se necessária maior evidência sobre esta via de absorção (Cox et al., 1979 citado por Fairweather-tait, 1995).

**B) Fe: o passageiro em transporte.** A presença de receptores de transferrina na membrana basolateral do enterócito infere que a transferrina é a

proteína carreadora do ferro absorvido (Latunde-Dada, 1998). Paradoxalmente estudos mostraram que a transferrina não poderia estar envolvida no transporte intraeritrócito, uma vez que a liberação do ferro na corrente sanguínea é muito rápida e as condições de pH do lado seroso da célula não permite que a transferrina libere o ferro rapidamente (Conrad, 1993; Latunde-Dada et al., 1998). Segundo Benito & Miller (1998), estudos tem demonstrado que uma grande quantidade de ferritina foi encontrada no especificamente no duodeno, o que sugere que a ferritina está diretamente relacionada com a absorção do ferro através da sua capacidade de se ligar com grandes quantidades do mineral. Conrad et al. (1990 e 1993) sugeriram outras duas proteínas ligadoras de ferro bioquimicamente e imunologicamente diferentes da ferritina e transferrina, as quais são chamadas de mobilferrina e integrina e foram identificadas na mucosa duodenal. Considerando estas hipóteses estudos associaram que a absorção do ferro está envolvida com as 4 proteínas citadas de forma que o início do processo ocorre no estômago, onde as mucinas gástricas se ligam ao ferro tornando-o solúvel até o pH alcalino do duodeno. Na mucosa duodenal a integrina transporta o ferro para dentro da célula que será recebido pela mobilferrina que o lança para o citosol. O papel da ferritina seria sequestrar uma possível quantidade excessiva de ferro dentro célula, uma vez que esta proteína tem a capacidade de se ligar com grandes quantidades de ferro, com o objetivo de prevenir danos celulares causados pela oxidação do ferro livre (Beard et al., 1996; Benito & Miller, 1998; Latunde-Dada et al., 1998).

**C) Fe: liberação para a circulação.** Morgan (1980) citado por Benito & Miller (1998) descreveu o *ciclo da transferrina* como responsável pela liberação do ferro na corrente sanguínea. Esta via consiste na entrada do ferro na célula ligado à transferrina, que por sua vez está ligada aos receptores desta proteína, por um processo de endocitose. Estes endossomas secretam ácido favorecendo a liberação do ferro da transferrina para a circulação e o processo se repete após a reciclagem da apotransferrina dentro da membrana plasmática.

Após a liberação na circulação o ferro será incorporado à hemoglobina e outros complexos que necessitem de ferro ou será armazenado. O ferro é estocado sob a forma de ferritina, uma forma solúvel e móvel, ou sob a forma de hemossiderina, uma forma insolúvel e agregada. A molécula de ferritina consiste uma proteína de peso molecular 480 kDa a qual possui 24 subunidades com peso molecular 19 kDa. A apoferritina humana possui uma cavidade côncava onde o ferro é estocado predominantemente no estado férrico em um complexo com hidroxifosfato que o protege da interação com outros componentes celulares. Cada molécula de ferritina pode estocar 4300 átomos de ferro. Quando este ferro é necessário, é convertido em estado ferroso e passa através dos poros da molécula de apoferritina. Grande parte de ferritina está presente no fígado, baço e medula óssea, mas também pode ser encontrada em baixas concentrações no plasma e urina. A hemossiderina é a forma degradada de ferritina proveniente da fagocitose por lisossomos de aglomerados de ferritina. Portanto é uma mistura indefinida de proteínas, lípidos e ferro. O ferro da hemossiderina é menos disponível que o da ferritina devido a membrana do lisossomo. O ácido ascórbico tem um papel importante na inibição da fagocitose lisossomal dos aglomerados de ferritina, preservando então o estoque adequado de ferro na forma de ferritina (Fomon, 1993; Czajka-Narins, 1998; Fairweather-tait, 1995; Cunha & Cunha, 1998).

### **3. Requerimento e Ingestão de Ferro**

Sendo a excreção de ferro muito restrita, o requerimento do nutriente deve ser suficiente para repor as perdas pelas fezes que inclui o ferro não absorvido da dieta e também a descamação celular do epitélio gastrintestinal, ou ainda a perda através da pele e faneros e trato urinário. Para as mulheres após a menarca deve-se acrescentar a perda menstrual e a perda durante a gravidez pela transferência placentária à circulação. Homens adultos perdem, e portanto absorverão 1,0mg de ferro por dia. Mulheres adultas com períodos menstruais normais necessitam de 1,5 a 2,0mg de ferro por dia. As necessidades de lactentes com menos de 6

meses de idade e adolescentes são 0,6mg e 1,2mg de ferro por dia respectivamente. O requerimento de ferro para gestantes durante o segundo e terceiro trimestre da gestação é 4,0 a 6,0mg/dia sendo difícil alcançar este requerimento apenas com ferro dietético. Estudos discutem que os estoques de ferro da gestante podem suprir este período de alto requerimento: desta forma, gestantes que apresentam valores de ferritina sérica de 30 a 40  $\mu\text{g/l}$  conseguem garantir seus requerimentos. Em contrapartida, a maioria das mulheres, especialmente de países em desenvolvimento, não apresentam estoques de ferro normais e portanto, a suplementação diária é recomendada (Recommended Dietary Allowances, 1989; Czajka-Narins, 1998; Cunha & Cunha, 1998; Schultink & Gross, 1996).

O *Food and Nutrition Board*, desde 1941 tem publicado atualizações das *Recommended Dietary Allowances (RDA)*. As recomendações sobre a ingestão de ferro, segundo a *RDA de 1989*, estão apresentadas na Tabela 1.

Em revisão da *RDA* o *Food and Nutrition Board* criou, entre 1998 e 2000, a *DRI (Dietary References Intakes)*, que representa a nova estimativa da quantidade de ingestão de nutrientes, a qual leva em consideração 4 classes (Yates et al. 1998; Trumbo et al. 2001; Amaya-Farfan et al., 2001):

*RDA, Recommended Dietary Allowance*: consumo alimentar suficiente para satisfazer os requerimentos de 97 a 98% da população saudável.

*UL, Tolerable Upper Intake Level* ou “Limite de Ingestão Máxima”: assiste níveis altos de ingestão individual que não resultarão em efeitos adversos.

*EAR, Estimated Average Requirement* ou “Estimativa do Requerimento Médio”: quantidade de nutriente suficiente para atender o requerimento de 50% da população sadia em cada estágio da vida.

*AI, Adequate Intake* ou “Ingestão Adequada”: baseada em dados experimentais de estimativas de ingestão de nutrientes, considerada adequada, para grupos de pessoas saudáveis e é utilizada quando a *RDA* não pode ser calculada.

A Tabela 2 traz os valores de ingestão de ferro recomendados pelas *DRI*. Os valores apresentados constituem a *RDA* ou *AI*, visto que os valores de *EAR* e *UL* não constam na tabela principal.

TABELA 1. *Recommended Dietary Allowance (RDA)* para ferro segundo o *Food and Nutrition Board (1989)*

Idade (anos)	Ferro (mg/dia)
Lactentes	
0,0 – 0,5	6
0,5 – 1,0	10
Crianças	
1 – 3	10
4 – 6	10
7 – 10	10
Homens	
11 – 14	12
15 – 18	12
19 – 24	10
25 – 50	10
51 +	10
Mulheres	
11 – 14	15
15 – 18	15
19 – 24	15
25 – 50	15
51 +	10
Gestação	30
Lactação	
Primeiro Semestre	15
Segundo Semestre	15

TABELA 2. *Dietary Reference Intakes (DRI)* para ferro segundo o *Food and Nutrition Board* (2000)

Estágio de Vida	Ferro (mg/dia)
Bebês	
0-6 meses	0,27*
7-12 meses	11
Crianças	
1-3 anos	7
4-8 anos	10
Homens	
9-13 anos	8
14-18 anos	11
19-30 anos	8
31-50 anos	8
51-70 anos	8
> 70 anos	8
Mulheres	
9-13 anos	8
14-18 anos	15
19-30 anos	18
31-50 anos	18
51-70 anos	8
> 70 anos	8
Gestação	
≤ 18 anos	27
10-30 anos	27
31-50 anos	27
Lactação	
≤ 18 anos	10
10-30 anos	9
31-50 anos	9

\* Valor de AI

#### 4. Deficiência de Ferro

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1968, definiu o termo anemias nutricionais como *“uma condição na qual o conteúdo de hemoglobina do sangue está abaixo do normal como resultado da deficiência de um ou mais nutriente essencial, considerando a causa de cada deficiência”*. A partir disso uma série de estudos administrados pela OMS foram realizados com o objetivo de determinar os diferentes tipos de deficiência, e concluiu-se que a deficiência predominante era a de ferro chegando a ser cerca de 10 vezes mais alta que a do folato ou vitamina B<sub>12</sub>. Segundo Stoltzfus (2001), o estudo realizado por DeMaeyer & Adiels-Tegman (1985) constatou que a deficiência de ferro é a causa mais comum das anemias nutricionais.

De acordo com muitos autores a deficiência de ferro é o maior problema nutricional de saúde pública, e é de ordem econômica e educacional, de países desenvolvidos e desenvolvimento. Sua principal prevalência ocorre em mulheres grávidas e crianças em idade pré-escolar (Cook & Reusser, 1983; Stephenson, 1995; Queiroz & Torres, 1995; Ziegler & Fomon, 1996; Viteri, 1997; Freire, 1997; Benoist, 2001; Stoltzfus, 2001).

No Brasil, nos últimos 20 anos, a prevalência de anemia vem aumentando. Na década de 70 a ocorrência de crianças com hemoglobina abaixo de 11g/dl na cidade de São Paulo era 22%; atualmente atinge 35%. O Grupo de Atenção à Nutrição da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, entre 1991 e 1994 realizou investigações sobre a prevalência de anemia em crianças atendidas nas Unidades Básicas de Saúde: cerca de 60% das crianças eram anêmicas, o que permitiu que os autores concluíssem que a anemia ferropriva é a principal patologia em crianças abaixo de 2 anos de idade em todo o Estado de São Paulo (Queiroz & Torres, 1995). De acordo com Batista Filho & Ferreira (1996) citado por Simões (1998), a prevalência de anemia em gestantes e parturientes em Pernambuco é 30,3% e 38,4% respectivamente. Atualmente, de acordo com

dados do Ministério da Saúde, aproximadamente 50% das crianças brasileiras entre 6 e 24 meses apresentam deficiência de ferro e anemia (Ministério da Saúde. Política Nacional....., disponível em <http://www.saude.gov.br>)

O estágio inicial da deficiência de ferro é chamado *depleção de ferro* e caracteriza-se pela redução dos estoques de ferro. A concentração de ferro sérico e hemoglobina, porém são normais. O estágio a seguir é denominado *deficiência de ferro sem anemia*, o qual apresenta eritropoiese normocítica deficiente de ferro; os níveis séricos de ferro e a saturação da transferrina, porém estarão diminuídos. O último estágio da deficiência nutricional de ferro é a *anemia ferropriva* propriamente dita em que a concentração sérica de ferro e a saturação da transferrina estão reduzidas. Os valores de hemoglobina e hematócrito também estão reduzidos e os índices hematimétricos VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Média) e CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média), abaixo dos níveis normais são característicos de células microcíticas e hipocrômicas, (Williams et al., 1983; Rapaport, 1987; Herbert, 1987; Halberg et al., 1993; Roodenburg, 1995; Pippard, 1995).

As infecções parasitárias, além do aporte dietético de ferro insuficiente aprofundam o estado anêmico, sobretudo em mulheres e crianças pré-escolares. A relação entre intensidade da infecção parasitária e concentração de hemoglobina é notória em estudos epidemiológicos. Segundo Layrisse & Roche (1964) a concentração de hemoglobina está intimamente relacionada com o número de ovos do parasita nas fezes. Programas de controle da deficiência de ferro causada por infecções parasitárias não são muito comuns, no entanto, programas de controle das infecções parasitárias tem-se mostrado efetivo na correção da anemia, embora haja a necessidade de intervenções múltiplas (Stoltzfus, 1997).

Sendo o ferro, componente essencial de várias enzimas, muitos órgãos ou sistemas apresentam alterações funcionais e estruturais quando o organismo não

recebe suficiente aporte do nutriente. A deficiência de ferro tornando-se severa, poderá provocar alterações na estrutura e funções do tecidos epiteliais, em especial da boca, língua e estômago, e ainda, redução da resposta imunológica, visto que o ferro é essencial para o desenvolvimento e integridade do tecido linfóide; ocorrerão também alterações de termoregulação devido a redução significativa de hormônios tireoideanos. Entretanto, as principais consequências da deficiência de ferro estão relacionadas com o desenvolvimento psicomotor e cognitivo durante a infância, uma vez que, a frequência da deficiência de ferro ocorre nos 2 primeiros anos de vida, ou seja, durante o período de crescimento do cérebro e desenvolvimento psicomotor (Dallman, 1989; Cook et al., 1992; Czacka-Narins, 1995; Brunken & Szarfarc, 1999).

Segundo Brunken & Szarfarc (1999), muitos pesquisadores desenvolveram trabalhos em que se relacionava anemia ferropriva e desenvolvimento psicomotor em crianças. Em todos os trabalhos, foi encontrada a relação entre deficiência de ferro e redução de capacidade psicomotora; a duração e severidade da deficiência consistiam variáveis importantes no processo. Não há certeza quanto a reversibilidade das alterações, visto que mesmo após longos períodos de tratamento, as crianças ainda apresentavam deficiências cognitivas.

Há Indícios sobre a associação da anemia por deficiência de ferro com mortalidade infantil, no entanto, não há substancialidade nas evidências. Brabin et al. (2001) analisaram os relatos que discutiam anemia como fator de risco para a mortalidade infantil através de estudos seccionais e longitudinais. Os resultados mostraram que crianças com valores de hemoglobina abaixo de 5g/dl apresentavam maior risco de mortalidade. Porém, ocorreu que mais da metade das crianças analisadas, oriundas de países em desenvolvimento, apresentaram anemia decorrente não só da deficiência nutricional de ferro, mas também da malária, visto que a maioria das pesquisas ocorreu na África.

Em adultos é conhecida a relação entre deficiência de ferro e capacidade física de trabalho. Hass & Brownlie (2001) realizaram recente estudo em animais e humanos. Demonstraram, estes autores, que a deficiência de ferro, seja leve, moderada ou severa, causam alterações de capacidade aeróbica, eficiência energética, atividade voluntária e produtividade. Visto que o problema da deficiência de ferro é de âmbito público, nascem estímulos plausíveis para associar os resultados obtidos no laboratório com efeitos sócio-econômicos. Zhu & Haas (1998), evidenciaram que a quantidade de energia que um indivíduo anêmico necessita é 5% maior do que um indivíduo não anêmico ao realizarem a mesma função. Em conclusão, a anemia ferropriva é devastadora durante a primeira infância e na vida adulta permanece como patologia grave e inaceitável em termos de saúde e dignidade humana.

Após a Organização Panamericana de Saúde e Organização Mundial de Saúde designarem o problema da deficiência de ferro e anemia como prioridade para o desenvolvimento de planos de ação, o *World Summit for Children* em 1990 assegurou a redução da prevalência de mulheres grávidas anêmicas em 1/3 até o ano 2000. A mesma meta foi aspirada pela *World Health Assembly* em 1991 e no *International Conference on Nutrition* em 1992. A estratégia desenvolveu-se através de programas de suplementação e fortificação, diversificação dietética, comunicação em massa e acompanhamento epidemiológico. No entanto, os planos de ação não se desenvolveram de forma a retirar a anemia ferropriva da categoria de principal problema nutricional de saúde pública. Assim sendo, em 2000 a Organização Mundial de Saúde e o *International Nutritional Anemia Consultative Group* patrocinaram o *Belmont Conference Center* que objetivou, em termos de saúde pública, esclarecer a gravidade das consequências da deficiência de ferro e anemia (Freire, 1997; Benoist, 2001).

## 5. Avaliação do Estado Corporal de Ferro

O estado férrico corporal é considerado normal quando a eritropoiese se transcorre sem limitações e quando há reserva de ferro suficiente para manter as funções fisiológicas normais. (Worwood, 1995).

Visto que a carência nutricional de ferro instala-se gradual e progressivamente, a avaliação do estado corporal do nutriente pode ser realizada através de parâmetros bioquímicos e hematológicos, os quais devem ser analisados juntos. A escolha dos parâmetros deve ser feita de maneira rigorosa, considerando características tanto intrínsecas quanto extrínsecas da população. (Paiva et al., 2000).

Desde a década de 70 o *National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES)* tem discutido parâmetros para a avaliação do estado férrico de grupos populacionais. A população analisada e o acréscimo ou restrição de alguns parâmetros hematológicos ou bioquímicos constituem o diferencial entre os estudos. O objetivo da padronização dos parâmetros, para avaliação do estado corporal de ferro, permaneceu em pauta (Looker et al., 1995). A Tabela 3 apresenta os indicadores para a avaliação do estado corporal de ferro propostos nos 4 estudos realizados pelo *NHANES*.

De acordo com Worwood (1997), o estado de ferro corporal pode ser estimado através da avaliação do conteúdo de *ferro funcional* que compreende concentração de hemoglobina, índices hematimétricos (VCM e HCM), protoporfirina eritrocitária, ferritina eritrocitária e receptor de transferrina sérica, *ferro tecidual* que compreende ferro sérico, capacidade total de ligação de ferro e saturação da transferrina e *ferro estocado* compreendendo flebotomia quantitativa, ferro contido no fígado e medula óssea e ferritina sérica.

A flebotomia é o único método quantitativo “*in vivo*” para avaliar o estado de ferro corporal de forma que a quantidade de ferro disponível para a síntese de hemoglobina pode ser determinada através da remoção de sangue com o objetivo de induzir anemia fazendo com que o organismo tenha que mobilizar ferro dos estoques hepáticos e esplênicos, no entanto, o uso desta metodologia se torna inviável já que o processo é invasivo (Worwood, 1997; Paiva et al., 2000).

TABELA 3. Indicadores para a avaliação do estado de ferro propostos pelos quatro estudos do *NHANES I* (1971-1975), *NHANES II* (1976-1980), *HHANES* (1982-1984) e *NHANES III* (1988-1994)

Indicadores	NHANES I <sup>1</sup>	NHANES II <sup>1</sup>	HHANES <sup>2</sup>	NHANES III <sup>1</sup>
<b>Indicadores hematológicos</b>				
Hemoglobina	X	X	X	X
Hematócrito	X	X	X	X
Contagem de células vermelhas	X	X	X	X
Volume celular médio (VCM)		X	X	X
Hemoglobina corpuscular média (HCM)		X	X	X
Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)		X	X	X
Distribuição de células vermelhas				X
<b>Indicadores bioquímicos</b>				
Ferro sérico	X	X	X	X
Capacidade total de ligação de ferro	X	X	X	X
Saturação da transferrina	X	X	X	X
Protoporfirina eritrocitária livre		X	X	X
Ferritina sérica		X	X	X
<b>Indicadores de infecção ou inflamação</b>				
Contagem de células brancas	X	X	X	X
Taxa de sedimentação eritrocitária	X			
Proteína reativa C				X
Fibrinogênio plasmático				X

<sup>1</sup> População alvo do estudo: grupos civis não institucionalizados dos EUA

<sup>2</sup> População alvo do estudo: grupos hispânicos dentro dos EUA (mexicanos, cubanos e porto riquenhos)

Outro método considerado como “padrão ouro” para a avaliação do estado nutricional de ferro é o teste “*in vitro*” em que se determina a hemossiderina da medula óssea, já que deficiência de ferro na medula óssea está relacionada de modo incontestável com a depleção do nutriente. A dificuldade de coleta do material necessário para a análise a torna inviável, em primeira instância, visto que a punção da medula vermelha é dolorosa e exige pessoal treinado (Paiva et al., 2000).

A concentração de hemoglobina é o parâmetro universalmente utilizado na avaliação do estado férrico, embora este parâmetro apresente alterações somente no estágio final da deficiência de ferro. O uso isolado da concentração de hemoglobina pode não garantir especificidade e sensibilidade suficientes para julgar a deficiência. Segundo Cook & Finch (1979), quando outros indicadores são considerados em conjunto com a concentração de hemoglobina, a prevalência da deficiência de ferro e anemia aumentaria de modo significativo. Os autores concluíram que pelo menos outros dois indicadores deveriam ser também utilizados.

Uma vez que a preocupação da comunidade científica está em investigar a prevalência de anemia e também em identificar o estado nutricional de ferro de grupos populacionais, diferentes parâmetros laboratoriais têm sido utilizados em conjunto, com o objetivo de discriminar os distintos estágios da deficiência de ferro assim como as características particulares da população estudada. (Paiva et al., 2000).

## **6. Programas Nutricionais de Suplementação e Fortificação**

As estratégias de controle da deficiência de ferro e anemia concentram-se em melhorar os hábitos alimentares da população de forma a garantir o aporte suficiente dos nutrientes responsáveis pelo processo normal de eritropoiese. É importante ressaltar que estas práticas incluem principalmente aleitamento

materno, estímulo à diversificação dos alimentos fontes e de alimentos que possam aumentar a biodisponibilidade do ferro e a exclusão da dieta de fatores inibidores de absorção (Viteri, 1997).

Ao planejar programas de intervenção para sanar o problema da deficiência de ferro, uma série de atividades deverão ser realizadas para estabelecer as características do grupo populacional alvo, as quais incluem a determinação da prevalência da deficiência, quantidade de ferro dietético ingerido, grau de absorção do nutriente, tipos e frequência de alimentos consumidos de forma a auxiliar a escolha do veículo. A partir daí, o próximo passo será escolher o tipo e a dose do fortificante e um veículo tecnologicamente aprovado e, finalmente, os recursos para a avaliação da eficiência do programa (Cook & Reusser, 1983).

Segundo Viteri (1997), as autoridades responsáveis pelo planejamento de estratégias para o controle da anemia preocupam-se muito com programas curativos de suplementação, embora os programas preventivos tenham importância fundamental para a comunidade. O autor relata não haver sistematização de dose ou frequência de suplementação que vise o determinado público de risco, como por exemplo, crianças em idade pré-escolar, adolescentes e mulheres em idade fértil. Entretanto, a suplementação e a fortificação de alimentos ainda constituem ferramenta indispensável para o controle de carências nutricionais específicas como a de ferro. Contudo, quando o objetivo é suplementar ou fortificar, uma série de fatores devem ser levados em consideração, os quais incluem aspectos legais, tecnológicos e conseqüentemente o impacto causado pelos programas de intervenção na sociedade (Mejía, 1994).

A fortificação nutricional é milenar. A primeira menção de adição de nutriente em alimentos foi na Pérsia, antes de Cristo, onde tinha-se o hábito de acrescentar ferro ao vinho para "aumentar a força dos soldados". Em meados do século IX, um médico francês sugeriu a adição de iodo ao sal visando a prevenção

do bócio. A suplementação foi realmente estabelecida entre 1934 e 1944 como procedimento de correção, prevenção de deficiências nutricionais na população ou restauração de nutrientes perdidos durante o processamento dos alimentos (Mejía, 1994).

Uma vez que o objetivo é adicionar nutriente para promover a manutenção ou o aumento do valor nutricional do alimento de forma a corrigir ou prevenir carências nutricionais, é importante salientar que existem diferenças entre os termos suplementação e fortificação, sendo que essas diferenças apresentam-se de acordo com a legislação vigente específica de cada localidade.

A Legislação Brasileira determina por meio da Portaria nº 31 de 13 de janeiro de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde que a definição de fortificação seja a seguinte: *“Considera-se alimento fortificado/enriquecido ou simplesmente adicionado de nutrientes todo alimento ao qual for adicionado um ou mais nutrientes essenciais contidos naturalmente ou não no alimento, com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo e ou prevenir ou corrigir deficiência(s) demonstrada(s) em um ou mais nutrientes, na alimentação da população ou em grupos específicos da mesma.”* E ainda que a quantidade permitida a ser adicionada por 100ml ou 100g de alimento, forneça no mínimo 15% da IDR se o alimento for líquido, ou no mínimo 30% das IDR se o alimento for sólido. Da mesma forma, a Portaria nº 32 de 13 de janeiro de 1998, define o termo suplementação como: *“Suplementos Vitamínicos e ou de Minerais para fins deste regulamento, doravante denominados simplesmente de “suplementos”, são alimentos que servem para complementar com estes nutrientes a dieta diária de uma pessoa saudável, em casos onde sua ingestão, a partir da alimentação, seja insuficiente ou quando a dieta requer suplementação. Devem conter um mínimo de 25% e no máximo até 100% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitaminas e ou minerais, na porção diária indicada pelo fabricante, não podendo substituir os alimentos, nem serem considerados como dieta exclusiva.”*

Atualmente os fortificantes de ferro estão sendo utilizados em larga escala, com base no conhecimento de sua biodisponibilidade através das numerosas técnicas de determinação. Visto que fortificar alimentos com ferro, tecnologicamente, é mais complexo que fortificar alimentos com outros nutrientes, o sucesso da fortificação depende tanto do tipo de composto a ser adicionado quanto da natureza do alimento a ser fortificado. As propriedades organolépticas, a biodisponibilidade e o custo são os principais fatores a considerar na escolha do fortificante. Há um bom número de compostos de ferro adicionáveis a alimentos. Os mais utilizados podem ser apresentados em quatro grupos: os solúveis em água (sulfato ferroso, gluconato ferroso, citrato férrico de amônia e sulfato ferroso de amônia); os pouco solúveis em água, porém solúveis em soluções ácidas (Succinato ferroso, fumarato ferroso e sacarato férrico); os insolúveis em água e pouco solúveis em soluções ácidas (ortofosfato férrico, pirofosfato férrico e ferro elementar); ferro hematínico (hemoglobina e mioglobina); e quelatos (ferro sódio etilenodiaminotetraacetato – FeNaEDTA) (Cook & Reusser, 1983; Mejía, 1994; Hurrell, 1997).

O sulfato ferroso é o mais utilizado devido a oferta e ao baixo custo; tende a causar alterações organolépticas e fisicoquímicas indesejáveis nos alimentos devido a sua alta reatividade química, assim como os outros sais de ferro. O FeNaEDTA é um fortificante muito utilizado devido a sua estabilidade durante processamentos térmicos e pouca alteração no alimento. Tem uma absorção 2-3 vezes melhor que o sulfato ferroso, porém tem custo muito elevado (Brunken & Szarfarc, 1999).

Os aminoácidos quelatos são atraentes pela construção bioquímica e seriam indicados para programas de fortificação devido a elevada biodisponibilidade e ausência de alterações organolépticas do alimento. O fato se deve a baixa reatividade química, porque o ferro está protegido por aminoácidos através de anéis heterocíclicos, o que reduz a irritação gástrica e reações adversas com componentes dietéticos, garantindo a estabilidade do composto até

o momento da absorção (Pineda et al., 1994; Olivares et al., 1997; Iost et al., 1998; Pizarro et al., 1998; Jeppsen & Borzelleca, 1999).

A metodologia de compostos microencapsulados tem sido testada em humanos e trata-se de uma nova forma de administração de ferro via oral. Consiste em cápsulas de ferro com liberação lenta para o organismo e oferece maior retenção do micronutriente no estômago, promovendo melhor absorção. Os resultados demonstraram que a absorção do ferro microencapsulado é satisfatória e que constitui uma alternativa efetiva para os programas de fortificação de alimentos. Não foram observadas influências de fatores dietéticos ou alterações de propriedades organolépticas do alimento em estudos com ferro microencapsulado (Brunken & Szarfarc, 1999; Bioch et al., 1999).

Para garantir a eficiência e eficácia do plano de intervenção, fatores como intensidade de consumo do produto e viabilidade tecnológica para adição de nutriente são minuciosamente analisados. O veículo não deverá ser caro e nem deverá ter seu preço elevado após o processo de fortificação, tentando assim garantir o acesso por parte do público alvo. Assim, os principais alimentos utilizados em programas de fortificação são farinha de trigo, sal, açúcar, arroz, condimentos, amido de milho, leite e derivados, e cereais processados (Cook & Reusser, 1983; Mejía, 1994; Hurrell, 1997).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (MS), aproximadamente 90% das anemias nutricionais são causadas por deficiência de ferro. Assim, a Política Nacional de Alimentação e Nutrição priorizou planos de ação para o controle da deficiência nutricional do ferro. O Ministério da Saúde realizou ações estratégicas de intervenção, visando o controle da anemia ferropriva, de forma que as instituições comprometidas com os planos de ação, desenvolveram duas táticas operacionais.

A primeira ação iniciou-se em 1998 na Região Nordeste, em conjunto com o Projeto de Redução da Mortalidade na Infância (PRMI) e Programa Saúde Família

(PSF), e teve como objetivo principal a redução da incidência da anemia ferropriva de crianças entre 6 e 24 meses através da suplementação medicamentosa semanal de sulfato de ferroso. Paralelamente, o Projeto desenvolveu atividades de aconselhamento dietético às famílias que tinham crianças entre 6 e 24 meses de idade, de forma a distribuir material educativo acompanhando o suplemento. Ao iniciar o trabalho, a pretensão de cobertura acercava 300.000 crianças, sendo que após 1 ano de implementação do Projeto o número de crianças atendidas ultrapassou a meta. Estima-se que até o ano 2003 haja a consolidação e extensão do Projeto para todos os municípios da região.

A Segunda tática operacional ocorreu como “Compromisso Social para a Redução da Anemia por Carência de Ferro no Brasil”, que foi priorizado entre as diretrizes da Política Nacional de Alimentação e Nutrição em 1999. Foram envolvidas no plano de ação as instituições governamentais, associações da indústria de alimentação, movimentos de defesa do consumidor, movimentos pela segurança alimentar e nutricional, instituições acadêmicas e de pesquisa, sociedades científicas e órgãos internacionais. A finalidade do compromisso está sendo discutir e estabelecer estratégias de mobilização nacional para o controle da anemia através de várias atividades: garantia de alimentação saudável, orientação para diversificação de dieta, distribuição de suplementos e fortificação de parte da produção brasileira de farinha de trigo e fubá. A meta do compromisso é reduzir a prevalência de anemia em crianças brasileiras pré-escolares e escolares em 1/3 até o ano de 2003.

## **7. Valor da Soja na Alimentação Humana**

O consumo da soja aumenta consideravelmente entre os indivíduos que reconheceram-se alérgicos ou intolerantes a outras fontes protéicas, e por pessoas sem problemas fisiológicos específicos que objetivam uma alimentação saudável (Lönnerdal, 1994; Dias, 1997).

Numerosos estudos vêm tentando mostrar o efeito de substâncias ou nutrientes presentes na soja, a busca para amenizar doenças crônicas como cardiopatias, osteoporose, obesidade, enfermidades renais e vários tipos de câncer, assim como a prevenção e tratamento dos sintomas apresentados na menopausa. Substâncias anteriormente consideradas apenas antinutricionais passaram para o elenco das fitoterápicas ou nutracêuticas. Dentre as substâncias presentes na soja que podem conferir efeito terapêutico pode-se citar os inibidores de proteases, o ácido fítico, as saponinas e os fitoestrógenos, sendo este último, sobretudo as isoflavonas (genisteína e daidzeína) as substâncias mais estudadas em relação à atividade biológica nutracêutica, devido a alta concentração no grão da soja, a qual oscila entre 1 a 4mg/g dependendo da variedade do grão (Messina, 1995; Anderson & Wolf, 1995; Goldberg, 1995; Dias 1997; Mazur et al., 1998; Lee & Kim, 2000; Messina, 2000).

Em trabalho realizado com macacos por Clair (1998) a avaliação do efeito benéfico dos fitoestrógenos na redução dos níveis plasmáticos de lipoproteínas foi feita através da administração de dietas que continham soja como fonte protéica, cujos fitoestrógenos foram extraídos ou não. Os resultados mostraram que os animais que consumiram dietas que continham a soja intacta, ou seja, com os fitoestrógenos, apresentaram concentração de colesterol significativamente menor que os animais que tiveram os fitoestrógenos extraídos da soja.

Aoyama et al. (2000), citado por Lee & Kim (2000), demonstraram o efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico em ratos alimentados com dietas acrescidas de proteína de soja e isto poderia ser associado com a prevenção e tratamento da obesidade. Os autores hipotetizaram que o mecanismo responsável estaria relacionado com segmentos hidrofóbicos da proteína que poderiam induzir a hipolipidemia através da aceleração do metabolismo lipídico, visto que, aminoácidos sulfurados têm sido associado com baixa concentração de colesterol sérico.

Segundo estudo realizado por Tikkanem & Adlercreutz (2000), a utilização de suplementação dietética com isoflavonas derivadas da soja reduz a suscetibilidade de oxidação de lipoproteína de baixa densidade e, ainda que a incorporação dos isoflavonóides lipofílicos nesta lipoproteína potencializa o efeito de resistência a oxidação e promove ação antiaterogênica.

Boersma et al. (2001) tem estudado uso da soja na dieta com o objetivo de prevenir uma variedade de doenças crônicas incluindo o câncer. As isoflavonas presentes na soja, em especial a genisteína, apresentam inúmeros mecanismos de ação que conduzem as atividades biológicas benéficas, como a regulação de eventos mediados por estrógenos e inibição ou ativação da atividade enzimática relacionada ao DNA. No entanto, mais investigações devem ser feitas com o intuito de avaliar alguns limitantes, como a concentração de genisteína disponível, e assim identificar evidências que contribuíssem para o aumento do potencial anticarcinogênico dos isoflavonóides presente na soja.

Os produtos derivados da soja, em geral, contêm 1 a 10mg de isoflavonas por grama de proteína. É discutido que a quantidade de isoflavona necessária para o efeito fitoterápico é entorno de 76mg/dia, equivalente a 40g/dia de proteína isolada de soja. Portanto, se não há o uso de suplementos, será necessário incentivo no intuito de aumentar o consumo de soja para alcançar o efeito desejado (Alpers et al., 2001). A posição do *Food and Drug Administration (FDA)* em relação à adição de proteína de soja em alimentos comerciais, com objetivo de resultados fitoterápicos, é que os alimentos contenham no mínimo 6,25g da proteína por porção recomendada pelo fabricante (TITLE 21-Food and Drugs disponível em <<http://www.cfsan.fda.gov/>>).

O Terceiro Simpósio Internacional sobre o papel da Soja na Prevenção e Tratamento de Doenças Crônicas, realizado em 1999 discutiu o uso da soja e seus fitoestrógenos na prevenção e tratamento clínico da osteoporose, hipertensão, hipercolesterolemia e câncer, assim como a possibilidade da

utilização da soja no tratamento de reposição hormonal de mulheres na menopausa. Uma vez que a incidência dessas doenças crônicas vem aumentando, surge a necessidade de pesquisas que investiguem de maneira exaustiva a possibilidade do uso da soja como alternativa terapêutica, visando o completo entendimento dos mecanismos de ação responsáveis pelo efeito nutracêutico dos compostos (Lee & Kim, 2000; Glade, 2001).

Além de ser uma fonte de óleo, a soja é reconhecida como uma excelente fonte protéica tanto para alimentação animal quanto para alimentação humana. Embora limitante em alguns aminoácidos sulfurados a proteína da soja é de fácil digestão e rica em aminoácidos essenciais (Antunes e Sgarbieri, 1981; Liener, 1994).

A soja e seus produtos são utilizados como ingredientes de alimentos processados, visto que constitui uma importante fonte nutricional de baixo custo. Os produtos da soja podem ser divididos em várias categorias: 1) Produtos cujos grãos são descascados e desgordurados através de extração por hexano, que podem ser moídos e originam a farinha de soja com aproximadamente 50 a 54% de proteína, ou então pode-se realizar a extração com etanol para remover compostos relativos ao sabor e alguns açúcares originando o concentrado protéico de soja (65 a 70% de proteína), ou ainda extração com álcali removendo fibras por centrifugação e precipitação, que dará origem ao isolado protéico de soja (> 90% de proteína). 2) Extrato hidrossolúvel de soja (EHS), conhecido popularmente como “leite de soja”, obtido através dos processos maceração, trituração, cocção e filtragem dos grãos de soja de forma que o filtrado caracteriza o extrato hidrossolúvel. O EHS pode ser liofilizado caracterizando o “leite de soja” em pó. 3) Proteína Texturizada de Soja obtida por extrusão, em geral, da farinha de soja. Os produtos que são submetidos a tratamento térmico tem valor biológico aumentado; as substâncias que poderiam conferir sabor indesejável são destruídas ou inativadas. 4) Fórmulas infantis a base de soja, obtidas a partir de isolado protéico de soja e acrescidas de aminoácidos, minerais e vitaminas. 5) “Yogurt de soja”

proveniente da fermentação do “leite de soja”. 6) Misturas de proteína de soja com cereais, gelatinas, estabilizantes e emulsificantes, os quais são aplicados em processos de panificação (Costa, 1981; Cabral, 1981; Travaglini & Vitti, 1981; Dupuy et al., 1994; Lusas & Riaz, 1995; García et al., 1998).

## **7.1. Alguns Fatores antinutricionais**

Os fatores antinutricionais da soja, podem interferir na alimentação humana; o tratamento térmico durante o processamento é um procedimento indispensável para a destruição ou inativação desses compostos responsáveis por alterações indesejáveis (Anderson & Wolf, 1995; Dias, 1997).

### **7.1.1. Inibidores de proteases**

Os inibidores de proteases tem sido alvo de muitos estudos no que diz respeito aos efeitos adversos que causam ao valor nutricional da soja. Pode-se classificá-los em duas categorias: os inibidores *Kunitz* e os inibidores *Bowman-Birk*, os quais possuem especificidade para tripsina e quimotripsina respectivamente. Segundo dados publicados por Liener (1994), ratos alimentados com soja sem tratamento térmico apresentaram perda de peso devido a presença de hipertrofia e hiperplasia das células pancreáticas, o que causa o aumento da secreção enzimática pelo órgão que mobiliza os aminoácidos para esta finalidade indisponibilizando-os para a síntese protéica. O mecanismo de controle de secreção pancreática é inversamente proporcional a concentração de protease no intestino delgado, de forma que ao ocorrer a complexação da enzima com o inibidor e conseqüentemente a concentração da mesma tornar-se reduzida, inicia-se o processo de compensação pelo pâncreas mediado pela colecistoquinina liberada pelas células endócrinas do duodeno ao detectar baixa concentração de protease. Contudo, a maioria dos produtos derivados da soja e comercialmente disponíveis ainda possuem cerca de 5 a 20% de atividade de inibidora de proteases, por conta da convenção da quantidade de calor necessária para

inativar os inibidores e não resultar na perda da qualidade nutricional do alimento (Liener, 1994; Dupuy, 1994).

### **7.1.2. Hemaglutininas ou lectinas**

Liener (1994) relata que as lectinas exercem atividade inibitória sobre crescimento de ratos alimentados com soja isenta de tratamento térmico; porém, lectinas de outras leguminosas parecem exercer maior atividade inibitória sobre o crescimento. Sabe-se que as lectinas da soja são inativadas por calor úmido, mas são resistentes ao calor seco. Embora sejam relatados os efeitos deletérios das lectinas, não há indícios de que a intensidade de atividade hemaglutinante encontrada nos produtos de soja após tratamento térmico apresente risco à saúde humana. Esta classe de glicoproteínas bioativas é amplamente aplicada em estudos bioquímicos, devido à afinidade por carboidrato na superfície celular (Liener, 1994; Liu, 1999; Friedman & Brandon, 2001).

### **7.1.3. Ácido Fítico**

Composto cíclico contendo 6 grupos fosfatos, constitui cerca de 1 a 1,5% do peso seco dos grãos. Liga a certos minerais, sobretudo o zinco e ferro e cálcio, formando complexos insolúveis que não podem ser absorvidos pelas células intestinais. De acordo com trabalhos citados por Liener (1994), dietas que continham elevada concentração de fitatos promoveram menor absorção de cálcio. Dietas que tiveram redução de fitatos de até 90% apresentaram um aumento de 4 vezes da absorção do ferro não heme. Embora haja indícios de que a desfitinização dos produtos de soja aumente a biodisponibilidade dos minerais, alguns trabalhos apresentam resultados conflitantes, cujos argumentos situam-se na ausência de tratamentos estatísticos suficientes para afirmar ou negar a influência do ácido fítico sobre a biodisponibilidade de minerais (Hallberg et al., 1989). A literatura apresenta avaliações da influência do ácido fítico na biodisponibilidade de minerais, em especial o ferro, utilizando fitato purificado, por

exemplo, o fitato de sódio, o qual é diferente do fitato dos alimentos: nestes veículos o fitato está acoplado com outros minerais como cálcio e magnésio, e portanto, não totalmente livre para formar complexos insolúveis (Rotruck & Luhrsen 1979). Além do tratamento térmico, pode-se extrair o ácido fítico da soja e seus produtos através da hidrólise enzimática promovida por fitase endógena. Produtos derivados da soja que passaram por processo de fermentação apresentam teor de ácido fítico menor quando comparados aos produtos não fermentados, por conta da ação da fitase produzida pelo próprio microorganismo utilizado no processo, podendo atingir cerca de 90% de redução do conteúdo de fitatos (Liener, 1994; Dupuy, 1994; Anderson & Wolf, 1995).

Visto que a tendência da indústria moderna de alimentos é oferecer fontes alternativas de proteína animal, as proteínas vegetais particularmente a proteína da soja, constituem alvo exacerbado de estudo. Ao considerar-se estes fatos os alimentos derivados da soja, assim como uma série de outros produtos, devem sofrer processamento, sobretudo térmico, com o intuito de remover os compostos que possam causar alterações indesejáveis, promovendo maior acessibilidade e palatabilidade do produto. Entretanto, especial cuidado deve ser tomado em relação a preservação das propriedades nutricionais do alimento já que o objetivo é produzir alimentos de relativo baixo custo e boa aceitabilidade, porém nutritivos (Dahiya & Kapoor, 1993; Anderson & Wolf, 1995).

## **7.2. Soja no Brasil**

Sua difusão mereceu a devida importância no País, vide a existência do Centro Nacional de Pesquisa em Soja da Embrapa e a atuação do Instituto Agrônomo de Campinas, para citar apenas 2 exemplos.

O livro editado por Miyasaka e Medina (1981), *A Soja no Brasil*, é excelente para introduzir o leitor até a referida data. Este esforço para acompanhar a

evolução (senão revolução) da soja no mundo foi atualizado por KeShun Liu, “*Soybeans: chemistry, technology and utilization*” publicado em 1999.

A diversidade de produtos foi obtida mediante o melhoramento genético ocorrido no século passado. Para o presente trabalho enfocou-se o ferro contido nas diferentes ofertas. A Tabela 4 traz uma distribuição da concentração de ferro nos conhecidos produtos da soja.

TABELA 4. Concentração de ferro de alguns produtos derivados da soja

Produtos Derivados	Fe (mg/100g)
Grão Inteiro	1,89
Farinha de Soja	4,26
Proteína Texturizada de Soja	3,05
Isolado Protéico de Soja	6,98
EHS *	-
“Yogurt”	-

\* Extrato Hidrossolúvel de Soja

Fonte: Garcia et al., 1998.

A eleição da Proteína Texturizada de Soja, como veículo de fortificação, deveu-se não somente pelo seu relativo teor limitado de ferro em relação aos demais produtos, mas também pela amplitude de produção decorrente da forte demanda do mercado interno. Afora estes fatos, a PTS constitui fonte protéica passível de substituição parcial em alimentação institucional.

## ARTIGO I

Artigo apresentado conforme as normas de publicação da Revista de Nutrição/*Journal of Nutrition* da Pontifícia Universidade Católica de Campinas - Puccamp

## AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DO FERRO EM DIETA CONTENDO PROTEÍNA ANIMAL E PROTEÍNA DE SOJA FORTIFICADA COM SULFATO E QUELATO DE FERRO

SANTOS-ZAGO, Ferreira Lilia<sup>1</sup>; TAVARES, Débora de Queiroz<sup>2</sup>

### RESUMO

Proteína Texturizada de Soja (PTS) é adicionada, em vários países latino-americanos, às carnes e ingerida, com o carboidrato de preferência da região. Devido à crescente possibilidade de oferecer esta proteína vegetal, a soja torna-se alvo de crítica porque ao substituir a carne poderia estar reduzindo o necessário aporte de ferro nas dietas. Se for desejável a fortificação da PTS com ferro, sabe-se que é simples e viável. Acrescente-se que a presença da proteína animal promove a absorção de ferro não hemínico. O objetivo deste trabalho foi identificar o sal de ferro e a quantidade que oferece a melhor velocidade de repleção de ferro à ratos alimentados com dietas fortificadas. O ensaio foi constituído com 4 grupos experimentais e 2 grupos controles com 8 animais cada. Um grupo controle recebeu caseína como fonte protéica e o segundo grupo controle recebeu a mistura protéica (PTS + proteína animal na proporção de 1:1) sem fortificação, onde a concentração de ferro era semelhante ao primeiro grupo controle. Para os outros 5 grupos a fonte protéica foi PTS + proteína animal na proporção de 1:1. A PTS foi fortificada com Sulfato Ferroso na concentração de 0,83mg/g (SF) e 1,66mg/g (SF<sub>2</sub>). Analogamente seguiu-se a fortificação com Bisglicinato Quelato Ferroso também na concentração 0,83mg/g (QF) e 1,66mg/g (QF<sub>2</sub>). Os 5 grupos de ratos receberam as respectivas dietas após serem depletados em ferro até o nível de anemia não severa. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos analisados foram aqueles recomendados pelo *NHANES*. Ao 25º dia de repleção

---

<sup>1</sup> Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas. Correspondência para: SANTOS-ZAGO, L.F. E-mail: lzago@fea.unicamp.br

<sup>2</sup> Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. E-mail: debora@fea.unicamp.br

em ferro os grupos apresentaram  $15,8 \pm 0,73$ g/dl como concentração média de hemoglobina. Os grupos controle demonstraram a mesma capacidade de regeneração de hemoglobina. Concluiu-se que PTS + proteína animal (1:1) fornecendo 0,48mg de Fe/dia são suficientes para a recuperação da hemoglobina. Acima deste patamar não houve aceleração de repleção, conforme demonstraram os valores de Fe, TIBC e saturação da transferrina. A associação de PTS e proteína animal, bem sucedida, pode ter obscurecido a biodisponibilidade intrínseca a PTS.

**Termos de indexação:** biodisponibilidade de ferro, anemia ferropriva, fortificação, proteína de soja, proteína animal

## ABSTRACT

*Texturized Soy Protein (PTS) is added to meat in many latin-american countries. Due to the increasing possibility of offering people vegetable protein to humans, soy has become an object of criticism since its use as a meat substitute would reduce the diet iron content. If PTS fortification with iron is required, it is known that this is simple and feasible. In addition, meat improves nonheme iron absorption. The aim of this work was to identify which iron compound showed greater efficiency in iron repletion in rats fed with fortified diets. The experiment consisted of 4 experimental groups and 2 control groups. The protein source of the first control group was casein (C CAS) and that of the second was PTS and meat (C PTS+BA) without fortification, where the quantity of iron was similar to that of the first control. For the other 5 groups, the protein source was PTS and meat. The PTS was fortified with 0.83mg/g (SF) and 1.66mg/g (SF<sub>2</sub>) of Ferrous Sulfate and with 0.83mg/g (QF) and 1.66mg/g (QF<sub>2</sub>) of Ferrous Bisglycinate Chelate. The 5 groups were fed with their diets after iron depletion until non severe anemia. The hematological and biochemical parameters recommended by NHANES were analyzed. The rats showed average hemoglobin of 15.8±0.73g/dl. The controls showed the same capacity to recover hemoglobin. The conclusion of this work was that PTS + meat (1:1), providing 0,48mg Fe/day is sufficient to recover hemoglobin. Above this amount there was no acceleration in repletion, as observed from the serum iron, TIBC and transferrin saturation results. The success of the association of PTS with meat could have influenced the bioavailability of PTS iron.*

**Index terms:** *iron bioavailability, iron deficiency anemia, fortification, soy protein, animal protein*

## 1. INTRODUÇÃO

A deficiência nutricional de ferro é o maior problema de saúde pública e um problema econômico e educacional, acometendo mais de 2 bilhões de pessoas no mundo sendo que mais da metade podem ser consideradas anêmicas (Stephenson, 1995; Freire, 1997; Benoist, 2001). As maiores prevalências estão entre mulheres grávidas e crianças em idade pré escolar (Ziegler & Fomon, 1996; Stoltzfus, 2001).

O Brasil exporta entre outros produtos derivados, a Proteína Texturizada de Soja (PTS) para países da América Hispânica, o qual é utilizado para várias aplicações e também para compor a dieta oferecida à escolares. Desejando implementar a qualidade do produto exportado, tornou-se oportuno oferecer a PTS fortificada com ferro. Sendo uma fortificação pioneira em PTS ocorreu a necessidade de uma pesquisa quanto ao fortificante a ser incorporado e ensaios *in vivo* para avaliar a eficácia da fortificação.

A revisão bibliográfica sobre fortificações no último decênio esclareceu que os compostos sulfato ferroso e quelato ferroso são muito utilizados em programas de fortificação e suplementação (Pineda et al., 1994; Hurrell et al., 1997; Benito et al., 1997 e 1998; Brunken e Szarfarc, 1999; Jeppsen e Borzelleca, 1999).

Embora a economia do ferro esteja elucidada (Silbernagl & Despopoulos, 1995; Bernard, 1973; Fairweather-Tait, 1995), a questão latente é otimizar a absorção intestinal do ferro contido naturalmente na forma hemínica ou não hemínica dos alimentos.

Devido a crescente possibilidade de oferecer proteínas vegetais para a população humana e animal, a proteína de soja, sua disponibilidade e sua interação com os demais elementos da dieta, requerem investigações. A fortificação de alimento com sal ferroso simples ou quelato está sendo posta em prática em vários alimentos líquidos ou semi-sólidos. (Pineda et al., 1994;

Stephenson, 1995; Hurrell, 1997; Brunken & Szarfarc; 1999; Jeppsen & Borzelleca, 1999).

No presente trabalho investiga-se a biodisponibilidade do ferro proveniente de dietas contendo PTS (fortificadas ou não), assim como a interação do produto fortificado compondo dietas em associação com proteína animal. Especial atenção foi dada à primeira fase do trabalho que consistiu em depletar o ferro corporal de ratos jovens. Para esta fase Benito et al. (1998) foram esclarecedores quanto a técnica de alimentação intermitente. Posteriormente Mikami et al. (2000), trabalhou com depleção de ferro de ratos Wistar jovens e, suas avaliações abalizaram as técnicas e resultados deste trabalho, os quais serão abordados na discussão.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material**

Proteína texturizada de soja fortificada (PTS)<sup>3</sup> (Anexo 2), foi adicionada de carne bovina magra (B) e carne de ave magra (A), constituindo a fonte protéica das dietas elaboradas para o ensaio.

### **2.2. Animais e Manejo**

O ensaio foi realizado com um lote inicial de 70 ratos machos Wistar/Unicamp<sup>4</sup>, recém-desmamados com 21 dias, pesando  $47,32 \pm 6,81\text{g}$  e provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp. Os animais permaneceram alojados durante o ensaio em gaiolas individuais de aço-inox previamente limpas da contaminação de ferro com 3 banhos na ordem: uma imersão em solução de ácido nítrico à 25%, a imersão seguinte em solução de EDTA à 1% e finalmente uma imersão em água deionizada. Os animais foram alojados em temperatura

---

<sup>3</sup> As PTSs não fortificada e as fortificadas com Sulfato Ferroso-heptaidratado e Bisglicinato Quelato Ferroso foram fornecidas por Bunge Alimentos Esteio/RS

<sup>4</sup> Certificados pelo *International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)*

controlada ( $21\pm 1^\circ\text{C}$ ), ciclo claro/escuro de 12h, alimentados diariamente e pesados duas vezes por semana.

Os 70 ratos, pesando  $47,32\pm 6,81\text{g}$ , entraram em alimentação intermitente e pobre em ferro até atingirem hemoglobina de 10g/dl, isto é, o estado de anemia ferropriva não severa. A seguir, iniciou-se a fase de repleção com dietas fortificadas. Estabeleceram-se 6 grupos homogêneos, quanto ao peso e concentração de hemoglobina, dos quais dois eram grupos controle.

### 2.3. Dietas

As Tabelas 1 e 2 apresentam a composição das dietas de DEPLEÇÃO e REPLEÇÃO respectivamente.

**Dieta de Depleção:** sem adição o citrato férrico no mix mineral. Os demais itens seguem a AIN 93 (Reeves et al., 1993).

TABELA 1. Composição da **Dieta de Depleção**, pobre em ferro ( $\cong 15\text{mg/kg}$ )

Ingredientes	g/kg de dieta
Amido de milho	397,5
Caseína	200
Amido de milho dextrinizado	132,0
Sacarose	100,0
Fibras*	50,0
Óleo de soja	70,0
Mix mineral (AIN93G – MX)**	35,0
Mix vitamínico (AIN93G – MX)	10,0
L-cistina	3,0
Bitartarato de colina (41,1% de colina)	2,5
Tertibutilhidroquinona	0,014

\* Celulose microcristalina (ver especificações no Anexo 3)

\*\* Isento de citrato férrico

**Dietas de Repleção:** nesta fase o ensaio foi composto de seis dietas, das quais duas eram controles e quatro eram experimentais. Uma das dietas controle

continha caseína como fonte protéica e objetivou o controle ponderal, já a outra dieta controle continha PTS sem fortificação como fonte protéica parcial da dieta. As dietas experimentais tinham a mesma composição salvo o tipo e a concentração do fortificante adicionado à PTS e estão descritas a seguir:

**Dieta Controle de Repleção, C CAS:** sem adição de ferro

**Dieta Controle de Repleção PTS + Mistura BA, C PTS + BA<sup>5</sup>:** sem adição de ferro

**Dieta Experimental de Repleção QF:** adição de 39mg de ferro/kg de dieta sob forma de Bisglicinato Quelato Ferroso.

**Dieta Experimental de Repleção QF<sub>2</sub>:** adição de 78mg de ferro/kg de dieta sob forma de Bisglicinato Quelato Ferroso.

**Dieta Experimental de Repleção SF:** adição de 39mg de ferro/kg de dieta sob forma de Sulfato Ferroso-heptaidratado.

**Dieta Experimental de Repleção SF<sub>2</sub>:** adição de 78mg de ferro/kg de dieta sob forma de Sulfato Ferroso-heptaidratado.

Todos os utensílios foram previa e periodicamente higienizados e passados em soluções de ácido nítrico à 25%, EDTA à 1% e água deionizada.

O PTS foi hidratado em água deionizada sob a relação de 4:1 (g/g) e levado à cocção juntamente com as carnes durante 30 minutos. Todas as dietas foram congeladas de forma que porções suficientes eram retiradas a cada 7 dias e conservadas sob refrigeração até o momento de oferta aos animais.

---

<sup>5</sup> BA: mistura contendo carne bovina e carne de ave magra na proporção 4:1.

TABELA 2. Composição das **Diets de Repleção Experimentais e Controle** confeccionadas com PTS + Mistura BA

Ingredientes	C CAS	C PTS + BA	QF	QF <sub>2</sub>	SF	SF <sub>2</sub>
Caseína (g/kg)	200					
PTS (g/kg)	-	235	235	235	235	235
Carne bovina magra (g/kg)	-	200	200	200	200	200
Carne de ave magra (g/kg)	-	50	50	50	50	50
Amido de milho (g/kg)	397,5	412,5	412,5	412,5	412,5	412,5
Amido de milho dextrinizado (g/kg)	132	-	-	-	-	-
Sacarose (g/kg)	100	-	-	-	-	-
Fibra (g/kg)	50	50	50	50	50	50
Óleo de soja (g/kg)	70	15	15	15	15	15
Mix mineral (g/kg)	35	30*	30*	30*	30*	30*
Mix vitamínico (g/kg)	10	5	5	5	5	5
L-cistina (g/kg)	3	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Tertibutilhidroquinona (g/kg)	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014
Fortificação com ferro (mg/kg)	-	-	39 <sup>1</sup>	78 <sup>1</sup>	39 <sup>2</sup>	78 <sup>2</sup>

\* Isento de citrato férrico

<sup>1</sup> Bisglicinato Quelato Ferroso

<sup>2</sup> Sulfato Ferroso-heptaidratado

## 2.4. Determinações Químicas

Umidade e sólidos totais, cinzas e proteína total foram determinados conforme métodos 930.15, 942.05 e 954.01 respectivamente, descritos pela AOAC (1997). Lipídeo total foi determinado segundo Bligh & Dyer (1959). Carboidratos totais foram determinados por diferença. O ferro foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica de acordo com método 968.08 descrito pela AOAC (1995).

## 2.5. Alimentação Intermitente

A fase de depleção e a fase de repleção foram executadas conforme Benito et al. (1997 e 1998). Todos os animais recebiam duas refeições ao dia em intervalos de 10h. Os animais foram treinados para comerem uma pré-refeição,

contendo 0,5 g de sacarose e 0,5 g de sua respectiva dieta durante 15 minutos. Para os animais que consumiram a pré-refeição, era oferecida imediatamente sua respectiva dieta durante 1 hora. Aos animais que não consumiram a pré-refeição era negada a refeição, portanto iriam se alimentar apenas 10h ou 14h depois, sob o mesmo procedimento. Após o terceiro dia todos estavam consumindo a pré-refeição em 15 minutos.

## 2.6. Fase de Depleção

Setenta ratos receberam dieta AIN93G formulada segundo Reeves et al. (1993). O mix mineral era completo, com exceção da adição do citrato férrico. A composição da AIN93G, apresentada na Tabela 1, continha apenas o ferro da caseína, que proporcionava apenas 0,015mg de ferro por dia; o ensaio teve início sob esta dieta para induzir a depleção de ferro. Foi utilizada a técnica de “alimentação intermitente”, descrita no item 2.5.

A depleção de ferro foi avaliada uma vez por semana com o sangue retirado da veia caudal e medido pela formação de cianometemoglobina (Carvalho, 1999).

## 2.7. Fase de Repleção

Foi realizada com 42 ratos anêmicos cuja hemoglobina atingira  $10,42 \pm 0,17$ g/dl de sangue, os quais foram divididos em 6 grupos contendo 7 ratos por grupo e alimentados com as dietas descritas no item 2.3.

Os grupos foram divididos considerando os valores de concentração de hemoglobina e peso, utilizando o programa Excel do pacote MS Office para homogeneizar os grupos.

A recuperação da anemia foi avaliada semanalmente por análise de sangue da veia caudal de 4 animais de cada grupo conforme se procedeu na fase de depleção. Durante a repleção foi realizada a contagem de reticulócitos, em esfregaços sanguíneos corados com azul de cresil brilhante (Carvalho, 1999).

## 2.8. Determinação dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos

Ao término do ensaio, todos os animais foram sacrificados através de anestesia previa e exsanguinação. Uma parte do sangue foi coletado em tubo à vácuo contendo EDTA e destinado à análise dos parâmetros hematológicos. Outra parte, destinada a obtenção do soro, foi coletada em tubo à vácuo sem anticoagulante, centrifugado por 15 minutos/3000 rpm e armazenado sob congelamento até a análise dos parâmetros bioquímicos.

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos escolhidos para a avaliação do *status* de ferro foram aqueles preconizados pelo *National Health and Nutrition Examination Survey, USA* (Looker et al., 1995) utilizados para a avaliação do *status* de ferro em populações (Tabela 3).

Foi efetuado, segundo Schricker et al., (1983), o cálculo de Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (%HRE), cuja Expressão 1 está apresentada a seguir:

Expressão 1:

$$\%HRE = (mg \text{ final HbFe} - mg \text{ inicial HbFe}) / (mg \text{ Fe consumido}) \times 100$$

A quantidade de ferro da Hb (mg HbFe) foi determinada através da Expressão 2, a qual considera que o sangue representa 6,7% do peso corporal e que a hemoglobina contem 3,35mg de ferro por grama.

Expressão 2:

$$\text{mg HbFe} = (\text{Peso} \times 6,7 \text{ ml sangue} / 100 \text{ g peso}) \times (\text{g Hb} / 100 \text{ ml sangue}) \times (3,35 \text{ mg Fe} / \text{g Hb})$$

Tabela 3. Parâmetros hematológicos recomendados pelo **NHANES**: técnicas de determinação no presente trabalho

Parâmetros	Técnicas
Hemoglobina - Hb	automação <sup>1</sup>
Volume Corpuscular Médio - VCM	idem
Hemoglobina Corpuscular Média - HCM	Idem
Concentração Hb Corpuscular Média - CHCM	Idem
Contagem de Células Vermelhas - RBC	
Ferro Sérico	Colorimetria <sup>2</sup>
Capacidade Total de Ligação de Ferro	Idem
Saturação da Transferrina	Calculada

<sup>1</sup> CD1700 SPECIMEN DATA REPORT

<sup>2</sup> Reação de óxido-redução

Todos os parâmetros foram comparados através de teste de variância ANOVA (teste de Tukey) com nível de significância  $p < 0,05$ . O *software* utilizado para a análise foi o *SAS-Statistical Analysis System*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou uma repleção de ferro com auxílio de fortificação. Mikami et al. (2000) demonstraram fatos esclarecedores sobre depleção e repleção de ferro em ratos wistar jovens. Para os autores, uma depleção acarreta pronta estimulação de absorção de ferro proveniente do lume intestinal, assim como, a transferência de ferro quase concomitante para o sangue. Ao continuar o processo de depleção, não há maior estimulação para estes parâmetros que permanece no mesmo patamar, podendo constituir um mecanismo para prevenir sobrecarga de ferro pela via absorção intestinal.

A primeira fase do ensaio, a FASE de DEPLEÇÃO, com o objetivo de induzir uma depleção de ferro que resultasse em hemoglobina em torno de 10g/dl, exigiu 28 dias. A segunda fase, a FASE de REPLEÇÃO, quando foram oferecidas as dietas fortificadas com ferro, com o objetivo de atingir hemoglobina de 15g/dl, exigiu 25 dias.

### **3.1. Fase de Depleção**

Os ratos pesavam ao início da fase de depleção  $47,32 \pm 6,81\text{g}$  e finalizaram-na com  $185,64 \pm 8,51\text{g}$ , portanto, durante os 28 dias de depleção a elevação ponderal foi 4 vezes maior em relação ao peso inicial. A alimentação intermitente acelerou a depleção de ferro em relação a ensaios anteriores ocorridos neste laboratório (Cabral, 1990; Simões, 1996). Ao final do período escolheram-se 42 ratos, cuja média de hemoglobina era  $10,43 \pm 0,18\text{g/dl}$ . Neste trabalho considerou-se como aceitável uma anemia de 1/3 em relação à normalidade, por analogia a anemia ferropriva não grave de crianças em idade escolar (Brunken e Szarfarc, 1999).

### **3.2. Fase de Repleção**

Para os seis grupos de ratos depletados de ferro (7 ratos/grupo), a repleção terminou com valores médios de hemoglobina semelhantes entre si, não diferindo significativamente. As amostras periódicas de sangue, tomadas a cada cinco dias, demonstraram elevação de hemoglobina e valor de reticulócitos, acima de 8%. Tanto a quantidade de Hb como o número de reticulócitos não apresentavam relação com as dietas mas apenas com os dias de repleção, isto é, aumentava o valor de Hb e decrescia o percentual de reticulócitos.

#### **3.2.1. Evolução Ponderal e Aporte de Energia e Ferro**

A fase de repleção estendeu-se por 25 dias, quando os animais na média atingiram  $\leq 1\%$  de reticulócitos no sangue e valores normais de hemoglobina, ou seja,  $15,84 \pm 0,74\text{g}$  de Hb/dl de sangue e  $79,88 \pm 18,59\text{g}$  de ganho ponderal.

Na Tabela 4 estão apresentadas as diferenças quanto ao consumo de dieta e por consequência do aporte de ferro. Da mesma forma, como ocorreu na depleção, o ganho ponderal não está, em ratos, relacionado com a quantidade ingerida de ferro. Assim, para os grupos QF<sub>2</sub> e SF<sub>2</sub> o consumo de ferro foi, em média, 5 vezes maior no período em relação à C CAS (controle) e no entanto, os três grupos apresentaram ganho ponderal muito próximo (Gráfico 2).

Uma ressalva é feita em relação ao grupo QF<sub>2</sub>, que embora apresentasse ganho ponderal análogo aos demais grupos, o desvio de média foi três vezes menor e por consequência, no Gráfico 1 ele demonstra desempenho um pouco acima dos demais grupos.

TABELA 4. Consumo médio de dieta e ferro e, ganho ponderal dos grupos experimentais e controles durante o período de repleção

Grupos	Consumo de Dieta (g/dia)	Aporte de Energia (kcal/dia)	Aporte de Ferro (mg/dia)	Ganho Ponderal (g)
QF	$22,80 \pm 4,17^{ab}$	$68,42 \pm 18,17^{ab}$	$1,42 \pm 0,43^b$	$68,63 \pm 19,19^a$
QF <sub>2</sub>	$19,82 \pm 2,22^{ab}$	$59,48 \pm 3,64^{ab}$	$2,20 \pm 0,13^a$	$79,54 \pm 6,69^a$
SF	$20,94 \pm 1,21^a$	$62,84 \pm 6,65^a$	$1,48 \pm 0,16^b$	$75,71 \pm 33,05^a$
SF <sub>2</sub>	$21,04 \pm 6,05^a$	$63,14 \pm 12,52^a$	$2,34 \pm 0,46^a$	$79,01 \pm 19,98^a$
C CAS	$15,15 \pm 1,89^{bc}$	$45,46 \pm 5,66^b$	$0,45 \pm 0,06^c$	$78,39 \pm 21,87^a$
C PTS+BA	$13,20 \pm 1,72^c$	$49,71 \pm 6,46^{ab}$	$0,48 \pm 0,06^c$	$98,02 \pm 29,40^a$

Valores: médias  $\pm$  desvio padrão.

Letras verticalmente iguais não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

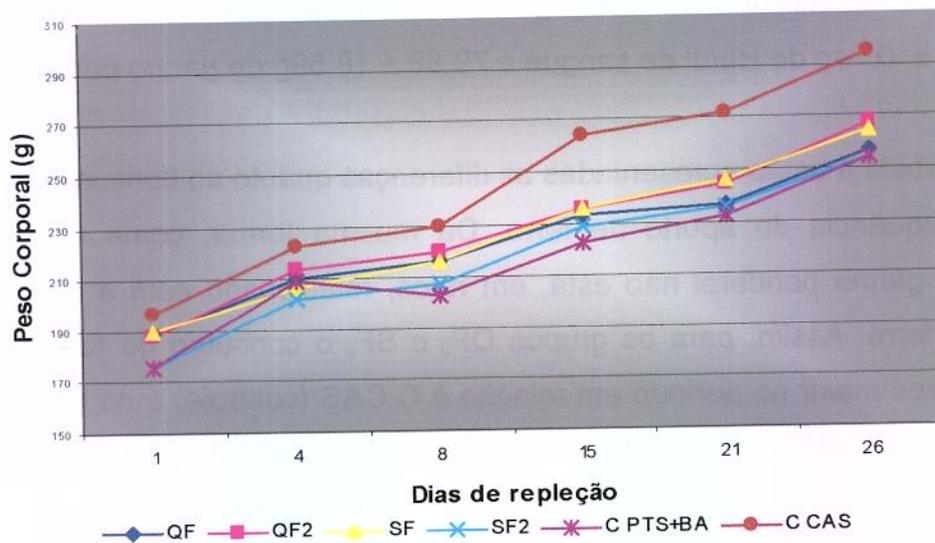


GRÁFICO 1. Curva de ganho ponderal dos grupos experimentais e controles durante a fase de repleção

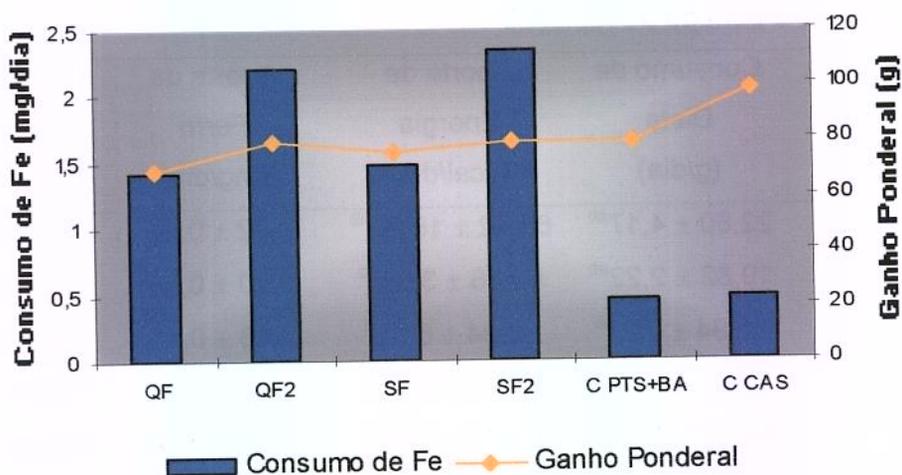


GRÁFICO 2. Consumo de ferro e ganho ponderal dos grupos experimentais e controles durante a fase de repleção

### 3.2.2. Regeneração da Hemoglobina

Durante o transcorrer da fase de repleção, as análises parciais de Hb e reticulócitos efetuadas em dois animais de cada grupo demonstraram evolução positiva quanto a repleção, porém sem vinculação com a quantidade de ferro das dietas.

No Gráfico 3 observa-se que os seis grupos que iniciaram a repleção de ferro com hemoglobina de 10g/dl, apresentaram valores normais de hemoglobina após o 25º dia de repleção. A Tabela 5 apresenta as oscilações dos valores de Hb final, entretanto, sem significância estatística.

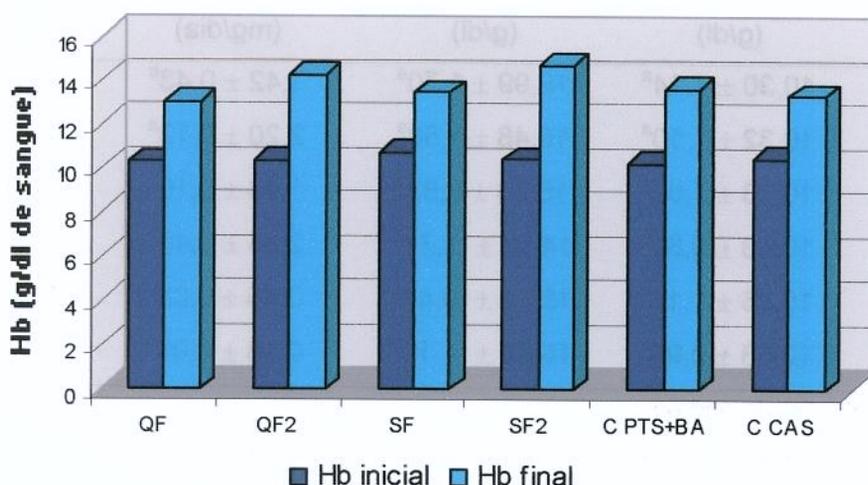


GRÁFICO 3. Valores de hemoglobina no início e no final da fase de repleção dos grupos experimentais e controles

O cálculo percentual da Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (Tabela 5) demonstra que a eficiência máxima de utilização de ferro ocorreu nos dois grupos controles. Para atingir o mesmo patamar de recuperação de hemoglobina, a ingestão de ferro de 0,46mg/dia foi suficiente. Portanto, a eficiência tende a diminuir à medida que o aumento da concentração de ferro, na dieta sobrepassar a quantidade fornecida pela dieta AIN93G (45mg/kg de dieta).

Conclui-se que o ferro proveniente da PTS sem fortificação associada à proteína animal (Mistura BA) alcançou a mesma absorção que o ferro proveniente do mix mineral da AIN93G. Vale ressaltar que a dieta controle, C PTS + BA, continha 50% de proteína animal o que contribuiu para o aumento da biodisponibilidade do ferro presente naturalmente na PTS.

TABELA 5. Valores iniciais e finais de hemoglobina e Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (HRE) dos grupos experimentais e controles

Grupos	Hb Inicial (g/dl)	Hb Final (g/dl)	Consumo de Ferro (mg/dia)	HRE (%)
QF	10,30 ± 1,14 <sup>a</sup>	16,99 ± 1,70 <sup>a</sup>	1,42 ± 0,43 <sup>b</sup>	17,21 ± 8,36 <sup>b</sup>
QF <sub>2</sub>	10,32 ± 1,10 <sup>a</sup>	15,48 ± 1,58 <sup>a</sup>	2,20 ± 0,13 <sup>a</sup>	8,89 ± 8,89 <sup>bc</sup>
SF	10,73 ± 1,09 <sup>a</sup>	16,33 ± 0,83 <sup>a</sup>	1,48 ± 0,16 <sup>b</sup>	13,92 ± 3,08 <sup>bc</sup>
SF <sub>2</sub>	10,43 ± 0,87 <sup>a</sup>	14,97 ± 2,71 <sup>a</sup>	2,34 ± 0,46 <sup>a</sup>	7,63 ± 2,38 <sup>c</sup>
C CAS	10,26 ± 1,13 <sup>a</sup>	15,69 ± 0,44 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,06 <sup>c</sup>	43,54 ± 8,42 <sup>a</sup>
C PTS+BA	10,53 ± 0,93 <sup>a</sup>	15,34 ± 1,11 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,06 <sup>c</sup>	46,01 ± 6,98 <sup>a</sup>

Valores: médias ± desvio padrão.

Letras verticalmente iguais não apresentam diferença significativa (p<0,05).

Dentre os estimuladores de absorção do ferro não heme algumas proteínas de origem animal, especialmente de carnes foram estudadas (Campen, 1983). Em trabalho realizado com ratos Thannoun et al. (1987) encontraram ação estimuladora com mistura de proteína de soja e proteína animal. Já com humanos, Garcia et al. (1996) demonstraram a mesma ação estimuladora ao adicionar proteína animal à dieta. South et al. (2000), utilizando porcos como modelo

experimental, demonstraram a maior absorção de ferro não heme quando adicionaram proteína animal à dieta.

Continuando a análise da Eficiência de Regeneração de Hemoglobina nos grupos experimentais, pode-se observar que não houve diferença de biodisponibilidade entre o Sulfato Ferroso e o Quelato Ferroso nas condições deste experimento, embora haja estudos demonstrando ser 4 vezes maior a biodisponibilidade do ferro sob a forma de quelato (Pineda et al., 1994; Olivares et al., 1997; Iost et al., 1998; Jeppsen e Borzelleca, 1999).

Ocorre outra dificuldade de comparação entre o presente trabalho com os citados acima porque foram realizados (maioria deles) com humanos e em alguns o fortificante foi testado isoladamente, ou seja, não adicionado a nenhum alimento e sim como cápsulas medicamentosas.

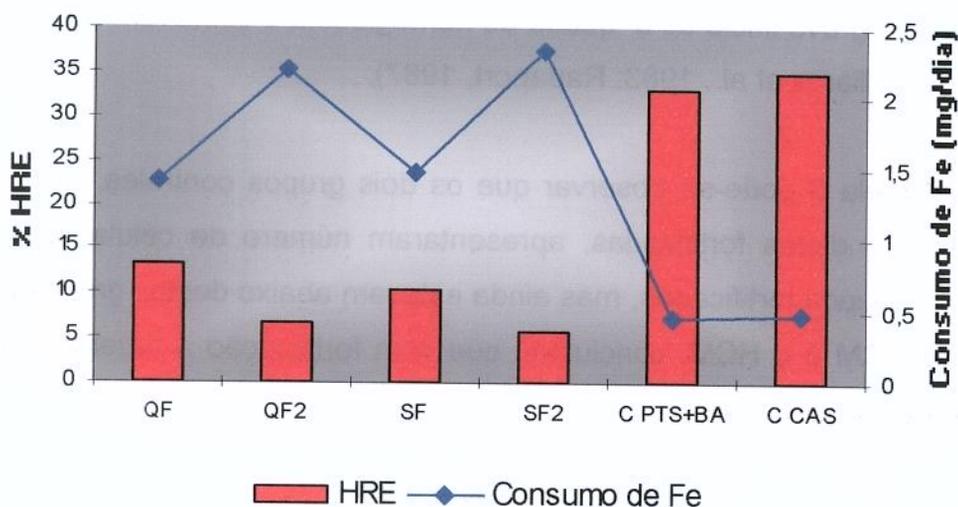


GRÁFICO 4. Consumo de ferro e porcentagem Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (% HRE) dos grupos experimentais e controles após fase de repleção

É importante afirmar que a medida da Eficiência da Regeneração de Hemoglobina sempre será uma avaliação distorcida para trabalhos de **fortificação**, porque, sendo %HRE expressa pela fórmula:

$$\%HRE = (mg \text{ final HbFe} - mg \text{ inicial HbFe}) / (mg \text{ Fe consumido}) \times 100,$$

o ferro do denominador, aumentado em ensaios de fortificação, normalmente causará avaliação menor para as dietas fortificadas com quantidades acima da capacidade de absorção.

### 3.2.3. Situação do Ferro Absorvido e sob Transporte

O processo inicial da anemia por deficiência de ferro é caracterizado pelo esgotamento dos estoques embora as células continuem apresentando-se normocíticas e normocrômicas (e levemente anisocíticas). A medida que a deficiência se agrava inicia-se a queda de hemoglobina e sobrem microcitose e hipocromia (Williams et al., 1983; Rapaport, 1987).

Na Tabela 6 pode-se observar que os dois grupos controles, que mesmo não recebendo dietas fortificadas, apresentaram número de células vermelhas iguais aos 4 grupos fortificados, mas ainda estavam abaixo destes grupos quando se mediu o VCM e o HCM, concluindo que sem fortificação a regeneração total dos ratos é um pouco mais lenta.

Tabela 6. Valores de VCM, HCM, CHCM e RBC dos grupos controles e experimentais após a fase de repleção

Grupos	VCM fl	HCM pg	CHCM g/dl	RBC X10 <sup>6</sup> cells/ $\mu$ l
QF	55,03 $\pm$ 1,68 <sup>a</sup>	23,7 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	43,08 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>	5,91 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>
QF <sub>2</sub>	55,57 $\pm$ 1,70 <sup>s</sup>	22,86 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	41,09 $\pm$ 0,91 <sup>b</sup>	5,90 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>
SF	56,15 $\pm$ 2,13 <sup>a</sup>	22,75 $\pm$ 0,83 <sup>a</sup>	40,55 $\pm$ 0,67 <sup>b</sup>	6,15 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>
SF <sub>2</sub>	56,41 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>	23,16 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	41,04 $\pm$ 1,09 <sup>b</sup>	5,97 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>
C CAS	51,92 $\pm$ 3,24 <sup>b</sup>	21,12 $\pm$ 1,45 <sup>b</sup>	40,67 $\pm$ 0,80 <sup>b</sup>	6,30 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>
C PTS+BA	50,09 $\pm$ 1,02 <sup>b</sup>	20,64 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup>	41,20 $\pm$ 0,66 <sup>b</sup>	6,62 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>

Valores: médias  $\pm$  desvio padrão.

Letras verticalmente iguais não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Ht: Hematócrito; VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RBC: Células Vermelhas.

Tendo os quatro grupos de ratos anêmicos consumido sal de quelato de ferro ou sulfato de ferro em quantidades  $x$  e  $2x$ , respectivamente, e o quelato de ferro supostamente apresentando capacidade de absorção quatro vezes superior àquela do sulfato ferroso, os valores de ferro sérico, TIBC e saturação da transferrina (Tabela 7) foram de certa forma inesperados, quando se demonstraram semelhantes em todos os grupos.

A concentração sérica de ferro e transferrina depende da velocidade com que o ferro entra no plasma a partir dos enterócitos do intestino delgado, assim como, da velocidade com que o ferro é levado a hematopoiese. Também, a concentração do ferro presente no enterócito pode exercer influência sobre os níveis séricos. Uma vez que na deficiência de ferro a concentração de ferro sérico está diminuída e a concentração de transferrina livre está aumentada, conclui-se que a capacidade total de ligação de ferro se torna elevada e a saturação da transferrina reduz significativamente podendo atingir valores abaixo de 15% (Williams et al., 1983; Rapaport, 1987). Segundo Mikami et al. (2000), o ferro sérico é um parâmetro que responde de modo imediato ao início da depleção. Portanto, seria esperado que a leitura de ferro ao final da repleção fosse alta e

homogêneas, visto que este parâmetro é responsivo porém auto-regulado, uma forma, propõe os autores, de impedir a sobrecarga de ferro.

TABELA 7. Parâmetros bioquímicos analisados nos grupos experimentais e controles ao término da Fase de Repleção

Grupos	Fe Sérico ( $\mu$ /dl)	TIBC ( $\mu$ /dl)	Saturação Transferrina (%)
QF	237,40 $\pm$ 49,07 <sup>a</sup>	403,19 $\pm$ 49,24 <sup>a</sup>	51,46 $\pm$ 16,19 <sup>a</sup>
QF <sub>2</sub>	245,12 $\pm$ 41,85 <sup>a</sup>	414,78 $\pm$ 80,88 <sup>a</sup>	60,14 $\pm$ 11,31 <sup>a</sup>
SF	250,71 $\pm$ 57,13 <sup>a</sup>	386,17 $\pm$ 46,54 <sup>a</sup>	66,27 $\pm$ 19,47 <sup>a</sup>
SF <sub>2</sub>	249,19 $\pm$ 72,83 <sup>a</sup>	369,79 $\pm$ 64,82 <sup>a</sup>	68,23 $\pm$ 19,31 <sup>a</sup>
C CAS	195,32 $\pm$ 40,07 <sup>a</sup>	371,07 $\pm$ 48,65 <sup>a</sup>	53,06 $\pm$ 11,01 <sup>a</sup>
C PTS+BA	223,37 $\pm$ 44,69 <sup>a</sup>	406,56 $\pm$ 41,12 <sup>a</sup>	55,64 $\pm$ 13,12 <sup>a</sup>

Valores: médias  $\pm$  desvio padrão.

Letras verticalmente iguais não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

TIBC: Capacidade Total de Ligação de Ferro

Após análise de todos os parâmetros, ficou evidente a eficácia da associação PTS e proteína animal, na recuperação da anemia não severa induzida por depleção alimentar de ferro. A ação estimuladora da absorção do ferro exercida pela proteína animal sobrepôs-se às possíveis diferenças de biodisponibilidade entre o Sulfato Ferroso e o Quelato Ferroso. Portanto, todo e qualquer tipo de fortificação com ferro seria desnecessária para uma refeição que contenha 50% de PTS associado a 50% de proteína animal.

#### 4. CONCLUSÃO

A depleção experimental de ferro em ratos jovens era, em ensaios neste laboratório (Cabral, 1990; Simões, 1998), muito prolongada no tempo. Com a introdução da alimentação intermitente, como mostrado no presente ensaio, os

ratos atingiram concentração de hemoglobina de 10g/dl em menor tempo, isto é, 28 dias, caracterizando uma anemia ferropriva não severa.

A evolução ponderal dos ratos não foi afetada pela implantação da anemia e ocorreu comportamento semelhante durante a fase de repleção, ou seja, as diferentes concentrações de ferro não exerceram influência sobre o ganho de peso durante a fase de crescimento de ratos jovens.

As dietas controle, C CAS e C PTS + BA demonstraram igual capacidade de regeneração da hemoglobina, ou seja, substituindo-se metade da proteína animal por proteína vegetal (PTS) obtem-se recuperação de ferro igual à obtida com ferro contido na caseína e no mix mineral da AIN93G. A proteína animal contida nas dietas, 250mg/kg, obscureceu a provável função da fortificação com o Sulfato Ferroso e o Bisglicinato Quelato Ferroso.

Os resultados da análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos definiram 30mg/kg de dieta como concentração ideal de ferro para a recuperação dos ratos sob anemia ferropriva não severa.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. Edição Patricia Cunnif. 16. ed. Virgínia: AOAC International, 1995. v. 1

AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. Edição Patricia Cunnif. 16. ed. Maryland: AOAC International, 1997. v.2

BENITO, P.; HOUSE, W.; MILLER, D. Comparison of Oral and Intraperitoneal Iron Supplementation in Anemic Rats: a Re-evaluation of the Mucosal Block Theory of Iron Absorption. *British Journal of Nutrition*, 1998; 79: 533 – 540.

BENITO, P.; HOUSE, W.; MILLER, D. Influence of Iron Supplementation Frequency on Absorption Efficiency and Mucosal Ferritin in Anemic Rats. *British Journal of Nutrition*, 1997; 78: 469 – 477.

BENOIST, B. Introduction. *Journal of Nutrition*, 2001; 131: 564S.

BERNARD, J. et al. *Abrégé D'hematologie*. 2. ed. Paris, Masson & Cie, 1973. 231p.

BRUNKEN G. S. e SZARFARC, S. C. Anemia Ferropriva em Pré - Escolares: Consequências, Formas de Controle e Histórico das Políticas Nacionais de Redução da Deficiência. *Cadernos de Nutrição*, 1999; 17: 1 – 19.

CABRAL, M. M. N. Utilização biológica do ferro do feijão “carioca 8 O S.H.” (*Phaseolus vulgaris*, L.), na repleção da hemoglobina de ratos anêmicos. [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 1990.

CAMPEN, V. D. Iron bioavailability techniques: an overview. *Food Thecnology, Outstanding Symposia in Food Science & Technology* 1983; 127-132.

CARVALHO, W. F. *Técnicas Médicas de Hematologia e Imuno-Hematologia*. 7. ed, Coopmed, 1999. 340p.

DESPOPOULOS, A. e SILBERNAGL, S. Sang. In: *ATLAS de Poche de Physiologie*. 4. ed. Paris: Médecine-Sciences Flammarion, 1995. p. 60 - 76.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Iron. *Journal of Nutrition*, 2001; 131: 1383S-1386S. Supplement.

FREIRE, W. B. Strategies of the Pan American Health Organization/World Health Organization for the control of iron deficiency in Latin American. *Nutrition Reviews*, 1997; 55(6):183-188.

- GARCIA, M. N.; MARTINEZ-TORRES, C.; LEETS, I.; TROPPER, E.; RAMIREZ, J.; LAYRISSE, M. Heat treatment on heme iron and iron-containing proteins in meat: iron absorption in humans from diets containing cooked meat fractions. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1996; 7: 49 – 54.
- HURREL, R. F. Preventing iron deficiency through food fortification. *Nutrition Reviews*, 1997; 55(6): 210-222.
- IOST, C.; NAME, J. J.; JEPPSEN, R. B.; ASHMEAD, D. Repleting hemoglobin in iron deficiency anemia in young children through liquid milk fortification with bioavailable iron amino acid chelate. *Journal of the American College of Nutrition*, 1998; 17(2): 187 – 194.
- JEPPSEN R. B. and BORZELLECA, J. F. Safety Evaluation of Ferrous Bisglycinate Chelate. *Food and Chemical Toxicology*, 1999; 37: 723 – 731.
- LOOKER, A. C.; GUNTER, E. W.; JOHNSON, C. L. Methods to assess iron status in various NHANES surveys. *Nutrition Reviews*, 1995; 53(9): 246-254.
- MIKAMI, T.; HISAYASU, S.; IKEDA-MORE, Y.; YOSHINO, Y. Decreased mucosal iron induces an increase in intestinal iron absorption in the early stage of iron-deficiency. *Nutrition Research*, 2000; 20(10).
- MILLER, J. and McNEAL, L. S. Bioavailability of egg yolk measured by hemoglobin regeneration in anemic rats. *Journal of Nutrition*, 1983; 113: 115-123.
- MILLER, J. and NNANNA, I. Bioavailability of iron in cooked egg yolk for maintenance of hemoglobin levels in growing rats. *Journal of Nutrition*, 1983; 113: 1169 – 1175.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*. 4. rev. ed. Washington, D.C., National Academy Press, 1995. p.32.

OLIVARES, M.; PIZARRO, F.; PINEDA, O.; NAME, J. J.; HERTRAMPF, E.; WALTER, T. Milk inhibits and ascorbic acid favors ferrous bis-glycine chelate bioavailability in humans. *Journal of Nutrition*, 1997; 127: 1407-1411.

PINEDA, O.; ASHMEAD, D.; PEREZ, J. M.; LEMUS, C. P. Effectiveness of iron amino acid chelate on the treatment of iron deficiency anemia in adolescents. *Journal of Applied nutrition*, 1994; 46(1 e 2): 2-13.

QUEIROZ, S. S.; TORRES, M. A. A. Anemia carencial ferropriva: aspectos fisiopatológicos e experiência com a utilização do leite fortificado. *Pediatrics Moderna*, 1995; Edição Especial.

RAPAPORT, S. J. Introdução à hematologia. São Paulo: Roca, 1987. 346 p.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, 1993; 123: 1939-1951.

SCHRICKER, B. R.; DENNIS D. M.; DARRELL, V. C.. Effects of iron status and soy protein on iron absorption by rats. *Journal of Nutrition*, 1983; 113: 996-1001.

SIMÕES, M. C. C. Desenvolvimento de um suplemento nutricional rico em ferro hemafínico. [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 1998.

SOUTH, P. K.; LEI, X. and MILLER, D. D. Meat enhances nonheme iron absorption in pigs. *Nutrition Research*, 2000; 20(12): 1749-1759.

STEPHENSON, L. S. Possible new developments in community control of iron-deficiency anemia. *Nutrition Reviews*, 1995; 53(2): 23-30.

STOLTZFUS, R. J. Defining iron-deficiency anemia in public health terms: a time for reflection. *Journal of Nutrition*, 2001; 131: 565S-567S.

STOLTZFUS, R. J. Summary: implications for research and programs. *Journal of Nutrition*, 2001; 131: 697S-701S. Supplement.

THANNOUN, A.M.; MAHONEY, A. W.; HENDRICKS, D. G.; ZHANG, D. Effect of meat-mixtures on bioavailability of total dietary iron for anemic rats. *Cereal Chemistry*, 1987; 64(6): 399-403.

WILLIAM, W. J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A. J.; LICHTMAN, M. A. *Hematology*. 3. ed. US: Mc Graw-Hill Book Company. 1728 p.

ZIEGLER, E. E.; FOMON, S. J. Strategies for the prevention of iron deficiency: iron in infant formulas and baby foods. *Nutrition Reviews*, 1996; 54(11): 348-354.

## ARTIGO II

Artigo apresentado conforme as normas de publicação da Revista de  
Nutrição/*Journal of Nutrition* da Pontifícia Universidade Católica de Campinas –  
Puccamp

## AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DO FERRO NA PROTEÍNA TEXTURIZADA DE SOJA NÃO FORTIFICADA E FORTIFICADA COM SULFATO QUELATO DE FERRO

SANTOS-ZAGO, Lilia Ferreira<sup>1</sup>; TAVARES, Débora de Queiroz<sup>2</sup>

### RESUMO

A deficiência de ferro é um grande problema de saúde pública, acometendo mais de 2 bilhões de pessoas em todo o mundo. Os programas de fortificação de alimentos são ações necessárias para o controle da anemia ferropriva. Os produtos de soja são fontes alimentares que fornecem proteína de boa qualidade, e o Brasil é o segundo produtor mundial de soja, o que representa um estímulo para a pesquisa. Os objetivos do trabalho foram (1) avaliar a biodisponibilidade do ferro contido naturalmente na Proteína Texturizada de Soja (PTS) e (2) avaliar a fortificação com Sulfato Ferroso-heptaidratado e Bisglicinato Quelato Ferroso. Foram formuladas 5 dietas e administradas a ratos Wistar depletados de ferro através de sangria retro-ocular sob dieta com teor reduzido do mineral. A fonte protéica total das dietas foi PTS, a qual foi fortificada com Sulfato Ferroso-heptaidratado nas concentrações 0,60 mg/g (SF) e 1,20 mg/g (SF<sub>2</sub>) e com Bisglicinato Quelato Ferroso nas concentrações 0,60 mg/g (QF) e 1,20 mg/g (QF<sub>2</sub>). O grupo controle foi isento de fortificação. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos analisados foram aqueles recomendados pela NHANES e a análise da utilização do ferro foi feita pelo cálculo da Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (%HRE). Os resultados mostraram que o grupo controle foi capaz de recuperar-se lentamente da anemia em um período de 18 dias, atingindo  $13,17 \pm 0,38$ g/dl como valor médio de hemoglobina. Os grupos que receberam fortificação

<sup>1</sup> Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas. Correspondência para: SANTOS-ZAGO, L.F. E-mail: lzago@fea.unicamp.br

<sup>2</sup> Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. E-mail: debora@fea.unicamp.br

recuperaram-se na metade do tempo (9 dias) e ao final do período apresentaram  $15,03 \pm 0,31$ g/dl como valores médios de hemoglobina. Os grupos que receberam fortificação demonstraram que 0,97mg de Fe/dia é a quantidade ideal para repleção, podendo obter uma repleção de hemoglobina com 0,51mg de Fe/dia, e neste caso, proveniente da PTS. Concluiu-se, neste trabalho, que as diferenças de biodisponibilidade entre o Sulfato Ferroso e o Bisglicinato Quelato Ferroso são pequenas.

**Termos de indexação:** biodisponibilidade de ferro, anemia ferropriva, fortificação, proteína de soja

## ABSTRACT

*Iron deficiency is a big public health problem, which affects 2 billion people around the world. The fortification programs are necessary actions for the control of iron anemia control. Soybean products are a food source providing good quality protein, and since Brazil is the second largest soybean producer in the world, this represents a stimulus for research. The aim of this work was to evaluate: (1) iron bioavailability from texturized soy protein (PTS) and (2) fortification with Ferrous Sulfate and Ferrous Bisglycinate Quelate. Five diets were formulated and fed to 5 groups of rats, iron depleted as a result of removing blood from the retro-ocular capillary bed and feeding on a low iron diet. The protein source of the diets was PTS, which was fortified with 0.60mg/g (SF) and 1.20mg/g (SF<sub>2</sub>) of Ferrous Sulfate and with 0.60mg/g (QF) and 1.20mg/g (QF<sub>2</sub>) of Ferrous Bisglycinate Chelate. The control group was not fortified. The hematological and biochemical parameters recommended by NHANES were analyzed and the iron utilization determined by calculating the hemoglobin regeneration efficiency (HRE). The results showed that the control rats were able to recover in 18 days when they showed average hemoglobin levels of  $13.17 \pm 0.38$ g/dl. The groups that were fed on fortified diets recovered in 9 days, and the average hemoglobin level was  $15.03 \pm 0.31$ g/dl. These groups showed that 0.97mg Fe/day is the ideal quantity for recovering hemoglobin, although the rats also recovered (based on a superficial analysis, only hemoglobin) with 0.51mg Fe/day, which was obtainable from PTS. It was concluded that the bioavailability differences between Ferrous Sulfate and Ferrous Bisglycinate Chelate were insignificant.*

**Index terms:** *iron bioavailability, iron deficiency anemia, fortification, soy protein*

## 1. INTRODUÇÃO

A deficiência nutricional de ferro é o maior problema de saúde pública como também um problema econômico e educacional, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento e acomete mais de 2 bilhões de pessoas no mundo sendo que mais da metade podem ser consideradas anêmicas (Stephenson, 1995; Freire, 1997; Benoist, 2001) e as maiores prevalências estão em mulheres grávidas e crianças em idade pré-escolar (Ziegler & Fomon, 1996; Stoltzfus, 2001).

As estratégias de controle da deficiência de ferro e anemia concentram-se em melhorar os hábitos alimentares da população para garantir o aporte suficiente dos nutrientes responsáveis pelo processo normal da eritropoiese. Dentre essas práticas, os programas de fortificação e suplementação são muito utilizados constituindo uma ferramenta indispensável para o controle de carências nutricionais como a de ferro.

Fatores como intensidade de consumo e viabilidade tecnológica para adição de nutriente devem ser analisados. O veículo não pode ser caro e não deve ter seu preço elevado após o processo de fortificação. Estas premissas foram implementadas porque os principais alimentos utilizados em programas de fortificação são farinhas de trigo, sal, açúcar, arroz, condimentos, amido de milho, cereais processados, leite e derivados (Cook & Reusser, 1983; Mejía, 1994; Hurrell, 1997).

A proteína de soja é um produto que encontrou inserção no mercado de alimentos (Dahiya & Kapoor, 1993; Anderson & Wolf, 1995). A soja tornou-se alvo acirrado de estudos, visto que dentre as oleaginosas, é a melhor fonte protéica para alimentação humana e animal. É limitante em aminoácidos sulfurados, porém, excede quanto aos demais (Liener, 1994).

Com 37 milhões de toneladas de soja no ano 2000/2001, o Brasil superou as expectativas, indo além da produtividade dos Estados Unidos, o maior produtor de soja mundial. A produção aumenta o consumo interno e estimula pesquisas. Na presente década, além da soja ser uma fonte protéica reconhecida, estão sendo atribuídos efeitos antiaterogênicos e anticarcinogênicos às substâncias presentes na soja.

Por ter consumo em expansão e por ser de baixo custo, a proteína texturizada de soja poderia ser o próximo alvo de fortificação. Assim sendo, os objetivos do presente trabalho foram avaliar a biodisponibilidade do ferro contido naturalmente na PTS e ao mesmo tempo avaliar a fortificação com Sulfato Ferroso-heptaidratado e Bisglicinato Quelato Ferroso, bem como, verificar as velocidades de repleção de ferro dos ratos alimentados com as PTSs fortificadas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Proteína Texturizada de Soja PTS<sup>6</sup> foi fortificada com Bisglicinato Quelato Ferroso<sup>7</sup> e Sulfato Ferroso-heptaidratado<sup>8</sup> em duas concentrações respectivamente. A composição da PTS está na Tabela 1.

TABELA 1. Composição da Proteína Texturizada de Soja (PTS)

Análises	Resultados
Umidade (%)	4,52
Proteína (%)	50,18
Lipídio (%)	3,49
Carboidrato (%)	35,66
Cinzas (%)	6,18
Ferro (mg/kg)	83
Sólidos Totais (%)	95,48

<sup>6</sup> Produto fornecido por Bunge Alimentos, Esteio/RS/Brasil

<sup>7</sup> Ferrochel produzido por Albion Laboratories, INC

<sup>8</sup> Código S1057.01.AH: Synth

**2.1. Animais e Manejo:** ratos machos Wistar/Unicamp<sup>9</sup>, com cerca de 45 dias de idade e pesando  $158,12 \pm 16,73$ g em média foram alojados em gaiolas individuais de aço-inoxidável, com temperatura controlada (22°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas. As gaiolas, comedouros e bebedouros foram previamente limpos de contaminação com ferro utilizando-se três soluções na seguinte ordem: solução de Ácido Nítrico à 25%, solução de Sódio Etilenodiaminotetraacetato (EDTA) à 1% e água deionizada. As dietas e água foram oferecidas *ad libitum* e substituídas a cada dois dias. O ganho de peso e o consumo alimentar dos ratos foram obtidos duas vezes por semana.

**2.2. Dieta de Depleção:** efetuada conforme AIN93G (Reeves et al., 1993), sem adição do citrato férrico no mix mineral (Tabela 2).

TABELA 2. Composição da **Dieta de Depleção**, pobre em ferro ( $\cong 15$ ppm)

Ingredientes	g/kg de dieta
Amido de milho	397,5
Caseína ( $\geq 84\%$ de proteína)	200
Amido de milho dextrinizado	132,0
Sacarose	100,0
Fibras*	50,0
Óleo de soja	70,0
Mix mineral (AIN93G – MX)**	35,0
Mix vitamínico (AIN93G – MX)	10,0
L-cistina	3,0
Bitartrato de colina (41,1% de colina)	2,5
Tertibutilhidroquinona	0,014

\* Celulose microcristalina (ver especificações no Anexo 3)

\*\* Isento de citrato férrico

**2.3. Dietas de Repleção:** foi preparada conforme AIN93G (Reeves, et al. 1993), com exceção da fonte protéica (caseína) que foi substituída por PTS, e isenção do

<sup>9</sup> Certificados pelo *International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)*

citrato férrico do mix mineral. As dietas de repleção tinham a mesma composição; o diferencial entre as mesmas era o tipo e a concentração de fortificante adicionado ao PTS.

Para as dietas de repleção, contendo o sulfato ferroso e o quelato ferroso, adicionaram-se estes fortificantes ao respectivo PTS e homogeneizou-se durante 20 minutos. A seguir prosseguiu-se a adição dos demais itens.

**2.4. Determinações Químicas:** umidade e sólidos totais, cinzas e proteína total foram determinados conforme métodos 930.15, 942.05 e 954.01 respectivamente, descritos pela AOAC (1997). Lipídeo total foi determinado segundo Bligh & Dyer (1959). Carboidratos totais foram determinados por diferença. O Ferro foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica de acordo com método 968.08 descrito pela AOAC (1995).

## **2.5. Procedimentos Experimentais**

Na Fase de Depleção administrou-se a dieta semi-purificada AIN93G onde o único ferro presente ( $\cong 15\text{ppm}$ ) era o da caseína; após três semanas iniciou-se uma sangria retro-ocular semanal de 2ml. A depleção de ferro foi avaliada uma vez por semana com o sangue da veia caudal e medido pela formação de cianometemoglobina (Carvalho, 1999). Esta fase terminou quando a média de hemoglobina dos ratos atingiu  $6,88 \pm 0,08\text{g/dl}$ .

A Fase de Repleção foi realizada com 40 ratos anêmicos divididos em 5 grupos e sob as respectivas dietas a seguir:

**Grupo Controle (C) de Repleção:** sem fortificação.

**Grupo Experimental QF:** fortificação com Bisglicinato Quelato Ferroso (36mg de ferro/kg de dieta).

**Grupo Experimental QF<sub>2</sub>:** fortificação com Bisglicinato Quelato Ferroso (72mg de ferro/kg de dieta).

**Grupo Experimental SF:** fortificação com Sulfato Ferroso-heptaidratado (36mg de ferro/kg de dieta).

**Grupo Experimental SF<sub>2</sub>:** fortificação com Sulfato Ferroso-heptaidratado (72mg de ferro/kg de dieta).

Os grupos foram homogeneizados quanto aos parâmetros hemoglobina e peso (programa Excel do pacote MS Office).

A recuperação da anemia foi avaliada semanalmente quando retirava-se uma gota de sangue da veia caudal de 4 animais de cada grupo para a determinar a concentração de hemoglobina e contagem de reticulócitos em esfregaços sanguíneos (Carvalho, 1999).

## 2.6. Determinação dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos

Ao término do ensaio, os animais foram anestesiados progressivamente e cerca de 4 ml do sangue foi coletado por punção cardíaca. Parte do sangue foi destinado à análise dos parâmetros hematológicos, e de outra parte foi retirado o soro e destinado a análise dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros hematológicos, bioquímicos e morfológicos estão na Tabela 3. Os oito primeiros são os recomendados pela *National Health and Nutrition Examination Survey, USA* (Looker et al., 1995).

A Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (%HRE), foi calculada (Schricker et al., 1983) para avaliar possível diferença de recuperação da depleção ao empregar sulfato ferroso ou quelato ferroso. A equação está apresentada a seguir:

Expressão 1:

$$\%HRE = (mg \text{ final HbFe} - mg \text{ inicial HbFe}) / (mg \text{ Fe consumido}) \times 100$$

A quantidade de ferro da Hb (mg HbFe) foi determinada através da Expressão 2, a qual considera que o sangue representa 6,7% do peso corporal e que a hemoglobina contém 3,35mg de ferro por grama.

Expressão 2:

$$mg \text{ HbFe} = (\text{Peso} \times 6,7 \text{ ml sangue} / 100 \text{ g peso}) \times (\text{g Hb} / 100 \text{ ml sangue}) \times (3,35 \text{ mg Fe} / \text{g Hb})$$

TABELA 3. Parâmetros hematológicos, bioquímicos e morfológicos utilizados para avaliação da recuperação da depleção de ferro

Parâmetros Hematológicos <sup>1</sup>	Parâmetros Morfológicos <sup>1</sup>	Parâmetros Bioquímicos <sup>2</sup>
RBC/Hb	Macrocitose e Microcitose	Ferro Sérico
VCM/HCM/CHCM	Hipercromia e Hipocromia	TIBC
CH	Variação de Hb e Anisocitose	Saturação da Transferrina
CHDW/HDW/RDW	Blastos e Atipias	

<sup>1</sup> ADVIA 120 Multi-Species Software

<sup>2</sup> Reação de óxido-redução

RBC: número de eritrócitos; Hb: hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; CH: concentração de hemoglobina corpuscular; CHDW: amplitude da distribuição da concentração de hemoglobina; HDW: amplitude da distribuição da quantidade de hemoglobina; RDW: amplitude da distribuição de eritrócitos.

TIBC: capacidade total de ligação de ferro.

## 2.7. Determinação da Absorção Aparente

As fezes dos animais foram coletadas durante o período de repleção e a quantidade de ferro foi determinada conforme método 968.08 descrito pela AOAC (1995). A absorção aparente (AA) foi calculada segundo a equação a seguir:

$$AA\% = [(Fe \text{ ingerido} - Fe \text{ fecal}) / Fe \text{ ingerido}] \times 100$$

Todos os parâmetros foram comparados através de teste de variância ANOVA (teste de Tukey) com nível de significância  $p < 0,05$ . O software utilizado para a análise foi o *SAS-Statistical Analysis System*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Composição das Dietas

As dietas seguiram os requerimentos para ratos (Reeves et al., 1993; National Research Council, 1995). A dieta controle continha PTS não fortificada, portanto, avaliava a biodisponibilidade do ferro contido naturalmente na PTS. Nas outras quatro dietas avaliou-se a biodisponibilidade do ferro proveniente da PTS somado ao ferro proveniente dos fortificantes.

A Tabela 4 apresenta os valores de energia, proteína, lipídio, carboidratos, umidade e cinzas semelhantes nas dietas de depleção e repleção. A dieta de depleção foi elaborada com teor protéico de 11,25%, oriundo da caseína; a compensação ponderal desta dieta, efetuada com carboidrato, apenas elevou (6%) o valor calórico em relação as demais dietas.

TABELA 4. Composição centesimal média das dietas de adaptação, depleção e repleção

Dietas	Energia Kcal/100g	Sólidos Totais		Proteína %	Lipídio %	Carboidrato %	Cinzas %
		%	%				
Depleção	398,24	93,17	6,83	11,25	6,88	72,83	2,21
C	374,71	91,20	8,80	17,51	5,51	63,77	4,41
SF	372,61	91,47	8,53	16,65	4,85	65,59	4,38
SF <sub>2</sub>	375,04	91,40	8,60	17,19	5,24	64,78	4,19
QF	376,05	91,55	8,45	16,59	5,45	65,16	4,35
QF <sub>2</sub>	374,63	91,17	8,83	17,28	5,31	64,43	4,14

A Tabela 5 apresenta a composição aminoacídica da dieta de repleção: o teor protéico cerca (17%) desta dieta demonstra perfil aminoacídico adequado (NRC, 1995), porém, necessidade de suplementação de cistina (3g/kg de dieta).

TABELA 5. Composição de aminoácidos (mg/kg de dieta) da dieta de repleção; fonte protéica: PTS; teor protéico médio: 17,04%

Alanina	9,12	Fenilalanina	7,56
Arginina	10,86	Prolina	10,41
Ácido aspártico	15,21	Serina	7,08
Cistina	1,77	Treonina	3,21
Ácido glutâmico	26,94	Triptofano	2,16
Glicina	8,34	Tirosina	5,46
Histidina	4,23	Valina	8,28
Isoleucina	5,97	Metionina	1,59
Leucina	9,66	Lisina	8,55

As concentrações de ferro nas dietas depleção e repleção (experimentais e controle) estão apresentadas na Tabela 6. Os valores justificam o período prolongado de depleção (46 dias), e demonstram um gradiente de concentração de ferro adequado entre as dietas.

TABELA 6. Concentração de ferro determinado nas dietas de depleção e repleção (experimentais e controle)

Dietas	Ferro determinado (mg/kg)
Depleção	15 *
Repleção	
C	36 **
SF	70
SF <sub>2</sub>	120
QF	80
QF <sub>2</sub>	120

\* Ferro oriundo da Caseína.

\*\* Ferro oriundo da PTS

### 3.2. Fase de Depleção

Um lote de 50 ratos recebeu dieta pobre em ferro (15ppm) *ad libitum*. Os ratos iniciaram esta fase com valores médios de peso e hemoglobina de  $158,12 \pm 16,73\text{g}$  e  $13,24 \pm 0,72\text{g/dl}$  de sangue respectivamente. Após 21 dias, quando a hemoglobina média dos animais estabilizou-se em  $11,11 \pm 1,02\text{g/dl}$ , iniciou-se um processo de sangria retro-ocular (2ml/semana). Ao 46º dia o valor médio de hemoglobina foi  $6,88 \pm 0,78\text{g/dl}$ , encerrando-se a fase de depleção.

Durante os 46 dias da fase de depleção não foi afetado o crescimento ponderal pela implantação da anemia (Gráficos 1). O peso médio dos ratos após a depleção,  $276,11 \pm 31,25\text{g}$ , era normal para a idade (Jong, 1996; Teixeira, 1998; Freitas, 2001).



GRÁFICO 1. Curva de ganho ponderal dos ratos durante a fase de depleção em ferro.

### 3.3. Fase de Repleção

Foram necessários apenas 18 dias para que os ratos atingissem valor médio de hemoglobina de  $14,7 \pm 0,65$ g/dl.

O consumo alimentar e o ganho de peso dos grupos experimentais e o grupo controle foram análogos, demonstrando que as fortificações não influenciaram a evolução ponderal (Tabela 7). Os autores (2002) já verificaram que os ratos jovens, mesmo com deficiência de ferro crescem adequadamente, pelo menos até 90 dias de idades.

Notar que 0,7mg de Fe/dia é a recomendação para ratos (National Research....., 1995). A PTS no grupo controle forneceu 0,51mg/dia o que elevou a hemoglobina à  $13,17 \pm 0,38$ g/dl ao término do ensaio (Tabela 8), demonstrando boa disponibilidade do ferro proveniente da PTS não fortificada.

TABELA 7. Consumo alimentar, consumo de ferro e ganho de peso dos grupos experimentais e do grupo controle durante a fase de repleção

Grupos	Consumo Alimentar (g/dia)	Consumo de Ferro (mg/dia)	Ganho de Peso (g)
C	$14,27 \pm 0,79^a$	$0,51 \pm 0,03^d$	$42,72 \pm 5,95^a$
SF	$13,88 \pm 1,44^a$	$0,97 \pm 0,10^c$	$39,31 \pm 12,25^a$
SF <sub>2</sub>	$13,82 \pm 1,10^a$	$1,65 \pm 0,13^a$	$42,44 \pm 5,12^a$
QF	$14,22 \pm 1,23^a$	$1,14 \pm 0,10^b$	$41,77 \pm 8,94^a$
QF <sub>2</sub>	$14,88 \pm 0,66^a$	$1,79 \pm 0,08^a$	$41,84 \pm 7,54^a$

Valores: médias  $\pm$  desvio padrão.

Letras verticalmente iguais não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

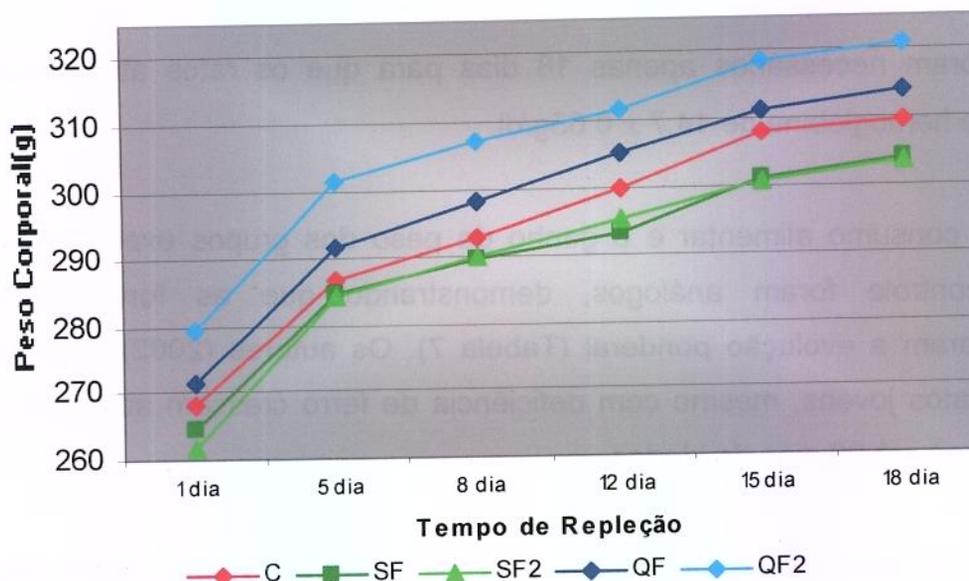


GRÁFICO 2. Curva de ganho ponderal dos grupos experimentais e do grupo controle (C) durante a fase de repleção

TABELA 8. Concentração inicial e final de hemoglobina dos grupos experimentais e do grupo controle durante os 18 dias da fase de repleção

Grupos	Hemoglobina (g/dl)	
	Inicial	Final
C	6,78 ± 0,81 <sup>a</sup>	13,17 ± 0,38 <sup>b</sup>
SF	6,84 ± 0,82 <sup>a</sup>	15,16 ± 0,55 <sup>a</sup>
SF <sub>2</sub>	6,72 ± 0,88 <sup>a</sup>	15,43 ± 0,79 <sup>a</sup>
QF	6,96 ± 0,86 <sup>a</sup>	14,73 ± 0,88 <sup>a</sup>
QF <sub>2</sub>	6,89 ± 0,83 <sup>a</sup>	14,80 ± 0,52 <sup>a</sup>

Valores: médias ± desvio padrão.

Letras verticalmente iguais não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

A recuperação hemoglobínica dos ratos foi concomitante, como demonstra o Gráfico 3, sendo mais lenta para o grupo não fortificado (C). A recuperação foi avaliada também pelo número de reticulócitos (Gráfico 4). A reposição de

hemoglobina e a queda de reticulócitos apresentaram velocidades aceleradas de recuperação sobretudo para os grupos SF<sub>2</sub> e QF<sub>2</sub>, já que ao 8<sup>o</sup> estavam praticamente recuperados. Entre o oitavo e décimo primeiro dia ocorreu discreta estabilização, retomando o crescimento com menor aceleração em relação ao início da repleção. Estes resultados demonstram a relação inversa entre a concentração de Hb e grau de absorção de ferro encontrada também por Schricker et al., 1983. O grupo controle (C), apresentou também nos primeiros 6 dias de tratamento o importante aumento na concentração de hemoglobina e manteve-se estável até o décimo quarto dia, onde observa-se outro aumento de Hb, embora estivesse significativamente inferior aos demais grupos ao final do ensaio. O ferro proveniente da PTS do grupo controle foi biodisponível para a síntese de hemoglobina, porém, não suficiente para atingir os mesmos valores dos grupos fortificados. O gráfico dos reticulócitos, Gráfico 4, apresentou a esperada diminuição do número de células nos primeiros 8 dias de tratamento relacionando-se com o aumento da concentração de hemoglobina.

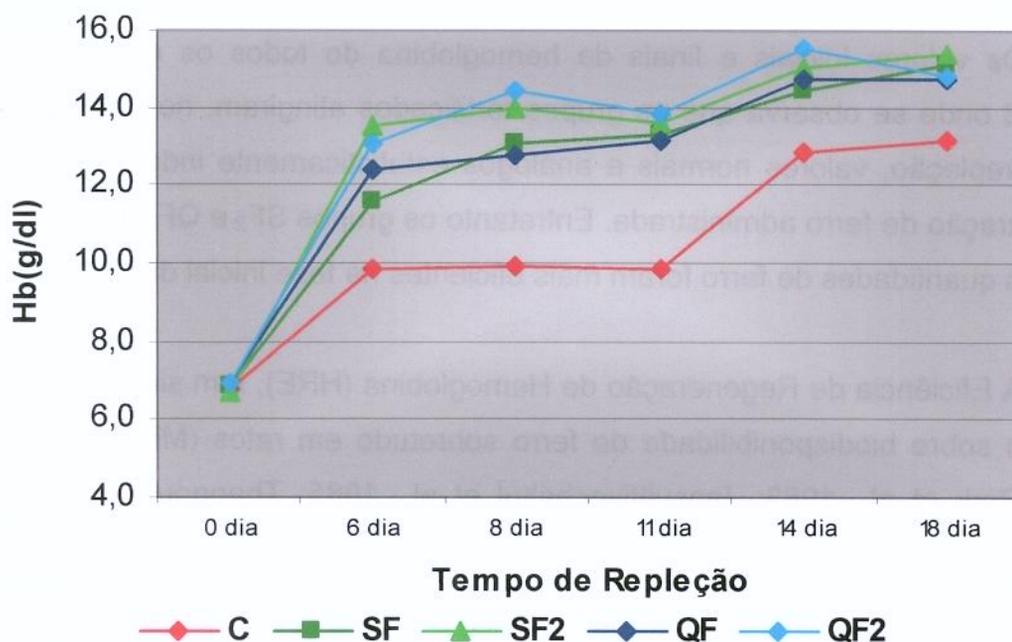


GRÁFICO 3. Concentração de Hb dos grupos experimentais e do grupo controle durante a repleção: os valores de Hb no período entre 6<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> foram tomados de 3 ratos/grupo apenas.

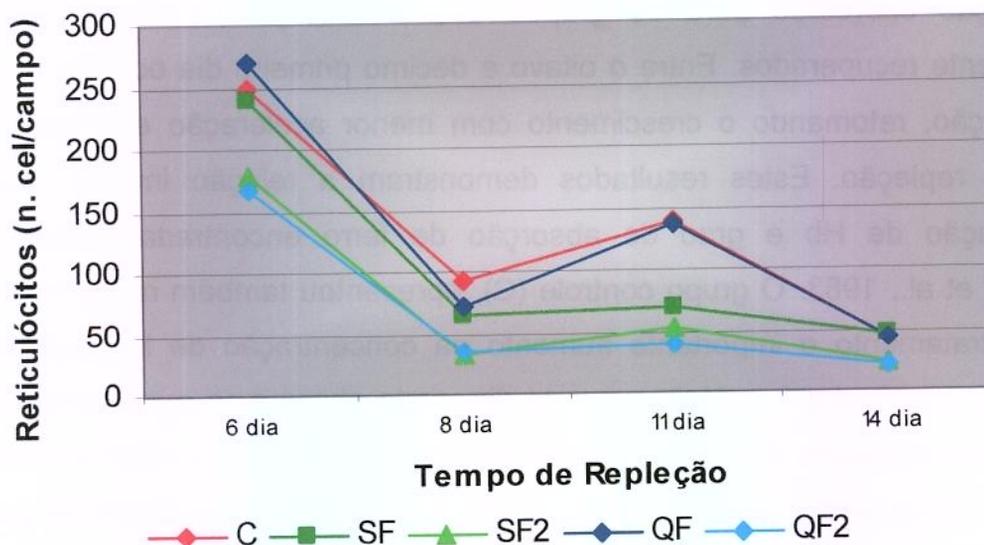


GRÁFICO 4. Quantidade de reticulócitos nos grupos experimentais e no grupo controle durante a fase de repleção

Os valores iniciais e finais de hemoglobina de todos os ratos estão na tabela 8 onde se observa que os grupos fortificados atingiram, no décimo oitavo dia de repleção, valores normais e análogos estatisticamente independentes da concentração de ferro administrada. Entretanto os grupos SF<sub>2</sub> e QF<sub>2</sub>, ou seja, com maiores quantidades de ferro foram mais eficientes na fase inicial da recuperação.

A Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (HRE), tem sido utilizada em estudos sobre biodisponibilidade de ferro sobretudo em ratos (Miller & Nnanna, 1983; Park et al., 1983; Jansuittivechakul et al., 1985; Thannoun et al., 1987; Zhang et al., 1985 e 1989; Simões, 1998; Miranda, 1999). Os mencionados trabalhos estudaram fontes de ferro alimentar e comparam a Eficiência de Regeneração (HRE) com outras fontes conhecidas e, sobretudo com o Sulfato Ferroso.

A HRE % é uma relação percentual entre o ganho de hemoglobina e ganho ponderal sobre o consumo de ferro durante um período de tempo (vide item 2.6). No presente trabalho são comparáveis as dietas SF e QF, devido às concentrações de ferro semelhantes, e pela mesma razão são comparáveis as dietas SF<sub>2</sub> e QF<sub>2</sub>. Tabela 9 demonstra HRE % semelhante para SF e QF, assim como para as dietas SF<sub>2</sub> e QF<sub>2</sub>. A eficiência de recuperação de hemoglobina foi menor para SF<sub>2</sub> e QF<sub>2</sub>, demonstrando que 72mg de Fe/kg de dieta é excessiva. A dieta controle com 36mg de Fe/kg de dieta tem a melhor HRE. Outros parâmetros demonstrarão (item 3.4) déficits hematológicos dentro deste grupo. Portanto, a HRE tem real valor apenas na fase inicial quando a elevação de hemoglobina está acelerada. Esta fase que, neste ensaio, durou 8 dias depende de fato mais da capacidade de absorção e transporte de Fe pelo rato do que propriamente da fonte de ferro.

TABELA 9. Consumo de ferro, ganho de hemoglobina e Eficiência de Regeneração de Hemoglobina (HRE) dos grupos experimentais e do grupo controle na fase de repleção

Grupos	Consumo de Ferro (mg)	Ganho de Hb (g/dl)	HRE (%)
C	9,26 ± 3,31 <sup>d</sup>	6,43 ± 1,03 <sup>b</sup>	55,31 ± 7,01 <sup>c</sup>
SF	17,49 ± 6,41 <sup>c</sup>	8,16 ± 0,83 <sup>a</sup>	34,85 ± 2,82 <sup>b</sup>
SF <sub>2</sub>	29,87 ± 1,38 <sup>a</sup>	8,81 ± 0,54 <sup>a</sup>	21,93 ± 2,77 <sup>a</sup>
QF	20,47 ± 1,77 <sup>b</sup>	7,77 ± 1,20 <sup>ab</sup>	29,72 ± 3,91 <sup>b</sup>
QF <sub>2</sub>	32,15 ± 1,43 <sup>a</sup>	7,91 ± 1,01 <sup>a</sup>	19,65 ± 1,88 <sup>a</sup>

Valores: médias ± desvio padrão.

Letras verticalmente iguais não apresentam diferença significativa (p<0,05).

### 3.4. Análises dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos

O processo inicial de anemia por deficiência de ferro é caracterizado pelo esgotamento dos estoques enquanto que as células se apresentam normocíticas e normocrômicas e muito pouco anisocíticas. À medida que a deficiência se torna mais intensa inicia-se a queda de hemoglobina e o aparecimento de microcitose e hipocromia (Mikami et al., 2000). As Tabelas 10 e 11 apresentam o escrutínio das análises destas alterações, as quais agora demonstram as diferenças entre os grupos do ensaio.

A Tabela 10 demonstra que o grupo controle, que recebeu 0,51mg de Fe/dia apresentou valores dos índices VCM, HCM e CHCM inferiores em relação aos grupos fortificados.

TABELA 10. Valores hematimétricos médios dos quatro grupos experimentais e do grupo controle após a fase de repleção

Grupos	Ht (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ g)
C	43,61 $\pm$ 1,50 <sup>b</sup>	45,99 $\pm$ 1,79 <sup>b</sup>	13,89 $\pm$ 0,68 <sup>c</sup>	29,03 $\pm$ 0,81 <sup>c</sup>	9,50 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>
SF	47,09 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>	53,66 $\pm$ 1,86 <sup>a</sup>	17,29 $\pm$ 1,08 <sup>b</sup>	32,20 $\pm$ 0,87 <sup>b</sup>	8,78 $\pm$ 0,50 <sup>ab</sup>
SF <sub>2</sub>	44,21 $\pm$ 3,44 <sup>ab</sup>	54,28 $\pm$ 2,29 <sup>a</sup>	19,34 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup>	35,65 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	8,07 $\pm$ 0,80 <sup>b</sup>
QF	45,67 $\pm$ 2,58 <sup>ab</sup>	53,44 $\pm$ 2,13 <sup>a</sup>	17,26 $\pm$ 0,77 <sup>b</sup>	32,22 $\pm$ 0,51 <sup>b</sup>	8,54 $\pm$ 0,34 <sup>b</sup>
QF <sub>2</sub>	42,63 $\pm$ 2,19 <sup>ab</sup>	53,30 $\pm$ 1,53 <sup>a</sup>	17,67 $\pm$ 0,67 <sup>b</sup>	33,11 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	8,36 $\pm$ 0,57 <sup>b</sup>

Valores: médias  $\pm$  desvio padrão.

Letras verticalmente iguais não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Ht: Hematócrito; VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RBC: Células Vermelhas.

Os parâmetros CH, CHDW, RDW e HDW que estão apresentados na Tabela 11 avaliam respectivamente o conteúdo de hemoglobina celular, amplitude da distribuição de hemoglobina na célula, amplitude da distribuição de glóbulos vermelhos e amplitude da distribuição de hemoglobina. Observa-se, nesta Tabela,

que o grupo controle (sem fortificação), apresentou valores significativamente menores em relação aos grupos que tiveram ferro adicionado à PTS.

TABELA 11. Valores médios de CH, CHDW, RDW e HDW dos grupos experimentais e grupo controle após a fase de repleção

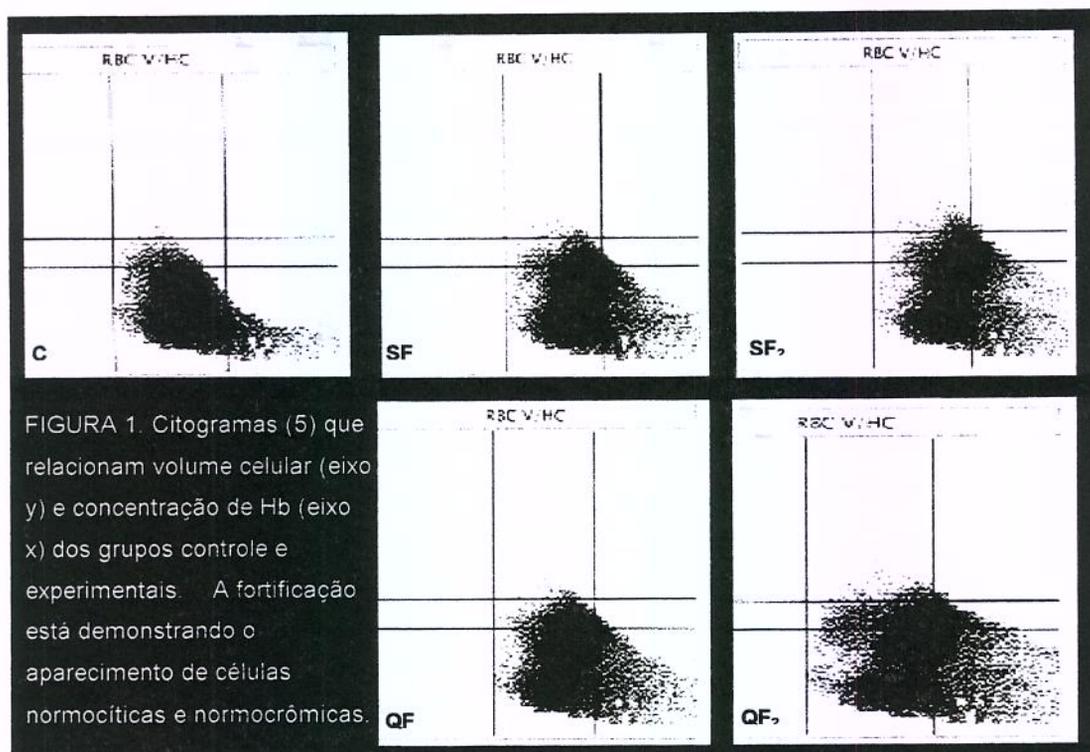
Grupos	CH pg	CHDW pg	RDW %	HDW g/dl
C	13,25 ± 0,67 <sup>b</sup>	3,56 ± 0,30 <sup>c</sup>	27,05 ± 2,03 <sup>b</sup>	2,74 ± 0,10 <sup>c</sup>
SF	16,79 ± 0,53 <sup>a</sup>	5,38 ± 0,30 <sup>b</sup>	30,47 ± 1,67 <sup>ab</sup>	2,92 ± 0,16 <sup>bc</sup>
SF <sub>2</sub>	17,80 ± 0,62 <sup>a</sup>	5,97 ± 0,74 <sup>ab</sup>	31,32 ± 3,36 <sup>a</sup>	3,07 ± 0,15 <sup>ab</sup>
QF	16,81 ± 0,85 <sup>a</sup>	5,27 ± 0,27 <sup>b</sup>	29,54 ± 0,94 <sup>ab</sup>	2,94 ± 0,13 <sup>bc</sup>
QF <sub>2</sub>	17,48 ± 0,62 <sup>a</sup>	6,16 ± 0,62 <sup>a</sup>	32,81 ± 1,90 <sup>a</sup>	3,16 ± 0,14 <sup>a</sup>

Valores: médias ± desvio padrão.

Letras verticalmente iguais não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

HC: Hemoglobina Celular; CHDW: Amplitude da Distribuição da Hemoglobina Celular; RDW: Amplitude da Distribuição de Glóbulos Vermelhos; HDW: Amplitude da Distribuição de Hemoglobina

A Figura 1 apresenta os citogramas de volume celular (eixo y) e concentração de hemoglobina (eixo x). Os indicadores delimitam 9 regiões notáveis de avaliação da morfologia e cromasia dos eritrócitos. No eixo x, os indicadores de concentração de hemoglobina estão acomodados em 28g/dl e 41g/dl, de forma que glóbulos vermelhos com concentração de hemoglobina inferior a 28g/dl são hipocrômicos e superior a 41g/dl são hiperocrômicos. No eixo y, os indicadores de volume de células vermelhas estão acomodados em 60fl e 120fl, e da mesma forma, glóbulos vermelhos com volume inferior a 60fl são microcíticos e superior a 120fl são macrocíticos.



Os citogramas acima reproduzem os resultados obtidos nos cinco distintos tratamentos da anemia. Em todos os casos observa-se um grande número de células microcíticas, que seria indicativo de anemia por deficiência de ferro, no entanto, resultados de análises de perfil hematológico em ratos wistar normais realizados neste laboratório parecem demonstrar este quadro como característico, embora o software utilizado para as análises estivesse calibrado para a respectiva espécie. Ao considerar estes fatos, observa-se que os gráficos comportaram-se de maneira diferente de forma que os grupos que receberam PTS fortificada avançaram de modo significativo o indicador mínimo de microcitose quando comparados com o grupo não fortificado, ou seja, a fortificação promoveu aporte de ferro suficiente para produção de células vermelhas normocíticas e normocrômicas.

Em análises realizadas neste laboratório, o valor médio de hemoglobina e número de eritrócitos de ratos wistar normais em relação aos estoques de ferro, foi de  $11,31 \pm 0,65\text{g/dl}$  e  $6,00 \pm 0,23 \times 10^6 \text{ cells}/\mu\text{l}$  respectivamente, o que permite concluir que o grupo controle, o qual não recebeu fortificação, teve considerado aumento de hemoglobina e número de eritrócitos, quando comparados à estes ratos padrões. Vale ressaltar que o grupo controle reteve a microcitose apesar da hemoglobina já estar em  $13,17 \pm 0,38\text{g/dl}$ .

Os grupos que receberam fortificação, SF e QF, apresentaram uma melhor síntese de hemoglobina e a diversificação de diâmetros, esboçando duas subpopulações. Acrescenta-se que na recuperação sob Bisglicinato Quelato Ferroso (grupo QF), onde se esperava maior eficiência de repleção de ferro (Pineda et al., 1998; Jeppsen & Borzelleca, 1999), não ocorreu superioridade sobre o Sulfato Ferroso.

Quanto aos grupos que tiveram suas dietas adicionadas de uma quantidade maior de ferro, SF<sub>2</sub> e QF<sub>2</sub>, pôde-se observar que a relação entre o total das células vermelhas e suas concentrações de hemoglobina demonstrou pela primeira vez que a população eritrocitária tende à hipercromasia. Notaram-se aqui, duas nítidas subpopulações que confirmam a anisocitose e hipercromasia.

Nenhum indicador bioquímico analisado isoladamente fornece um diagnóstico seguro de deficiência em ferro de forma que o uso de vários indicadores do *status* de ferro fornecem melhor interpretação (Looker et al., 1995).

A concentração sérica de ferro e transferrina depende da velocidade com que o ferro entra no plasma a partir das células absortivas da mucosa intestinal, assim como, da velocidade com que este é introduzido nas células vermelhas. Paralelamente, a concentração de ferro presente na mucosa exerce influência importante nos níveis séricos dos indicadores apresentados na Tabela 12, uma vez que na deficiência de ferro a concentração de ferro sérico está diminuída e a

concentração de transferrina está aumentada, o que permite a conclusão de que a capacidade total de ligação de ferro se torna elevada e a saturação da transferrina reduz significativamente podendo atingir valores abaixo de 15% (Williams et al., 1983; Rapaport, 1987).

Os resultados descritos na Tabela 12 estão coerentes as afirmações acima, visto que o grupo controle (C), o qual não recebeu fortificação e portanto tinha menor concentração de ferro na dieta, apresentou valores de ferro sérico e saturação da transferrina menores e TIBC maiores do que os grupos que receberam fortificação.

TABELA 12. Valores médios de Ferro sérico, capacidade total de ligação de ferro (TIBC) e saturação da transferrina dos grupos experimentais e grupo controle após a fase de repleção

Grupos	Ferro sérico ( $\mu\text{g/dl}$ )	TIBC ( $\mu\text{g/dl}$ )	Saturação (%)
C	63,12 $\pm$ 22,74 <sup>b</sup>	971,19 $\pm$ 252,15 <sup>a</sup>	6,66 $\pm$ 2,95 <sup>b</sup>
SF	184,97 $\pm$ 27,12 <sup>a</sup>	623,99 $\pm$ 53,61 <sup>b</sup>	30,12 $\pm$ 5,68 <sup>a</sup>
SF <sub>2</sub>	159,10 $\pm$ 63,11 <sup>a</sup>	666,94 $\pm$ 105,94 <sup>b</sup>	23,67 $\pm$ 8,53 <sup>a</sup>
QF	173,14 $\pm$ 36,86 <sup>a</sup>	710,04 $\pm$ 183,19 <sup>b</sup>	24,27 $\pm$ 7,47 <sup>a</sup>
QF <sub>2</sub>	177,21 $\pm$ 47,10 <sup>a</sup>	735,44 $\pm$ 181,19 <sup>b</sup>	25,25 $\pm$ 9,28 <sup>a</sup>

Valores: médias  $\pm$  desvio padrão.

Letras verticalmente iguais não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

TIBC: Capacidade Total de Ligação de Ferro

Mais uma vez, não foi observada superioridade do Bisglicinato Quelato Ferroso sobre o Sulfato Ferroso. Vale lembrar que os trabalhos foram realizados em diferentes situações, portanto, diferenças entre eles estarão sempre presentes. Tais diferenças podem ser causadas por fatores que variam desde a natureza do alimento a ser fortificado até as características da população que será submetida ao experimento. Sendo assim, a dificuldade de comparação entre o presente

trabalho com os citados anteriormente torna-se concreta, já que a maioria deles foi realizada com humanos ou, em alguns deles, o fortificante foi testado isoladamente, ou seja, não adicionado a nenhum alimento e sim sob forma de cápsulas medicamentosas.

Na Tabela 13 estão apresentados os valores de absorção aparente, os quais mostraram-se maiores nos grupos que receberam dietas fortificadas. Observou-se que o ferro proveniente do Bisglicinato Quelato Ferroso promoveu melhor absorção, no entanto, houve diminuição da taxa de absorção quando se elevou a quantidade de ferro.

Tabela 13. Valores de ingestão e excreção fecal de ferro durante o período de repleção (14 dias) e % de Absorção Aparente dos grupos fortificados e controle

Grupos	Ingestão de Ferro (mg)	Ferro Fecal (mg)	Absorção Aparente (%)
C	9,53 ± 0,65 <sup>c</sup>	6,83 ± 0,95 <sup>c</sup>	28,57 ± 5,45 <sup>ab</sup>
SF	16,09 ± 2,11 <sup>b</sup>	12,19 ± 1,15 <sup>b</sup>	23,88 ± 5,93 <sup>b</sup>
SF <sub>2</sub>	30,66 ± 1,62 <sup>a</sup>	19,39 ± 0,58 <sup>a</sup>	36,69 ± 1,79 <sup>ab</sup>
QF	20,08 ± 2,23 <sup>b</sup>	12,12 ± 2,65 <sup>b</sup>	40,12 ± 7,39 <sup>a</sup>
QF <sub>2</sub>	31,68 ± 0,64 <sup>a</sup>	21,63 ± 1,26 <sup>a</sup>	31,74 ± 2,64 <sup>ab</sup>

Valores: médias ± desvio padrão.

Letras verticalmente iguais não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

No presente trabalho, ao adicionar-se ferro a PTS notou-se que sua absorção foi adequada o suficiente para descaracterizar a anemia dos ratos. Estes resultados estão de acordo com os de Smith (1983), o qual ao relacionar concentração de ferro e grau de absorção estabeleceu uma relação direta e proporcional. Tal relação não foi tão visível quando a concentração dos fortificantes foi elevada, uma vez que os resultados dos indicadores avaliados não demonstraram diferenças significativas que pudessem levar a conclusão de que o grau de absorção do ferro foi maior.

Estudos sobre a biodisponibilidade do ferro oriundo de fontes vegetais, sobretudo da proteína da soja são freqüentes e procuram entender as características químicas e biológicas da proteína relacionada com a distribuição do ferro. A concentração de ferro na soja pode ser considerada alta (85mg/kg segundo IBGE), a qual, até a década de 80 foi apresentada como um ferro pouco biodisponível (Rotruck & Luhrsen, 1979; Smith, 1983; Cook & Reusser, 1983). A proteína texturizada de soja tem concentração de ácido fítico reduzida ( $\cong$  0,95-1,63%, segundo Anderson & Wolf, 1995) pelo processo de extrusão, embora a possibilidade de formação de complexo com o ferro não esteja descartada. Rotruck & Luhrsen (1979), respaldados por estudos próprios e outros estudos das décadas de 60 e 70, afirmaram a não interferência do ácido fítico na absorção do ferro e demonstraram a biodisponibilidade do ferro proveniente da soja e seus produtos. Entretanto, estudos continuaram a demonstrar a redução significativa da absorção do ferro quando em presença de ácido fítico (Cook & Reusser, 1983; Clydesdale, 1983; Hallberg et al., 1989; Liener, 1994). É necessário manter a credibilidade em Rotruck & Luhrsen (1979), por levantarem a discussão de que muitos trabalhos que avaliavam a influência do ácido fítico na biodisponibilidade do ferro utilizavam o fitato sob forma purificada de fitato de sódio, o qual é diferente do fitato presente nos alimentos. Neste último, o ferro apresenta-se acoplado a outros minerais como cálcio e magnésio e por isso são menos susceptíveis à formação de complexos insolúveis.

#### 4. CONCLUSÃO

A Proteína Texturizada de Soja das dietas promove crescimento adequado de ratos, assim como a manutenção do equilíbrio hemoglobínico.

O processo de implantação da anemia não exerce influência sobre a evolução ponderal, já que ao final da fase de depleção de ferro o peso médio apresentou-se adequado para a idade.

A HRE, ou seja, a eficiência de incorporação do ferro natural da PTS foi maior que a eficiência do ferro proveniente das PTSs fortificadas, de forma que a % HRE diminui conforme o aumento da concentração do ferro.

Foi demonstrado neste trabalho que ratos anêmicos (Hb entorno de 6,88g/dl) elevam a concentração de hemoglobina recuperando-a sem fortificação em dieta contendo PTS com teor protéico de 17%, entretanto, conservam estigmas (anisocitose e variação de cromasia) da anemia.

Embora a fortificação tenha acelerado o processo de recuperação, os grupos que receberam fortificação demonstraram que a quantidade de ferro ideal para repleção foi 0,97 mg/dia, podendo obter uma repleção (em análise superficial, apenas hemoglobina) com 0,51mg/g, que neste caso foi proveniente da PTS. O exposto aqui faz concluir, e mesmo foi verificado, que quantidades superiores a 0,97mg/dia não são necessárias. Afirma-se mais uma vez que, neste trabalho, Sulfato Ferroso não é inferior ao Bisglicinato Quelato Ferroso.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, R. L.; WOLF, W. J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *Journal of Nutrition*, 1995; 125: 581S-588S. Supplement.

AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. Edição Patricia Cunnif. 16. ed. Virgínia: AOAC International, 1995. v. 1

AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. Edição Patricia Cunnif. 16. ed. Maryland: AOAC International, 1997. v.2

BENOIST, B. Introduction. *Journal of Nutrition*, 2001; 131:564S.

BRUNKEN G. S. e SZARFARC, S. C. Anemia Ferropriva em Pré - Escolares: Consequências, Formas de Controle e Histórico das Políticas Nacionais de Redução da Deficiência. *Cadernos de Nutrição*, 1999; 17: 1 – 19.

CARVALHO, W. F. Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia. 7. ed. Belo Horizonte: Coopmed, 1999. 340 p.

CLYDESDALE, F. M. Physicochemical determinants of iron bioavailability. *Food Thecnology*, 1983; 133-144. Outstanding Symposia in Food Science & Technology.

COOK, J. D.; REUSSER, M. E. Iron fortification: an update. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1983; 38: 648-659.

DAHIJA, S. and KAPOOR, A. C. Biological evaluation of protein quality of home-processed supplementary foods for pre-school children. *Food Chemistry*, 1993; 48: 183-188.

FREIRE, W. B. Strategies of the Pan American Health Organization/World Health Organization for the control of iron deficiency in Latin American. *Nutrition Reviews*, 1997; 55(6): 183-188.

FREITAS, M. C. J. Dietas ricas em amido resistente de bananas verdes (*Musa AAA-Nanicão* e *Musa AAB-Terra*) promovem alterações na função intestinal, no metabolismo lipídico e glicídico e na microbiota intestinal. [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2001.

GAZETA DO SUL. Anuário brasileiro da soja 2001. Disponível em <<http://www.gazetadosul.com.br/anuariodasoja>>. Acesso em: 17 abr. 2002

HALLBERG, L.; BRUNE, M.; ROSSANDER, L. Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1989; 49: 140-144.

HURREL, R. F. Preventing iron deficiency through food fortification. *Nutrition Reviews*, 1997; 55(6): 210-222.

JANSUITTIVECHAKUL, O.; MAHONEY, A. W.; CORNFORTH, D. P.; HENDRICKS, D. G.; KANGSADALAMPAI, K. Effect of heat treatment on bioavailability of meat and hemoglobin iron fed to anemic rats. *Journal of Food Science*, 1985; 50: 407-409.

JEPPSEN, R. B.; BORZELLECA, J. F. Safety evaluation of ferrous bisglycinate chelate. *Food and Chemical Toxicology*, 1999; 37: 723-731.

JONG, E. V. Influência de dietas normo e hiperlipídicas sobre o perfil nutricional, parâmetros bioquímicos séricos e estruturais do fígado de ratos wistar. [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 1996.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1994; 34(1): 31-67.

LOOKER, A. C.; GUNTER, E. W.; JOHNSON, C. L. Methods to assess iron status in various NHANES surveys. *Nutrition Reviews*, 1995; 53(9): 246-254.

MEJÍA, L. A. Fortification of foods: historical development and current practices. *Food and Nutrition Bulletin*, 1994; 15(4): 278-281.

MIKAMI, T.; HISAYASU, S.; IKEDA-MORE, Y.; YOSHINO, Y. Decreased mucosal iron induces an increase in intestinal iron absorption in the early stage of iron-deficiency. *Nutrition Research*, 2000; 20(10): 1457-1465.

MILLER, J.; NNANNA, I. Bioavailability of iron in cooked egg yolk for maintenance of hemoglobin levels in growing rats. *Journal of Nutrition*, 1983; 113: 1169-1175.

MIRANDA, L. S. Enriquecimento de alimento à base de leite em pó e fubá de milho com ferro. [dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1999.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient Requirements of Laboratory Animals. 4. rev. ed. Washington, D.C., National Academy Press, 1995. p.32.

OLIVARES, M.; PIZARRO, F.; PINEDA, O.; NAME, J. J.; HERTRAMPF, E.; WALTER, T. Milk inhibits and ascorbic acid favors ferrous bis-glycine chelate bioavailability in humans. *Journal of Nutrition*, 1997; 127: 1407-1411.

PARK, Y. W.; MAHONEY, A. W.; CORNFORTH, D. P.; COLLINGE, S. K.; HENDRICKS, D. G. Bioavailability to anemic rats of iron from fresh, cooked or nitrosylated hemoglobin and mioglobin. *Journal Nutrition*, 1983; 113: 680-687.

PINEDA, O.; ASHMEAD, D.; PEREZ, J. M.; LEMUS, C. P. Effectiveness of iron amino acid chelate on the treatment of iron deficiency anemia in adolescents. *Journal of Applied Nutrition*, 1994; 46(1/2): 2-13.

QUEIROZ, S. S.; TORRES, M. A. A. Anemia carencial ferropriva: aspectos fisiopatológicos e experiência com a utilização do leite fortificado. *Pediatria Moderna*, 1995; 31: Edição Especial.

RAPAPORT, S. J. Introdução a hematologia. São Paulo: Roca, 1987. 346 p.

R.C.W RADAR. Banco de dados da soja. Disponível em <<http://www.rcwconsultores.com.br/radarsoja>>. Acesso em: 17 abr. 2002

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing

committee on reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, 1993; 123: 1939-1951.

ROTRUCK, J. T.; LUHRSEN, K. R. A comparative study in rats of iron bioavailability from cooked beef and soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1979; 27(1): 27-33.

SCHRICKER, B. R.; MILLER, D. D.; CAMPEN, D. V. Effects of iron status and soy protein on iron absorption by rats. *Journal of Nutrition*, 1983; 113: 996-1001.

SIMÕES, M. C. C. Desenvolvimento de um suplemento nutricional rico em ferro hematínico. [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 1998.

SMITH, K. T. Effects of chemical environment on iron bioavailability measurements *Food Technology*, 1983; Oct.: 115-120. Outstanding Symposia in Food Science & Technology.

STEPHENSON, L. S. Possible new developments in community control of iron-deficiency anemia. *Nutrition Reviews*, 1995; 53(2): 23-30.

STOLTZFUS, R. J. Defining iron-deficiency anemia in public health terms: a time for reflection. *Journal of Nutrition*, 2001; 131: 565S-567S.

STOLTZFUS, R. J. Summary: implications for research and programs. *Journal of Nutrition*, 2001; 131: 697S-701S. Supplement.

TEIXEIRA, M. A. V. Amido resistente: estudo da estrutura, ocorrência e propriedades nutricionais em amido de milho e de banana. [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 1998.

THANNOUN, A.M.; MAHONEY, A. W.; HENDRICKS, D. G.; ZHANG, D. Effect of meat-mixtures on bioavailability of total dietary iron for anemic rats. *Cereal Chemistry*, 1987; 64(6): 399-403.

VITERI, F. E. Iron supplementation for the control of iron deficiency in populations at risk. *Nutrition Reviews*, 1997; 55(6): 195-209.

WILLIAM, W. J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A. J.; LICHTMAN, M. A. *Hematology*. 3. ed. US: Mc Graw-Hill Book Company. 1728 p.

ZHANG, D.; HENDRICKS, D. G.; MAHONEY, A. W.; CORNFORTH, D. P. Bioavailability of iron in green peas, spinach, bran cereal and cornmeal fed to anemic rats. *Journal of Food Science*, 1985; 50: 426-428.

ZHANG, D.; HENDRICKS, D. G.; MAHONEY, A. W. Bioavailability of total iron from meat, spinach (*Spinacea oleracea* L.) and meat-spinach mixtures by anaemic and non-anaemic rats. *British Journal of Nutrition*, 1989; 61: 331-343.

ZIEGLER, E. E.; FOMON, S. J. Strategies for the prevention of iron deficiency: iron in infant formulas and baby foods. *Nutrition Reviews*, 1996; 54(11): 348-354.

## CONCLUSÕES GERAIS

A evolução ponderal dos ratos não foi afetada pela substituição parcial ou total da fonte protéica da dieta por PTS, já que ao final dos ensaios os ratos apresentaram peso médio adequado para a idade.

Em ambos ensaios, a indução à anemia, na fase de depleção, e posteriormente a administração de diferentes concentrações de ferro, na fase de repleção, também não exerceram influência sobre o ganho de peso dos animais.

Em relação à primeira etapa do trabalho, a absorção do ferro natural da PTS pode ter sido influenciada pela adição de proteína animal nas dietas. Esta situação constitui hipótese aceitável para esclarecer o fato de que não foram encontradas diferenças de biodisponibilidade entre o Sulfato Ferroso e o Quelato Ferroso. Os resultados permitiram concluir que dietas que contenham como fonte protéica PTS associada à proteína animal não necessitam de fortificação.

Na segunda etapa, pôde-se concluir que os ratos anêmicos foram capazes de recuperar-se consumindo PTS não fortificada, porém, esta recuperação mostrou-se mais efetiva nos grupos fortificados. Novamente, não foram observadas diferenças de biodisponibilidade entre o Sulfato Ferroso e o Quelato Ferroso.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1*****Evolução ponderal e hemoglobínica de ratos jovens alimentados com dieta contendo PTS como fonte protéica total***

Um grupo de 70 ratos Wistar/Unicamp com 21 dias de idade, recém desmamados foi avaliado quanto à evolução ponderal e hemoglobínica através da administração de dieta contendo PTS como fonte protéica. O teor de ferro da dieta era 36mg/kg de dieta, oriundo apenas da PTS. Após 25 dias os ratos, que tinham iniciado a fase com peso médio em torno de  $64,11 \pm 9,49\text{g}$ , atingiram  $158,12 \pm 16,73\text{g}$  conforme o Gráfico 1. O valor médio de hemoglobina ao final desta fase foi  $13,24 \pm 0,72\text{g/dl}$ . Estes resultados demonstraram que a PTS empregada promoveu crescimento adequado, uma vez que o peso de ratos machos normais com 60 dias é de 150 a 180g (Jong, 1996; Teixeira, 1998; Freitas, 2001) e os valores normais de hemoglobina para ratos adultos variam entre  $13,86 \pm 0,32\text{g/dl}$ , como verificados em ensaios neste laboratório, embora um valor superior tenha sido registrado neste trabalho quando as dietas foram fortificadas com ferro.

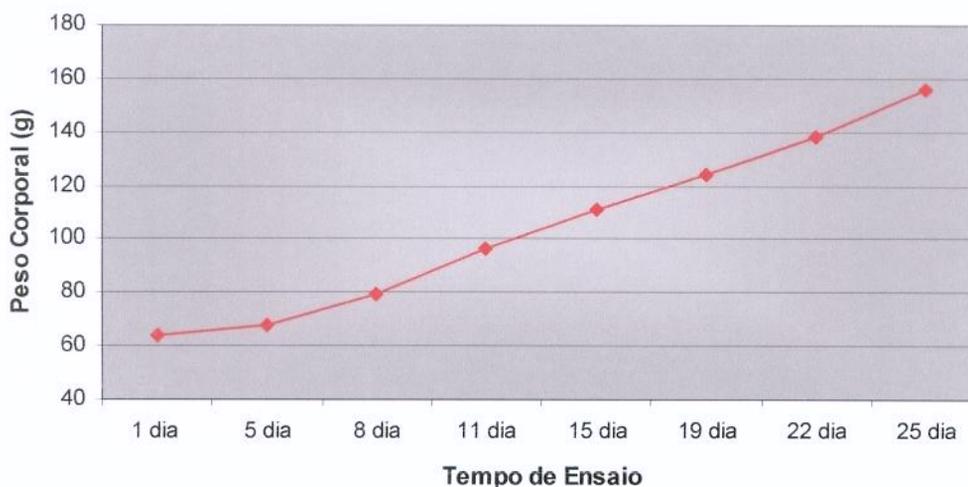
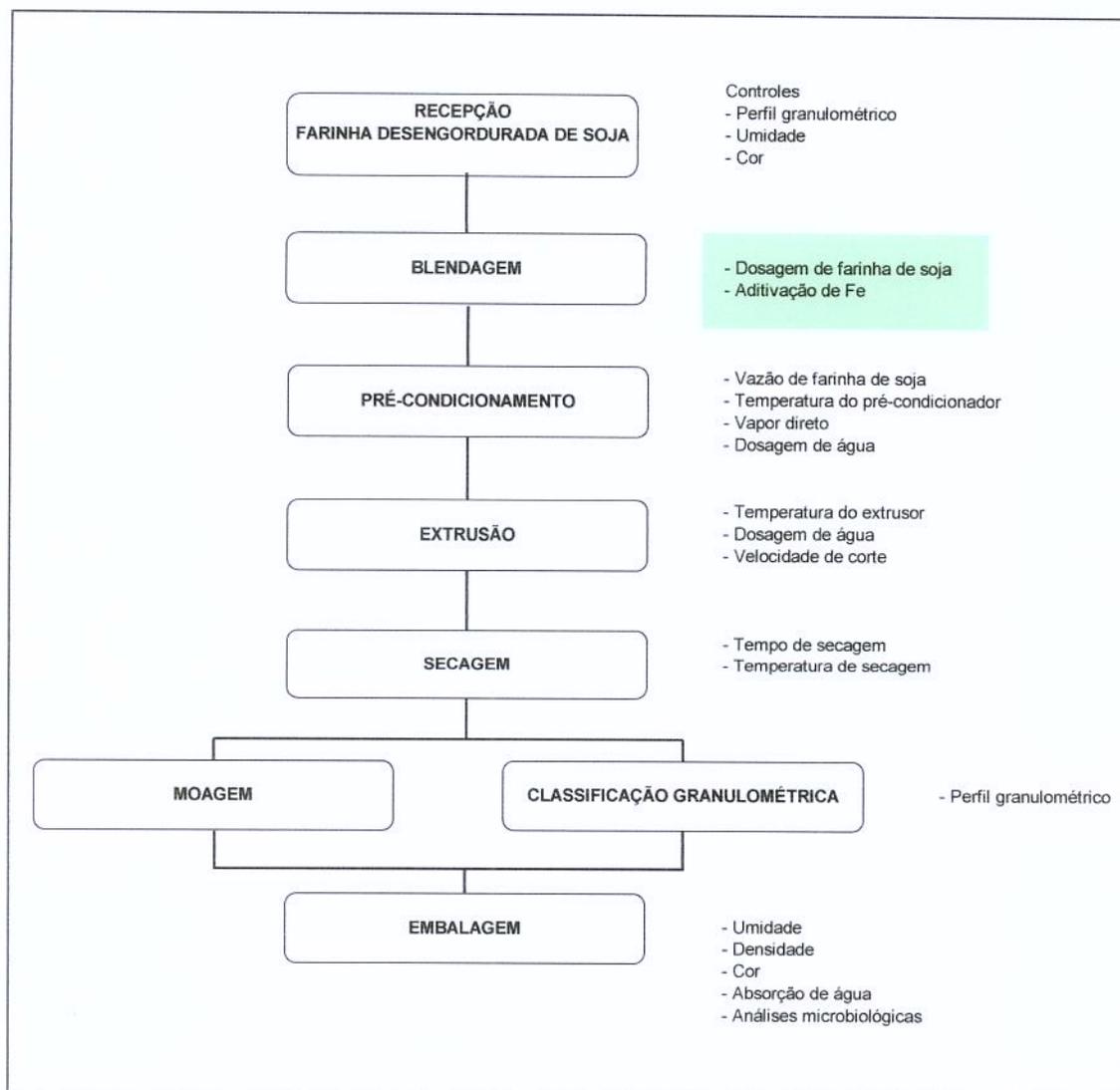


GRÁFICO 1. Curva de ganho ponderal durante 25 dias dos ratos recém desmamados.

## ANEXO 2

**Esquema de adição de ferro a Proteína Texturizada de Soja (PTS) durante o processo de extrusão**



Quadro 1. Esquema demonstrativo da adição de ferro a PTS durante o processo de extrusão. Fonte: Bunge Alimentos Esteio/RS

**ANEXO 3**

***Especificações da fonte de fibra utilizada na confecção das dietas***

**MICROCEL**  
CELULOSE MICROCRISTALINA

**BLANVER**



**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

**TIPO : MC-101**

**LOTE : 057/02**

ANÁLISES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Aspecto	Pó Branco, Não Fibroso	Passa
Odor	Inodoro	Passa
Identificação A	Positivo	Passa
Identificação B	Positivo	Passa
Identificação C	Máx. 350	330
Perda Por Secagem %	Máx. 7.0	3.2
pH	5.0 a 7.0	5.9
Substâncias Solúveis Em Água %	Máx. 0.24	0.12
Resíduo De Ignição %	Máx. 0.05	0.04
Metais Pesados (ppm)	Máx. 10	< 10
Substâncias Solúveis Em Éter %	Máx. 0.05	0.00
Condutividade (microsiemens)	Máx. 75	54
Danc (g/cm <sup>3</sup> ) *	0.26 a 0.31	0.30
Retenção Malha 60 (250 Microns)%	Máx. 1.0	0.0
Retenção Malha 200 (74 Microns)%	Máx. 30.0	26.0

Este produto foi fabricado seguindo as Boas Práticas de Fabricação para insumos farmacêuticos e está de acordo com as especificações da USP25/NF20.

Atende as seguintes especificações microbiológicas: contagem bacteriana total - máx. 1000 ufc/g, contagem de bolores e leveduras - máx. 100 ufc/g, ausente em 10g de amostra para Escherichia coli, Salmonella species, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus.

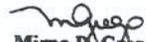
Este produto atende os requisitos para Impurezas Orgânicas Voláteis - USP <467>.

\* Densidade aparente não compactada.

**Fabricação : 03/Fev/2002**

**Validade : 03/Fev/2007**

**Data de Emissão : 22/Fev/2002**

  
Mirna Da Graça  
Farmacêutica CRF8-14.378



## FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA

---

Nome Comercial do Produto : MICROCEL  
 Nome Químico: CELULOSE MICROCRISTALINA  
 Família Química: Celulose  
 Categoria: Orgânico, carboidrato  
 Classe: Insumo Farmacêutico

---

### 1- Características Físicas:

Descrição: Pó fino, branco e inodoro.

### 2- Perigo de Incêndio:

Sem perigo de inflamação.

Extintores: água, espuma, pó químico.

Procedimentos especiais em caso de incêndio: nenhum.

### 3- Perigo para a Saúde:

Sem perigo especial.

Efeitos da exposição prolongada: nenhum.

Em caso de contato acidental: no caso de contato com os olhos, lavar com água. Se ocorrer irritação, procure atendimento médico.

### 4- Perigo de Reação:

Nenhum perigo sob condições normais.

Estabilidade do produto: estável.

### 5- Em caso de Derramamento ou Vazamento:

Evitar o contato com água até que todo o material tenha sido recolhido e desprezado. A área deve ser lavada com água.

### 6- Informações para Proteção Pessoal:

Evitar formação de poeiras no ambiente. Exaustão local e ventilação mecânica são recomendados para prevenir a inalação do pó.

Necessário uso de máscara contra pó.

Recomendado proteção para os olhos.

Recomendado uso de vestimenta apropriada contra poeiras.

### 7- Manuseio e armazenamento:

Estocar em área seca, em ambiente adequado para armazenamento de matérias-primas farmacêuticas mantendo a embalagem bem fechada.

De acordo com as boas práticas de fabricação, manuseie com cuidado e evite contato pessoal.

---

Fabricante: **Blanver Farmoquímica Ltda**  
 Rua Dr. José Alexandre Crosnac, 715  
 Ambitá - Itapevi - São Paulo - cep - 06651-970  
 Fone: 11 4144-1700 Fax: 11 4144-2256  
 e-mail: blanver@blanver.com.br

---

**ANEXO 4**

***Parecer de Aprovação dos Ensaiois Biológicos pelo Comitê de Ética***



INSTITUTO DE BIOLOGIA  
UNICAMP

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
Instituto de Biologia  
Universidade Estadual de Campinas  
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 170-3, sobre "Fortificação com ferro de proteína texturizada de soja destinada à alimentação humana"

sob a responsabilidade de DEBORA DE QUEIROZ TAVARES  
DEPAN - FEA

está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 13.10.91.2000. Este certificado expira em 12.09.2001.

Campinas, 13 de setembro de 2000.

CERTIFICATE

We certify that the work described in the manuscript "Iron fortification of soy texturized protein to man food"

is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Institute of Biology/UNICAMP Ethics Committee for Animal Research (CEEA) on 09.11.2000, protocol nº 170-3. This certificate expires on 09.12.2001.

Campinas 09.11.2000

Alberteino  
Prof(a) Dr(a) Alba R. M. Souza Brito  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Armando Sena - G. Filho  
Prof(a) Dr(a)  
Secretário(a) - CEEA/IB/UNICAMP



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 302-1 sobre "FORTIFICAÇÃO COM FERRO DE PROTEÍNA TEXTURIZADA DE SOJA DESTINADA À ALIMENTAÇÃO HUMANA"

sob a responsabilidade de PROFA. DRA. DÉBORA DE QUEIROZ TAVARES  
FEA/UNICAMP está

de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 04/10/2001.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 302-1 entitled "

is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on 04/10/2001.

(d) (m) (y)

Campinas, 04 de outubro de 2001.

Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Prof. Dr. Armando Ferreira Lima  
Secretário - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CEEA-IB-UNIVERSIDADE ZEPHERINO VAZ  
C.P. 3081-070 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONES 51 37887116  
FAX 55 19 32895124

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta Pública nº 63, de 6 de Agosto de 2001. **Regulamento técnico para fortificação de ferro em farinhas de trigo e milho.** Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em: 23 maio 2002
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº 14, de 3 de Janeiro de 2002. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em: 23 maio 2002
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº 31, de 13 de Janeiro de 1998. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de alimentos adicionados de nutrientes essenciais.** Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em: 10 out. 2000
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº 32, de 13 de Janeiro de 1998. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de suplementos vitamínicos e ou de minerais.** Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em: 10 out. 2000
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução-RDC nº 15, de 21 de Fevereiro de 2000. **Regulamento técnico para fortificação de ferro em farinhas de trigo e milho.** Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em: 23 maio 2002
- ALPERS, D. H.; STENSON, W. F.; BIER, D. M. **Manual of Nutritional Therapeutics**, 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p, 553-563.
- AMAYA-FARFAN, J.; DOMENE, S. M. A. e PADOVANI, R. M. DRI: síntese comentada das novas propostas sobre recomendações nutricionais para

antioxidantes. **Revista de Nutrição da Pucamp**, Campinas, v. 14. n. 1, p. 71-78, jan./abr., 2001.

ANDERSON, R. L.; WOLF, W. J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, p. 581S-588S, 1995. Supplement.

ANTUNES, P. L. e SGARBIERE, V. C. Propriedades físicas, químicas e nutricionais das proteínas da soja. In: MIYASAKA, S. e MEDINA, J. C. **A Soja no Brasil**. [s.l.], 1981. p. 850-857.

BEARD, J. L.; DAWSON, H. and DOMINGO, J. PIÑERO. Iron metabolism: a comprehensive review. **Nutrition Reviews**, New York, v. 54, n. 10, p. 295-317, Oct., 1996.

BENITO, P. and MILLER, D. Iron absorption and bioavailability: an updated review. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 18, n. 3, p. 581-603, 1998.

BENOIST, B. Introduction. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, p. 564S, 2001.

BIOCH, R. U.; PIZARRO, F.; ALMEIDA, C.; BIOCH, M. D.; BIOCH, J. B.; ZUBILLAGA, M.; CARMUEGA, E. and O' DONNELL, A. Bioavailability of microencapsulated ferrous sulfate in fluid cow's milk studies in human beings. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 19, n. 6, p. 893-897, Oct., 1999.

BOCCIO, J. R.; ZUBILLAGA, M. B.; CARO, R. A.; GOTELLI, C. A.; GOTELLI, M. J. and WEILL, R. A new procedure to fortify fluid milk and dairy products with high-bioavailable ferrous sulfate. **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 6, p. 240-246, June, 1997.

BOERSMA, B. J.; BARNES, S.; KIRK, M.; WANG, C. C.; SMITH, M.; KIM, H; XU, J.; PATEL, R. and DARLEY-USMAR, V.M. Soy isoflavonoids and cancer – metabolism at the target site. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 480/481, p. 121-127, Jan., 2001.

BOTHWELL, T. Overview and mechanisms of iron regulation. **Nutrition Reviews**, New York, v. 53, n. 9, p. 237-245, Sept., 1995.

BRABIN, B. J.; PREMJI, Z. and VERHOEFF, F. An analysis of anemia and child mortality. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, p. 636S-648S, 2001. Supplement.

BRUNKEN G. S. e SZARFARC, S. C. Anemia Ferropriva em Pré - Escolares: Consequências, Formas de Controle e Histórico das Políticas Nacionais de Redução da Deficiência. **Cadernos de Nutrição**, São Paulo, v. 17 p. 1 – 19, 1999.

CABRAL, L. C. Processos de obtenção da farinha de soja integral. In: MIYASAKA, S. e MEDINA, J. C. **A Soja no Brasil**. [s.l.], 1981. p. 868-871.

CAMPEN, V. D. Iron bioavailability techniques: an overview. **Food Thecnology**, Chicago, p. 127-132, Oct., 1983. Outstanding Symposia in Food Science & Technology.

CLAIR, R. S. Cardiovascular effects of soybean phytoestrogens. **The American Journal of Cardiology**, New York, v. 82, n. 10A, p. 40S-42S, Nov., 1998.

CONRAD, M. E. and UMBREIT, J. N. A concise review: iron absorption – the mucin-mobilferrin-integrin pathway. A competitive pathway for metal absorption. **American Journal of Hematology**, New York, v. 42, p. 67-73, Aug., 1993.

CONRAD, M. E.; UMBREIT, J. N.; MOORE, E. G.; PETERSON, R. D. A. and JONES, M. B. A newly identified iron binding protein in duodenal mucosa of rats. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 265, n. 9, p. 5273-5279, Marc., 1990.

COOK, J. D. and FINCH, C. A. assessing iron status of a population. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 32, p. 2115-2119, Oct., 1979.

COOK, J. D.; BAYNES, R. D. and SKIKNE, B. S. Iron deficiency and the measurement of iron status. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 5, p. 189-202, 1992.

COOK, J. D.; REUSSER, M. E. Iron fortification: an update. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 38, p. 648-659, Oct., 1983.

COSTA, S. I. Alimentos derivados da soja. In: MIYASAKA, S. e MEDINA, J. C. **A Soja no Brasil**. [s.l.], 1981. p. 857-858.

CUNHA, D. F.; CUNHA, S. F. C. Microminerais. In: DUTRA-de-OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998. Cap. 9, p. 141-166.

CZAJKA-NARINS, D. M. Minerais. In: MAHAN, L. K. e ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. Tradução Alessandra Favano e Andrea Favano. 9. ed. São Paulo: Roca, 1980. Cap. 7, p. 123-166.

DAHIJA, S. and KAPOOR, A. C. Biological evaluation of protein quality of home-processed supplementary foods for pre-school children. **Food Chemistry**, Oxford, v. 48, p. 183-188, Jan., 1993.

DALLMAN, P. R. Iron deficiency: does it matter? **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 226, p. 367-372, June, 1989.

DIAS, N. F. G. P. **Desenvolvimento e avaliação de um suplemento alimentar para pré-escolares.** Viçosa, 1997. 86 p. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa.

DUPUY, P.; SAUTIER, C.; STIEVENARD, S. Le soja en alimentation humaine. **Cahiers de Nutrition et de Dietetique**, Paris, v. 29, n. 1, 1994.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Iron. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, p. 1383S-1386S, 2001. Supplement.

FOMON, S. J. **Nutrition of normal infants.** St Louis: Mosby, 1993. 475 p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health and Human. Title 21-Food and Drugs. Part 101-Food labeling-Table of Contents. Sec. 101.82 Health Claim: soy protein and risk of coronary heart disease. Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov>. Acesso em 06 set. 2002.

FREIRE, W. B. Strategies of the Pan American Health Organization/World Health Organization for the control of iron deficiency in Latin American. **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 6, p. 183-188, June, 1997.

FRIEDMAN, M. and BRANDON, D. Nutritional and health benefits of soy protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 3, p. 1069-1086, Marc., 2001.

GARCIA, M. C.; MARINA, M. L.; LABORDA, F. and TORRE, M. Chemical characterization of commercial soybean products. **Food Chemistry**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 325-331, Sept., 1998.

GAZETA DO SUL. **Anuário brasileiro da soja 2001.** Disponível em <<http://www.gazetadosul.com.br/anuariodasoja>>. Acesso em: 17 abr. 2002

GLADE, M. J. Third International Symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease, Washington, DC, October 31-November 1, 1999. **Nutrition**, New York, v. 17, p. 73-77, 2001.

GOLDEBERG, A. C. Perspectives on soy protein as a nonpharmacological approach for lowering cholesterol. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, p. 675S-678S, 1995. Supplement.

HAAS, J. D. and BROWNLIE, T. Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, p. 676S-690S, 2001. Supplement.

HALLBERG, L. Perspectives on nutritional iron deficiency. **Annual Reviews in Nutrition**, s.l., v. 21, p. 1-21, 2001.

HERBERT, V. Recommended dietary intakes (RDI) of iron in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 45, p. 679-686, May, 1987.

HUH, M. H.; SHIN, M. H.; LEE, Y. B. and SOHN, H. S. Effect of soybean hull iron on growth, iron bioavailability, and behavioral function in anemic rats induced by iron deficiency during gestation or lactation. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 19, n.12, p. 1749-1761, Mar., 1999.

HURREL, R. F. Preventing iron deficiency through food fortification. **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 6, p. 210-222, June, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estudo Nacional da Despesa Familiar**: tabelas de composição de alimentos 4. ed. Rio de Janeiro, 1996. 137 p.

IOST, C.; NAME, J. J.; JEPPSEN, R. B. and ASHMEAD, D. Repleting hemoglobin in iron deficiency anemia in young children through liquid milk fortification with

bioavailable iron amino acid chelate. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 17, n. 2, p. 187-194, July, 1998.

JEPPSEN, R. B.; BORZELLECA, J. F. Safety evaluation of ferrous bisglycinate chelate. **Food and Chemical Toxicology**, Elmsford, v. 37, p. 723-731, Jan., 1999.

KONIJN, A. M.; EDELSTEIN, S. and GUGGENHEIM, K. Separation of a thyroid-active fraction from unheated soya bean flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 23, p. 549-555, Nov., 1972.

LATUNDE-DADA, G. O.; BIANCHI, M. L. P. and OLIVEIRA, J. E. D. On the methods for studying the mechanisms and bioavailability of iron. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n. 3, p. 76-80, Mar., 1998.

LATUNDE-DADA, G. O.; DUTRA DE OLIVEIRA, J. D.; CARILLO, S. V.; MARCHINI, J. S. and BIANCHI, M. L. P. Gastrointestinal tract and iron absorption: a review. **Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 9, p. 103-125, 1998.

LAYRISSE, M. and GARCIA-CASAL, M. M. Strategies for the prevention of iron deficiency through foods in the household. **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 6, p. 233-239, June, 1997.

LAYRISSE, M. and ROCHE, M. The relationship between anemia and hookworm infection. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v. 79, p. 279-301, Nov., 1964.

LEE, K. and CLYDESDALE, F. M. Chemical changes of iron in food and drying processes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 45, p. 711-715, Nov., 1980.

LEE, K. and CLYSDSDALE, M. Quantitative determination of the elemental, ferrous, ferric, soluble, and complexed iron in foods. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 44, n. 2, p. 549-554, 1979.

LEE, M. D. and KIM, I. C. Soy protein and obesity. **Nutrition**, New York, v. 16, n. 6, p. 459-460, 2000.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 34, n. 1, p. 31-67, 1994.

LIU, K. **Soybeans-chemistry, technology and utilization**. 1. ed. New York: Chapman & Hall, 1999. 532p.

LÖNNERDAL, B. Nutritional aspects of soy formula. **Acta Paediatrica**, Stockholm, v. 402, p. 105-108, 1994. Supplement.

LOOKER, A. C.; GUNTER, E. W.; JOHNSON, C. L. Methods to assess iron status in various NHANES surveys. **Nutrition Reviews**, New York, v. 53, n. 9, p. 246-254, Sept., 1995.

LUSAS, E. W. and RIAZ, M. N. Soy protein products: processing and use. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, p. 573S-580S, 1995. Supplement.

LYSIONEK, A. E.; ZUBILLAGA, M. B.; SALGUEIRO, M. J.; SARABIA, M. I.; CARO, R. A.; WEILL, R. and BOCCIO, J. R. Study of industrial microencapsulated ferrous sulfate by means of the prophylactic-preventive method to determine its bioavailability. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, s.l., v. 46, p. 125-129, June, 2000.

MANTOVANI, D. M. B. Ferro em alimentos: a importância da sua especiação. **Boletim ITAL**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 381-389, out./dez., 1986.

MAZUR, W. M.; DUKE, J. A.; WÄHÄLÄ, K.; RASKU, S. and ADLERCREUTZ, H. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 9, p. 193-200, Apr., 1998.

MEJÍA, L. A. Fortification of foods: historical development and current practices. **Food and Nutrition Bulletin**, Tokio, v. 15, n. 4, 1994.

MESSINA, M. Modern applications for an ancient beans: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, p. 567S-569S, 1995. Supplement.

MESSINA, M. Soyfoods and soybean phyto-oestrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT). **European Journal of Cancer**, New York, v. 36, p. S71-S77, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Alimentação e Nutrição. **Prevenção e controle dos distúrbios nutricionais e doenças associadas a alimentação e nutrição**. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em 26 Marc. 2002.

MIYASAKA, S. e MEDINA, J. C. **A Soja no Brasil**. [s.l.], 1981. 1062p.

MONSEN, E. R. and BALINTFY, J. L. Calculating dietary iron bioavailability: refinement and computerization. **Journal of The American Dietetic Association**, Chicago, v. 80, p. 307-311, Apr., 1982.

MONSEN, E. R.; HALLBERG L.; LAYRISSE, M.; HEGSTED, M.; COOK, J. D.; MERTZ, W. and FINCH, C. A. Estimation of available dietary iron. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 31, p. 134-141, Jan., 1978.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recommended Dietary Allowances**. 10.ed., Washington: National Academy Press, 1989. 284 p.

O'DONNELL, A.; CARMUEGA, E. S. and DURÁN, P. Preventing iron deficiency in infants and preschool children in Argentina. **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 6, p. 198-194, June, 1997.

OLIVARES, M.; PIZARRO, F.; PINEDA, O.; NAME, J. J.; HERTRAMPF, E.; WALTER, T. Milk inhibits and ascorbic acid favors ferrous bis-glycine chelate bioavailability in humans. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 127, p. 1407-1411, Mar., 1997.

PAIVA, A. A.; RONDÓ, P. H. C. e GUERRA-SHINOHARA, E. M. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 4, ago., 2000.

PINEDA, O.; ASHMEAD, D.; PEREZ, J. M.; LEMUS, C. P. Effectiveness of iron amino acid chelate on the treatment of iron deficiency anemia in adolescents. **Journal of Applied nutrition**, La Habra, v. 46, v. 1 e 2, p. 2-13, 1994.

PIZARRO, F.; BIOCH, R. U.; OLIVARES, M.; ALMEIDA, C.; BIOCH, M. L. D.; CARMUEGA, E.; O' DONNELL, A. and VALENCIA, M. E. Iron absorption of ferric glycinate is controlled by iron stores. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 18, n. 1, p. 3-9, Sept., 1998.

QUEIROZ, S. S.; TORRES, M. A. A. Anemia carencial ferropriva: aspectos fisiopatológicos e experiência com a utilização do leite fortificado. **Pediatria Moderna**, São Paulo, v. 31, jul., 1995. Edição Especial.

RAPAPORT, S. J. **Introdução a hematologia**. São Paulo: Roca, 1987. 346 p.

R.C.W RADAR. **Banco de dados da soja.** Disponível em <<http://www.rcwconsultores.com.br/radarsoja>>. Acesso em: 17 abr. 2002

SCHULTINK, W. and GROSS, R. Iron deficiency alleviation in developing countries. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 9, p. 281-293, 1996.

SIMÕES, M. C. C. **Desenvolvimento de um suplemento nutricional rico em ferro hemático.** Campinas, 1998. 97 p. Tese (Mestre em Ciência da Nutrição)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

STEPHENSON, L. S. Possible new developments in community control of iron-deficiency anemia. **Nutrition Reviews**, New York, v. 53, n. 2, p. 23-30, Feb., 1995.

STOLTZFUS, R. J. Summary: implications for research and programs. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, p. 697S-701S, 2001. Supplement

STOLTZFUS, R. J.; DREYFUSS, M. L.; M. P. H.; HABABUU, M. C. and ALBONICO, M. Hookworm control as a strategy to prevent iron deficiency. **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 6, p. 223-232, June, 1997.

TIKKANEN, M. J. and ADLERCREUTZ, H. Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 60, n. 1, p. 1-5, 2000.

TRAVAGLINI, D. A. e VITTI, P. Soja em farinhas e produtos desidratados de preparo rápido. In: MIYASAKA, S. e MEDINA, J. C. **A Soja no Brasil.** [s.l.], 1981. p. 872-880.

TRUMBO, P.; YATES, A. A.; SCHLICKER, S. and POOS, M. Dietary Reference Intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. **Journal of The American Dietetic Association**, Chicago, v. 101, n. 3, p. 294-301, Mar., 2001.

VITERI, F. E. Iron supplementation for the control of iron deficiency in populations at risk. **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 6, p. 195-209, June, 1997.

VOET, D. and VOET, J. G. **Biochemistry**. Canada: John Wiley & Sons, 1990. 1223 p.

WILLIAM, W. J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A. J.; LICHTMAN, M. A. **Hematology**. 3. ed. US: Mc Graw-Hill Book Company. 1728 p.

WORWOOD, M. The laboratory assessment of iron status - an update. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 259, p. 3-23, July, 1997.

YATES, A. A.; SCHLICKER, S. A. and SUITOR, C. W. Dietary Reference Intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins, and choline. **Journal of The American Dietetic Association**, Chicago, v. 98, p. 699-706, 1998.

ZHU, Y. I. and HAAS, J. D. Altered metabolic response of iron-depleted nonanemic women during a 15-km time trial. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 84, n. 5, p. 1768-1775, May, 1998.

ZIEGLER, E. E.; FOMON, S. J. Strategies for the prevention of iron deficiency: iron in infant formulas and baby foods. **Nutrition Reviews**, New York, v. 54, n. 11, p. 348-354, Nov., 1996.