

KARINA RIBEIRO RIOS

Nutricionista

**EFEITO DA REMOÇÃO DA FONTE DE ZINCO DA MISTURA
SALINA DA DIETA SOBRE O GANHO DE PESO DE RATOS
WISTAR E O VALOR NUTRITIVO DA CASEÍNA: INFLUÊNCIA DE
ADIÇÕES CRESCENTES DE ÁCIDO FÍTICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientador:

Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira

CAMPINAS

2003

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

K479e Rios, Karina Ribeiro
Efeito da remoção da fonte de zinco da mistura salina da dieta sobre o ganho de peso de ratos wistar e o valor nutritivo da caseína: influência de adições crescentes de ácido fólico / Karina Ribeiro Rios.—Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Admar Costa de Oliveira
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Zinco. 2.Ácido fólico. 3.Caseína. 4.Dietas. 5.Rato.
I.Oliveira, Admar Costa de. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira

Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka

Prof. Dra. Flávia Maria Netto

Prof. Dr. Wagner Alves Carvalho

Aos meus pais, *Carlos* e *Ana*, e ao
Fernando, pelo amor e apoio
incondicionais!

A *Suzi*, que foi por onde tudo começou...

AGRADECIMENTOS

Ao Professor *Admar*, por ter me dado a oportunidade de inserção na vida científica e por muitos ensinamentos sobre “as coisas como elas são”.

Aos Professores Célio, Wagner e Flávia, membros da banca examinadora, por todas as sugestões e correções feitas no trabalho.

À Professora *Iara Battisti*, pelo auxílio no tratamento estatístico dos dados.

À Professora *Semíramis* e à *Marlene*, do Laboratório de Micronutrientes da PUC, pelo auxílio nas análises para determinação do zinco nas amostras.

Ao *CNPq*, pelo apoio financeiro.

Aos responsáveis pelos laboratórios do Depan: *Soely, Yara, Carla, Eliana, Fátima* e *Francisco*, pelo apoio técnico prestado quando necessário.

À *Suzana*, amiga e mãe de todos (humanos e roedores)!

Aos amigos: *Giovana, Keila, Flávia, Marconi, Maria Inês, Alexis, Sylvia, Cibelem, Vera, Sônia, Cristina* e *Adriane* pelo companheirismo, amizade e por fazerem graça de alguns dos momentos mais complicados.

Às minhas queridas “flores de laranjeira”: *Daiane* e *Janaina*, por serem parte da minha vida e por terem participado de todas as etapas do mestrado, mesmo que à distância...

À *Lelei*, minha “enfermeira e psicóloga de plantão”.

À *Dona Carolina*, uma pessoa que me acolheu carinhosamente e fez da sua casa em Campinas, uma extensão da minha.

À *Vanderléa*, por ter me dado o suporte e o auxílio necessários em alguns momentos de ausência na UNIJUÍ, para a finalização do trabalho.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....		x
ÍNDICE DE FIGURAS.....		xii
RESUMO.....		xvi
ABSTRACT.....		<u>xviii</u>
1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	ZINCO: FUNÇÕES ORGÂNICAS E METABOLISMO.....	3
2.2	INDICADORES BIOQUÍMICOS PARA MENSURAR O STATUS DE ZINCO E CONTROLE DA ABSORÇÃO CORPORAL.....	6
2.3	PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO COM O ZINCO: A IMPORTÂNCIA DA METALOTIONEÍNA.....	9
2.4	FONTES ALIMENTARES DE ZINCO.....	10
2.5	BIODISPONIBILIDADE DO ZINCO: ELEMENTOS QUE INTERFEREM NA ABSORÇÃO DO MINERAL.....	11

2.6	RECOMENDAÇÃO NUTRICIONAL PARA O ZINCO E INTERFERÊNCIAS DO ÁCIDO FÍTICO.....	13
3	OBJETIVOS.....	19
3.1	OBJETIVO GERAL.....	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1	MATERIAL.....	20
4.1.1	Animais para experimentação.....	20
4.1.2	Dietas experimentais.....	21
4.1.3	Lavagem dos utensílios e vidraria.....	26
4.2	MÉTODOS.....	27
4.2.1	Ensaio Biológico de determinação do valor nutritivo da caseína e da dieta através do balanço de nitrogênio (Digestibilidade Aparente - DA - e Digestibilidade Corrigida pela Dieta Aprotéica - DCDA) e indicadores de crescimento Quociente de Conversão Alimentar (QCA), Quociente de Eficiência Protéica Líquida (NPR) e Quociente de Eficiência Protéica (PER).....	27

4.2.2	Determinações analíticas.....	28
4.2.2.1	Proteína bruta e nitrogênio.....	28
4.2.2.2	Umidade.....	28
4.2.2.3	Determinação do teor de zinco no soro dos ratos e água deionizada utilizada nos procedimentos experimentais.....	29
4.2.2.4	Determinação do teor de zinco nas dietas, caseína e mistura salina sem a fonte de zinco.....	30
4.3	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1	ENSAIO BIOLÓGICO I (ZINCO) e ENSAIO BIOLÓGICO II (ZINCO X ÁCIDO FÍTICO).....	31
5.1.1	Consumo de dieta e ganho de peso.....	31
5.1.2	Determinação do valor nutritivo da caseína e da dieta através do balanço de nitrogênio (Digestibilidade Aparente -DA- e Digestibilidade Corrigida pela Dieta Aprotéica -DCDA) e indicadores de crescimento Quociente de Conversão Alimentar (QCA), Quociente de Eficiência Protéica Líquida (NPR) e Quociente de Eficiência Protéica (PER).....	44
5.1.3	Determinação do teor de zinco no soro dos ratos.....	49

6	CONCLUSÕES.....	56
7	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	57

A redação da dissertação seguiu as normas preconizadas pela Faculdade de Engenharia de Alimentos, segundo orientações de Curty e Cruz (2001).

ÍNDICE DE TABELAS

- TABELA 1.** Formulação da dieta basal sem a fonte de zinco da mistura mineral ($ZnCO_3$, 56 % Zn) oferecida aos ratos Wistar nos 32 dias dos Ensaios Biológicos I e II, exceto para os grupos Controle e Aprotéico.....23
- TABELA 2** Consumo de Dieta (CD) e Ganho de Peso (GP) dos ratos Wistar durante 32 dias no Ensaio Biológico I alimentados com dieta basal de caseína, sem a fonte de zinco da mistura mineral.....31
- TABELA 3** Ganho de Peso (GP) e Consumo de Dieta (CD) para os ratos Wistar (n= 7) durante 8 dias no Ensaio Biológico I recebendo dietas de caseína com adições crescentes de $ZnCO_3$, 56% Zn, após 32 dias em dieta basal de caseína, sem a fonte de zinco da mistura mineral.....32
- TABELA 4.** Consumo de Dieta (CD) e Ganho de Peso (GP) dos ratos Wistar (n=7) por grupo, durante 32 dias no Ensaio Biológico II recebendo dieta basal sem a fonte de zinco da mistura mineral ($ZnCO_3$, 56% Zn) e com adições crescentes de ácido fólico.....43
- TABELA 5.** Digestibilidade Aparente (DA), Digestibilidade Corrigida pela Dieta Aprotéica (DCDA), Quociente de Eficiência Líquida da Caseína (NPR), Quociente de Eficiência da Caseína (PER) e Quociente de Conversão Alimentar (QCA) para os grupos de ratos Wistar do Ensaio Biológico I.....45
- TABELA 6.** Digestibilidade Aparente (DA) e Digestibilidade Corrigida pela Dieta Aprotéica (DCDA), Quociente de Eficiência Líquida da Caseína (NPR), Quociente de Eficiência da Caseína (PER) e Quociente de Conversão Alimentar (QCA) para os grupos de ratos Wistar (n=7) do Ensaio Biológico II.....46

TABELA 7. Quociente de Conversão Alimentar (QCA) para os ratos Wistar em 8 dias nas respectivas dietas AIN-93G de caseína (12,2 % de proteína) com adições crescentes de $ZnCO_3$, 56 % Zn, no Ensaio Biológico I, após 32 dias em dieta AIN-93G cuja fonte de zinco ($ZnCO_3$, 56 % Zn) fora removida.....48

TABELA 8. Concentração de zinco no soro de ratos Wistar do Ensaio Biológico I verificada no final dos 32 dias (Tempo 1).....50

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Efeitos da deficiência de zinco sobre processos metabólicos associados com o crescimento (MacDONALD, 2000).....6
- FIGURA 2** Função da Metalotioneína / Tioneína como um sistema homeostático para o zinco. *À esquerda:* um aumento na quantidade de zinco disponível induz a síntese de Tioneína através da ação de fatores de transcrição dependentes de zinco, levando à formação de Metalotioneína. *À direita:* Se a quantidade de zinco disponível estiver baixa e se a necessidade para incorporação nas apoformas de proteínas de zinco, o mineral será liberado da Metalotioneína e a Tioneína será formada (MARET, 2000).....10
- FIGURA 3.** Estrutura da molécula de ácido fítico (KRATZER e VOHRA, 1986)....14
- FIGURA 4.** Complexação de metais na molécula de ácido fítico nos fosfatos presentes na mesma molécula ou entre moléculas de fosfato, conforme estrutura sugerida por Erdman, citado por Kratzer e Vohra (1986).....15
- FIGURA 5.** Representação da estrutura do complexo ternário proteína-metal-fitado, onde o M^+ representa o metal ligado à molécula do ácido fítico (GRAF, 1983).....16
- FIGURA 6.** Divisão dos grupos experimentais e tempo de alimentação dos ratos com as respectivas dietas durante os 40 dias de duração do Ensaio Biológico I, incluindo período de adaptação e experimental propriamente dito.....24

FIGURA 7. Determinação do teor de zinco por espectrofotometria de absorção atômica de chama em amostras das dietas experimentais, caseína e mistura salina, onde a seqüência numérica significa: **(1)** Mistura salina sem ZnCO₃ (56 % Zn) contendo $1,8 \pm 0,3$ mg de zinco / kg de mistura salina; **(2)** Caseína contendo $4,2 \pm 0,3$ mg de zinco / kg de caseína; **(3)** Dieta 0 Zn contendo $1,1 \pm 0,6$ mg de zinco / kg de dieta; **(4)** Dieta 16 Zn contendo $14,2 \pm 10,6$ mg de zinco / kg de dieta; **(5)** Dieta 32 Zn contendo $33,1 \pm 4,3$ mg de zinco / kg de dieta; **(6)** Dieta 64 Zn contendo $65,4 \pm 12,0$ mg de zinco / kg de dieta; **(7)** Dieta 128 Zn contendo $129,2 \pm 7,1$ mg de zinco / kg de dieta.....34

FIGURA 8. Recuperação dos ratos Wistar desnutridos que foram alimentados com dieta aprotéica, com vistas à verificação da evolução ponderal durante 13 dias com dietas de caseína (12,2 % de proteína; n=4): **0 Zn** – grupo em dieta cuja fonte de zinco (ZnCO₃, 56 % Zn) fora removida da mistura salina; **32 Zn** – grupo em dieta AIN - 93G.....36

FIGURA 9. Regressão para o ganho de peso dos ratos Wistar durante 8 dias em dieta de caseína (12,2 % de proteína) com adições específicas de carbonato de zinco (ZnCO₃, 56 % Zn): **(1) Grupo 0 Zn** sem adição de ZnCO₃, 56 %Zn, à mistura mineral, contendo $1,1 \pm 0,6$ mg Zn / kg de dieta; **(2) Grupo 16 Zn** contendo $14,2 \pm 10,6$ mg de zinco / kg de dieta; **(3) Grupo 32 Zn** contendo $33,1 \pm 4,30$ mg de zinco/kg de dieta; **(4) Grupo 64 Zn** contendo $65,4 \pm 12,0$ mg de zinco / kg de dieta; **(5) Grupo 128 Zn** contendo $129,2 \pm 7,1$ mg de zinco / kg de dieta, após 32 dias em dieta com a fonte de zinco (ZnCO₃, 56 % Zn) removida da mistura mineral.....38

FIGURA 10. Regressão para o ganho de peso dos ratos Wistar em 32 dias do Ensaio Biológico II recebendo as respectivas dietas de caseína (12,4 % de proteína) sem o $ZnCO_3$, 56% Zn, adicionado à mistura mineral e com adições crescentes de ácido fólico para os seguintes tratamentos: **(1) Grupo 0 AF** sem adição de ácido fólico à dieta; **(2) Grupo 4 AF** em dieta acrescida de 8,3 g de ácido fólico / kg; **(3) Grupo 8 AF** em dieta acrescida de 16,5 g de ácido fólico / kg; **(4) Grupo 12 AF** em dieta acrescida de 24,8 g de ácido fólico / kg; **(5) Grupo 16 AF** em dieta acrescida de 33,1 g de ácido fólico / kg.....41

FIGURA 11. Regressão para o consumo dos ratos Wistar de dieta de caseína (12,4 % de proteína), sem adição do $ZnCO_3$, 56% Zn, à mistura mineral, e com adições de ácido fólico para os seguintes tratamentos, em 32 dias do Ensaio Biológico II: **(1) Grupo 0 AF** sem adição de ácido fólico à dieta; **(2) Grupo 4 AF** em dieta acrescida de 8,3 g de ácido fólico / kg; **(3) Grupo 8 AF** em dieta acrescida de 16,5 g de ácido fólico / kg; **(4) Grupo 12 AF** em dieta acrescida de 24,8 g de ácido fólico / kg; **(5) Grupo 16 AF** em dieta acrescida de 33,1 g de ácido fólico/kg.....42

FIGURA 12. Regressão para as adições de $ZnCO_3$, 56 % Zn, na dieta basal e as conseqüentes concentrações de zinco no soro dos ratos Wistar do Ensaio Biológico I, durante um período de 8 dias (Tempo 2): **(1) Grupo 0 Zn** em dieta sem adição de $ZnCO_3$ (56 % Zn) da mistura mineral contendo $1,1 \pm 0,1 \mu g Zn / mL$ de soro; **(2) Grupo 16 Zn** em dieta com adição de 14,2 mg de zinco / kg contendo $1,1 \pm 0,4 \mu g Zn / mL$ de soro; **(3) Grupo 32 Zn** em dieta com adição de 33,1 mg de zinco / kg contendo $1,0 \pm 0,1 \mu g Zn / mL$ de soro; **(4) Grupo 64 Zn** em dieta com adição de 65,4 mg de zinco / kg contendo $2,0 \pm 0,5 \mu g Zn / mL$ de soro; **(5) Grupo 128 Zn** em dieta com adição de 129,2 mg de zinco / kg contendo $3,0 \pm 0,3 \mu g Zn / mL$ de soro.....52

FIGURA 13. Regressão para as adições de ácido fólico na dieta basal e as consequentes concentrações de zinco no soro de ratos Wistar do Ensaio Biológico II, durante um período de 32 dias: **(1) Grupo 0 AF** sem adição de ácido fólico à dieta, contendo $0,84 \pm 0,03 \mu\text{g Zn / mL}$ de soro; **(2) Grupo 4 AF** em dieta acrescida de 8,3 g de ácido fólico / kg contendo $0,55 \pm 0,10 \mu\text{g Zn / mL}$ de soro; **(3) Grupo 8 AF** em dieta acrescida de 16,5 g de ácido fólico / kg contendo $0,31 \pm 0,12 \mu\text{g Zn / mL}$ de soro; **(4) Grupo 12 AF** em dieta acrescida de 24,8 g de ácido fólico / kg, contendo $0,32 \pm 0,10 \mu\text{g Zn / mL}$ de soro; **(5) Grupo 16 AF** em dieta acrescida de 33,1 g de ácido fólico/kg, contendo $0,22 \pm 0,05 \mu\text{g Zn / mL}$ de soro.....54

RESUMO

O zinco é um mineral que desempenha inúmeras funções biológicas, como catalisador para a atividade de mais de 300 enzimas, constituinte estrutural de muitas proteínas e como regulador na prevenção da formação de radicais livres. Dado a esta multiplicidade funcional, a deficiência de zinco é especialmente crítica em estádios de rápido crescimento e desenvolvimento onde seu requerimento é aumentado, na ingestão alimentar deficiente ou quando ocorre baixa biodisponibilidade do zinco. Com a descoberta da deficiência do mineral em humanos na década de 60 devido ao elevado consumo de ácido fítico por populações do Oriente Médio, os estudiosos acreditavam ser este um fato isolado, até que na década de 90 foi reconhecido como um problema de carência nutricional de ocorrência freqüente em países desenvolvidos. Com vistas a determinar a influência da fonte de zinco da mistura mineral da dieta AIN-93G e de adições de ácido fítico no crescimento e estado nutricional de zinco em ratos Wistar, estudou-se o efeito da suplementação com carbonato de zinco (56 % Zn) e ácido fítico na forma de hexafosfato de mioinositol (IP6), utilizando-se adições crescentes na dieta de caseína. Os resultados mostraram que apesar de o carbonato de zinco (56 % Zn) ter sido removido por 32 dias, não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) para os índices de crescimento (consumo de dieta e ganho de peso) e valor nutritivo da caseína, determinado pelo Quociente de Eficiência da Caseína (PER). A concentração sérica de zinco não diferiu entre os animais do grupo Controle (dieta AIN-93G, 12,2 % de caseína) e os animais do grupo com dieta basal, sem a fonte de zinco da mistura mineral (ZnCO_3 , 56% Zn), sendo a zincemia assegurada pelos 4,2 mg Zn / kg de caseína. Adições crescentes de ZnCO_3 , 56% Zn, até 129,2 mg de zinco / kg de dieta basal durante 8 dias, após a remoção do mineral por 32 dias, resultaram em valores maiores para ganho de peso, porém até o limite de 86,7 mg Zn / kg dieta, correspondendo a um valor máximo de 98,6 gramas de ganho ponderal. A eficiência alimentar

apresentou valores maiores a partir de 33,1 mg Zn / kg dieta e a concentração de zinco no soro dos animais, valores maiores para as adições de 65,4 e 129,2 mg Zn/kg dieta. Adições crescentes de ácido fítico à dieta basal, sem o ZnCO_3 , 56 % Zn, da mistura mineral, num período de 32 dias, ocasionaram redução constante nos índices de crescimento (consumo de dieta e ganho de peso), no valor nutritivo da caseína determinado pelo Quociente de Eficiência Líquida da Caseína (NPR) e Quociente de Eficiência da Caseína (PER), no valor nutritivo dietético, determinado pelo Quociente de Conversão Alimentar (QCA) e na concentração sérica de zinco dos ratos. Os valores das digestibilidades (Aparente e Corrigida pela Dieta Aprotéica) não foram comprometidos pelas adições crescentes de fitato. Pelo exposto, pôde ser inferido que o baixo teor de zinco da dieta basal (1,1 mg Zn / kg dieta) praticamente não afetou o crescimento dos ratos, enquanto a influência de adições crescente de ácido fítico teve um efeito de notável redução dos índices determinados, com exceção da digestibilidade da caseína, num período experimental de 32 dias.

ABSTRACT

Zinc is a mineral with a variety of biological functions such as catalyzing the activity of more than 300 enzymes, being a structural constituent of many proteins and as a regulator in the prevention of free radical formation. Due to this functional multiplicity, a deficiency of zinc becomes especially critical during rapid growth and development stages where the requirement is even greater, in cases of deficient feeding or in cases of low zinc bioavailability. In the sixties, when deficiency of this mineral was first discovered in humans, due to the high ingestion of phytic acid by Middle Eastern populations, researchers believed this to be an isolated case. However, in the nineties it was recognized as a malnutritional problem, occurring mainly in large countries. With the objective of determining the influence of the zinc source in the mineral mixture of the AIN-93G diet, and of additions of phytic acid on the growth and nutritional state of zinc in Wistar rats, the effect of supplementation with zinc carbonate (56% Zn) was studied, and also the addition of phytic acid in the form of myoinositol hexaphosphate (IP6), adding increasing amounts to the casein diet. The results show that despite the zinc carbonate (56% Zn) having been removed from the diet for 32 days, no significant ($p > 0.05$) difference was observed with respect to the growth indexes (diet consumption and weight gain) or nutritive value of the casein, as determined from the Protein Efficiency Ratio (PER). There was no difference in serum zinc concentration between that of the Control group of animals (AIN-93G diet, 12.2% casein) and that of the animals on the basal diet, without the source of zinc in the mineral mixture (ZnCO_3 , 56% Zn), zincemia being guaranteed by the 4.2 mg Zn / kg casein. Increasing additions of ZnCO_3 , 56% Zn, up to 129.2 mg zinc / kg basal diet for 8 days, after removing the mineral for 32 days, resulted in an increased weight gain, although only up to a limit of 86.7 mg Zn / kg diet, corresponding to a maximum pondered weight gain of 98.6 grams. Higher values for food efficiency were shown as from 33.1 mg Zn / kg diet, and higher values for the concentration of zinc in the animal serum were

shown with additions of from 65.4 to 129.2 mg Zn / kg diet. Increasing additions of phytic acid to the basal diet containing no ZnCO₃, 56% Zn in the mineral mixture, for a period of 32 days, led to constant reductions in the growth indexes (diet consumption and weight gain), in the nutritive value of the casein as determined by the net protein ratio (NPR) and protein efficiency ratio (PER), in the dietary nutrition value as determined by the food conversion ratio (FCR) and in the serum zinc concentration of the rats. The values for digestibility (apparent and corrected according to the aprotic diet) were unaffected by the increasing additions of phytate. From the results, it can be inferred that the low level of zinc in the basal diet (1.1 mg Zn / kg diet) showed practically no influence on the growth of the rats, whereas in an experimental period of 32 days, there was a notable effect in the reduction of the indexes determined, with the exception of that of casein digestibility, with increasing additions of phytic acid.

1 INTRODUÇÃO

Condições fisiológicas que especialmente aumentam os requerimentos de zinco em humanos como na fase de crescimento em crianças e adolescentes, durante a gestação, amamentação ou quando fatores externos se sobrepõem às estas necessidades como ingestão alimentar deficiente, doenças crônicas e infecciosas, são situações que particularmente predispõem a ocorrência de alterações bioquímicas ou funcionais da deficiência do zinco (LADITAN e ELTE, 1982). Pelo exposto fica claro a importância fisiológica do mineral e sua multiplicidade de funções como catalisador para a atividade de mais de 300 enzimas (McCALL et al., 2000), como constituinte estrutural de muitas proteínas e exercendo, provavelmente, função regulatória (FREDERICKSON, 2000) na prevenção à formação de radicais livres (MOCHEGANI e MUZZIOLI, 2000).

Em 1961 quando o grupo de estudos de Prasad descreveu a síndrome do nanismo nutricional adolescente característica em meninos do Oriente Médio (HAMBIDGE, 2000), foi identificado elevado conteúdo de ácido fítico naquelas dietas que quando associado ao zinco, reduzia sua biodisponibilidade. Em continuidade aos estudos, na década de 90 foi reconhecido que a deficiência marginal de zinco era comum e provavelmente um problema nutricional de ocorrência freqüente em países desenvolvidos (LÖNNERDALL, 2002). Desde então, estudos utilizando células, animais experimentais e humanos têm avançado significativamente o conhecimento dos efeitos do fitato sobre a biodisponibilidade do zinco em humanos.

O efeito do ácido fítico é devido à formação de complexos fortes e insolúveis com cátions bivalentes como Cu^{++} , Zn^{++} , Co^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} e Ca^{++} (OBERLEAS, 1973), complexação com proteínas (CHAMPAGNE e PHILLIPY, 1989) ou formação de complexos ternários proteína-metal-fitato (GRAF, 1983). Estes efeitos são amplamente estudados utilizando animais de laboratório como o rato, onde a primeira manifestação visível da deficiência de zinco é a diminuição da ingestão alimentar, seguindo-se de redução na atividade física e

predisposição a infecções (WAPNIR, 1990). Outros inibidores da absorção presentes nos alimentos são as fibras alimentares, polifenóis, cálcio e fósforo. Segue-se ainda o desenvolvimento de trabalhos em humanos para avaliar as conseqüências de uma baixa oferta e/ou biodisponibilidade do zinco. Os resultados são unânimes no que se refere a prejuízos no crescimento, maturação sexual e anemia, podendo as conseqüências ser classificadas como leves, moderadas ou graves (RINK e KIRCHNER, 2000; BAUM et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da suplementação com a fonte de zinco da mistura mineral ($ZnCO_3$, 56 % Zn) sobre o valor nutritivo de uma dieta basal AIN-93G (REEVES et al., 1993) com 12 % de proteína, inicialmente com a fonte do mineral omitida quando do preparo da mistura salina, sobre os índices de crescimento (ganho de peso e consumo de dieta), eficiência alimentar (Quociente de Conversão Alimentar), valor nutritivo da caseína (Digestibilidade Aparente, Digestibilidade Corrigida pela Dieta Aprotéica, Quociente de Eficiência Líquida da Caseína e Quociente de Eficiência da Caseína) e deposição sérica de zinco em ratos Wistar dos 30 aos 67 dias de idade, quando então, receberiam a quantidade de zinco preconizada por aquela formulação em adições até 129,2 mg Zn / kg de dieta. Ato contínuo foi adicionado ácido fítico à dieta basal, com a fonte de zinco removida, no preparo da mistura mineral, para estudar o efeito de adições até 33,1g de ácido fítico por kg de dieta, sobre os mesmos índices anteriormente relatados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ZINCO: FUNÇÕES ORGÂNICAS E METABOLISMO

A descoberta da deficiência de zinco (Zn) em humanos ocorreu em populações caracterizadas por dietas a base de alimentos capazes de reduzir a biodisponibilidade de elementos metálicos devido à alta concentração de fitato. Outra freqüente característica daquelas dietas era o baixo conteúdo protéico (WAPNIR, 2000). Os trabalhos de Prasad e colaboradores (1961) identificaram originalmente que a deficiência de zinco era o principal fator etiológico na síndrome do “nanismo nutricional adolescente” (baixo crescimento ponderal, sub-desenvolvimento sexual, lesões na pele e anemia) característica em meninos principalmente de países do Oriente Médio (HAMBIDGE, 2000) como Egito, coincidindo com o consumo de dietas com zinco de baixa disponibilidade devido ao elevado conteúdo de ácido fítico (WOOD, 2000). Acreditava-se que a deficiência neste nutriente era relativamente rara, até que na década de 90 foi reconhecido que a deficiência marginal de zinco era comum e provavelmente um problema nutricional de ocorrência freqüente em países desenvolvidos (LÖNNERDALL, 2002). Desde então, estudos desenvolvidos em células, com animais experimentais e com humanos têm avançado significativamente o conhecimento dos efeitos do fitato sobre a biodisponibilidade do zinco.

Quando a ingestão alimentar está no limite inferior da normalidade ou deficiente, condições fisiológicas que aumentam os requerimentos de zinco como fase de crescimento em crianças, adolescência, gestação ou amamentação e doenças crônicas, podem precipitar o aparecimento de alterações bioquímicas ou funcionais da deficiência do mineral. A restrição alimentar de zinco induz a um declínio nos níveis urinários, podendo ocorrer de 2 a 3 dias após o início da provisão insuficiente do mineral através da alimentação (KING et al., 2000). Crianças desnutridas (marasmo ou kwashiorkor) apresentaram níveis séricos de zinco muito baixos, na média de 40 a 70 $\mu\text{g} / \text{dL}$, quando comparadas a valores normais numa média de referência de 100 $\mu\text{g} / \text{dL}$ em crianças normais ou recuperadas. Dados experimentais equivalentes ao kwashiorkor-marásmico foi relatado em ratos

jovens recebendo dieta hipoprotéica (4 % de caseína) e hipoenergética. Aqueles animais apresentaram hipozincemia similar à de crianças com kwashiorkor (WAPNIR et al., 1985). Dados semelhantes foram encontrados no trabalho de Franz e colaboradores (1980) onde um nível de 7,5 % de proteína foi oferecido aos animais experimentais num período de 4 semanas com baixo conteúdo de zinco alimentar (1 a 3 mg / kg de dieta) e sem suplementação. Não foi observado ganho de peso, mas um acúmulo anormal de cobre, zinco e ferro no fígado dos animais. Crescimento adequado foi observado em dieta com 15 % de proteína e 50 mg de zinco / kg de dieta. Não foi observado melhora no status de zinco em ratos alimentados com 20 % de proteína ao invés de 10 %, oriundas tanto de isolado protéico de soja quanto de caseína, se o zinco inerente à fonte de nitrogênio fosse apenas provido por aquelas fontes protéicas (HARDIE-MUNCY e RASMUSSEN, 1979).

O zinco liga-se firmemente a proteínas na célula para desempenhar função catalítica, sendo requerido para a atividade de mais de 300 enzimas (McCALL et al., 2000) como um constituinte estrutural de muitas proteínas e, provavelmente, exerce função regulatória (FREDERICKSON, 2000) prevenindo a formação de radicais livres (MOCHEGANI e MUZZIOLI, 2000). O mineral exerce funções prevenindo a oxidação de forma indireta, não sendo um antioxidante propriamente dito, como a vitamina E (DiSILVESTRO, 2000). Devido à multiplicidade de funções, as manifestações da deficiência do mineral, que aparecem entre 2 a 5 semanas após início da restrição alimentar, podem variar desde aquelas inespecíficas e discretas como apetite diminuído e paladar alterado, até aspectos clínicos bem definidos, como no caso de diarreia, alopecia (desaparecimento dos pêlos e cabelos), dermatite (erupção cutânea facial), hipogonadismo ou retardo do crescimento. Casos severos resultam em danos ao sistema imune, um dos órgãos mais altamente proliferativos (RINK e KIRCHNER, 2000; BAUM et al., 2000) e aumento de infecções. Tais manifestações ocorrem em graus progressivos podendo ser leves, moderados ou graves. Utilizando-se camundongos como modelo experimental, demonstrou-se que 30 dias de ingestão de dieta deficiente em zinco, levou a perdas entre 30 e 80 % na capacidade de defesa do sistema imune (FRAKER et al., 2000).

Estudos com gestantes na Nigéria, Egito, Zaire e Malaia relatam baixas concentrações de zinco no plasma e cabelo, quando comparadas a mulheres de países desenvolvidos. Tais resultados são de grande importância, visto que as consequências podem acarretar baixo crescimento fetal e complicações durante o parto, aumentando a morbi-mortalidade em mães e neonatos (TAMARA e GOLDENBERG, 1996). Em infantes, a deficiência de zinco contribui para diminuição do crescimento, danos às funções imune e cognitiva e aumento da severidade e incidência de diarreia, malária e infecções respiratórias (BLACK, 1998). Em animais de laboratório, um sinal precoce da deficiência de zinco é a diminuição da ingestão alimentar, com a consequente redução do crescimento (SHAY e MANGIAN, 2000). Quando o zinco é administrado em quantidade inadequada para manter o crescimento ou o metabolismo celular, a redução na ingestão alimentar desempenha um mecanismo protetor para permitir a sobrevivência. Em ratos, os sinais da deficiência aparente não são muito evidentes, a menos que a dieta contenha níveis inferiores do mineral como 2 a 5 mg / kg de dieta (WAPNIR, 1990). O crescimento ocorre através da divisão celular e este processo requer DNA, RNA e síntese protéica. O zinco participa de uma grande variedade de processos celulares como co-fator para muitas enzimas e influencia a expressão gênica através de fatores de transcrição. O crescimento é regulado hormonalmente por vários sistemas (Figura 1), mas a principal influência sobre o crescimento somático é provida pelo hormônio do crescimento (GH) e pela insulina como fator de crescimento do tipo 1 (IGF-1). O GH e IGF-1 são afetados pela deficiência de zinco, mas estas interferências não explicam completamente a inibição do crescimento (MacDONALD, 2000).

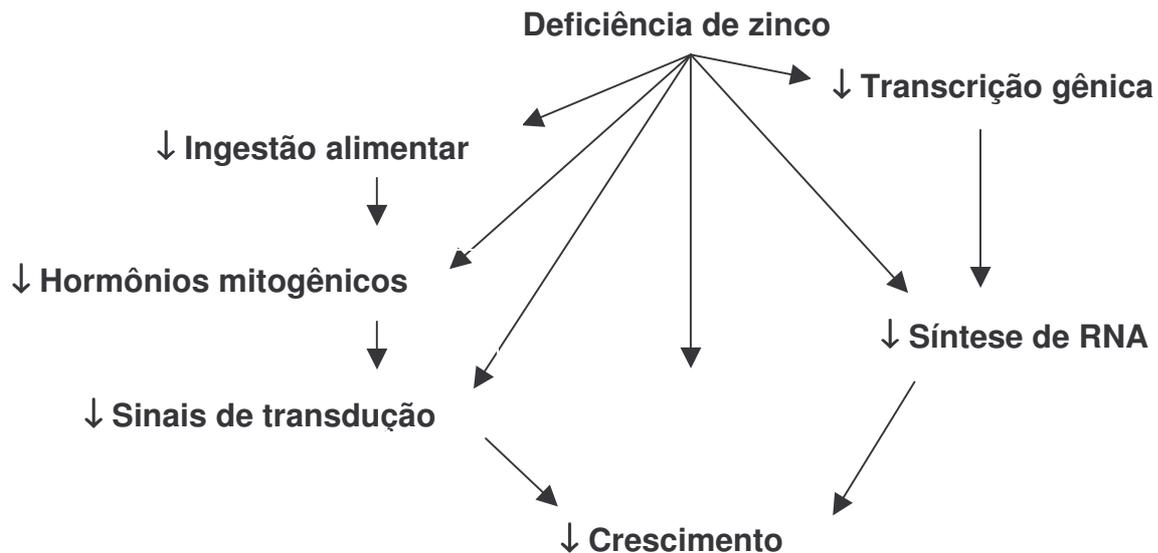


Figura 1. Efeitos da deficiência de zinco sobre processos metabólicos associados com o crescimento (MacDONALD, 2000).

2.2 INDICADORES BIOQUÍMICOS PARA MENSURAR O STATUS DE ZINCO E CONTROLE DA ABSORÇÃO CORPORAL

O corpo humano contém entre 1,5 e 2,5 g de zinco, representando no adulto entre 0,002 e 0,003 % (WAPNIR, 1990). É primariamente um íon intracelular: 80% no citosol e o restante no núcleo. Maiores concentrações corporais estão presentes na musculatura esquelética (57%), ossos (29%), pele (6%) e fígado (5%), mas secreções e fluídos corporais também contêm zinco. A concentração de zinco no soro humano é de 0,5 a 1,2 $\mu\text{g} / \text{mL}$, sendo 0,7 $\mu\text{g} / \text{mL}$ o ponto de corte para status de zinco na literatura (US..., 2000). Em ratos, o nível aproximado do cátion no soro ou plasma é 0,8 $\mu\text{g} / \text{mL}$, ou 0,5 a 1,2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (FICK et al., 1980), sendo portanto, muito semelhante às concentrações humanas. Muitos tecidos mantêm os níveis de zinco durante período de alimentação com dietas deficientes no mineral, a exceção do tecido ósseo, mucosa intestinal e soro onde decaem significativamente, apresentando-se adequados para avaliação quantitativa de zinco (HUBER e GERSHOFF, 1973). A concentração de zinco no soro é um parâmetro

frequentemente utilizado, porém pode ser pouco específico caso existam alterações na concentração das proteínas séricas (pós-cirurgias ou em atletas durante treinamento). A determinação da concentração de zinco no cabelo ou leucócitos são parâmetros igualmente utilizados (COUZY et al., 1998). Embora a avaliação do zinco plasmático seja um critério valioso e essencial para caracterização do status do mineral (BAUM et al., 2000), isoladamente é inadequado, pois há vários fatores fisiológicos que afetam a concentração de zinco no plasma (O'DELL, 2000). A redução da concentração do Zn na membrana da célula vermelha é associada com elevada fragilidade osmótica (hemólise) dos eritrócitos em ratos (ROTH e KIRCHGESSNER, 1991) e tem sido estudada como uma forma de mensurar o status do mineral em humanos (WOODHOUSE et al., 1998), sendo prontamente revertida "in vivo" através da repleção alimentar, mas não por tratamento "in vitro" (O'DELL et al., 1987).

O status de zinco, entendido como ingestão em longo prazo, é de difícil avaliação em humanos, especialmente em idosos (COUZY et al., 1998), visto que a idade pode também afetar a absorção do mineral de origem alimentar (LÖNNERDAL, 2000). No estudo de Chandra (2002) com indivíduos entre 50 e 65 anos com deficiência em determinadas vitaminas e minerais, incluindo ferro e zinco, a condição foi restabelecida em 6 meses recebendo doses fisiológicas dos nutrientes. Os indivíduos foram classificados como deficientes se o nível sanguíneo dos nutrientes em estudo estivesse abaixo de 95 % dos limites de confiança padrões normais de referência.

O rato é o modelo animal usado em muitos estudos sobre os locais de absorção do zinco, que podem ocorrer no duodeno, jejuno e íleo, sem diferenças significativas (SAHAGIAN et al., 1967; WAPNIR e STIEL, 1986). Outros investigadores têm demonstrado que o aumento da razão de absorção do zinco é nas partes mais distais do intestino (ANTONSON et al., 1979) como o ceco (WAPNIR, 1990). Este fato pode ser decorrente da grande ingestão de minerais, bem como de menor eficiência absorptiva no intestino delgado (LOPEZ et al., 1998). A absorção do zinco aumenta quando seus níveis corporais começam a diminuir e vice-versa. Wada e colaboradores (1985) encontraram em estudos com humanos, que a extensão da absorção do zinco alimentar é

relativamente alta (50%) quando baixos níveis de zinco (5,5 mg / dia) são consumidos. Esta absorção pode diminuir para 25 % quando altos níveis do mineral são consumidos (16,5 mg / dia). Animais deficientes em zinco podem absorver quase 100 % do zinco alimentar; no homem a absorção varia entre 6 e 40 %. Coppen e Davies (1987) encontraram que com o aumento do zinco alimentar de 5 para 40 mg / kg, a absorção fracional do mineral diminuiu, ao passo que a quantidade de zinco absorvido aumentou linearmente nos níveis alimentares maiores, sendo compatíveis com processos de difusão. A absorção do Zn tem sido mostrada por consistir de um componente específico saturável mediado por carreador, e um componente não-específico, não-saturável mediado por difusão (LÖNNERDAL, 2000).

2.3 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO COM O ZINCO: A IMPORTÂNCIA DA METALOTIONEÍNA

Metalotioneína (MT) é a denominação dada para proteínas pequenas, com média de peso molecular entre 6 e 7 kDa. Liga-se a íons zinco e cobre, e a metais pesados não-nutritivos, como o cádmio (PEARCE et al., 2000) e mercúrio (CHANDRA, 1984) que possam ligar nos grupos sulfidril de outras proteínas vitais do corpo, evitando assim danos importantes e podendo atuar como um agente de detoxificação. Dos seus resíduos de aminoácidos, de 23 a 33% são compostos cisteinil que mantém a forma reduzida de cisteína, sem ligações dissulfídicas. Esta característica confere à molécula uma alta capacidade de ligação para com metais pesados (7 a 12 átomos por molécula). Suas apoformas, isto é, sem cátions ligados, são chamadas tioneínas (T). A MT atua como uma forma de reserva (Figura 2) de zinco e cobre (MARET, 2000), ligando-se a estes íons quando houver consumo de grande quantidade e/ou possivelmente níveis tóxicos dos metais. Níveis elevados de zinco, bem como cobre e mercúrio, estimulam a síntese de metalotioneína no intestino delgado. A enzima em níveis elevados serve como um depósito para ligação com o zinco consumido subsequente. A absorção do zinco, no trabalho de Starcher e colaboradores (1980) foi mostrada ser inversamente correlacionada com níveis de MT intestinal se a quantidade de zinco excedesse níveis fisiológicos. A MT induzida poderia formar uma barreira prejudicando a absorção do mineral e controlar sua passagem para a circulação (RICHARDS e COUSINS, 1976_a).

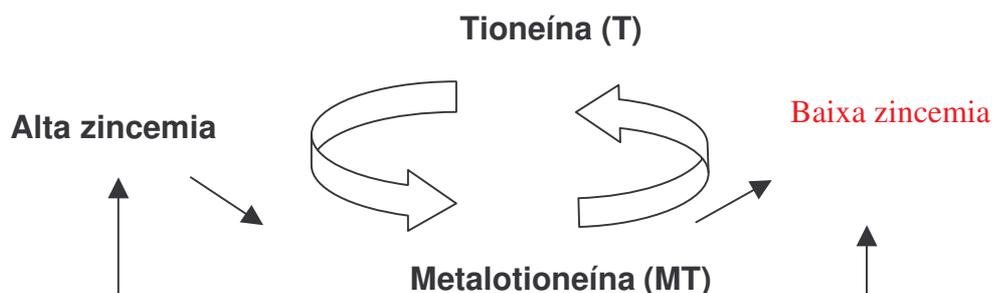


Figura 2 Função da Metalotioneína / Tioneína como um sistema homeostático para o zinco. À esquerda: um aumento na quantidade de zinco disponível induz a síntese de Tioneína através da ação de fatores de transcrição dependentes de zinco, levando à formação de Metalotioneína. À direita: Se a quantidade de zinco disponível estiver baixa e se a necessidade para incorporação nas apoformas de proteínas de zinco aumentar, o mineral será liberado da Metalotioneína e a Tioneína será formada (MARET, 2000).

2.4 FONTES ALIMENTARES DE ZINCO

As principais fontes alimentares de zinco são as carnes bovina, de frango e de peixe, camarão, ostras, fígado, grãos integrais, castanhas, cereais, legumes e tubérculos, apresentando variação conforme a concentração do mineral no solo (MAHAN e STUMP, 1998). Frutas, hortaliças e outros vegetais em geral são fontes pobres em zinco. Ostras contêm a metade de seu conteúdo total de zinco ligado a metaloenzimas, enquanto o restante associa-se a substâncias de baixo peso molecular (SOLOMONS e COUSINS, 1984). Tal característica torna este tipo de marisco um alimento de notável importância. Produtos pouco refinados, como farinha de trigo integral, fornecem de 4 a 5 vezes mais minerais que a farinha de trigo refinada. De fato, os minerais são fortemente associados com a parede celular das plantas, podendo ser liberados através da quebra microbiana dos polissacarídeos complexos no intestino (LOPEZ et al., 1998). Cereais constituem fontes razoavelmente boas em zinco, porém de menor biodisponibilidade quando comparado ao zinco proveniente de produtos de origem animal.

2.5 BIODISPONIBILIDADE DO ZINCO: ELEMENTOS QUE INTERFEREM NA ABSORÇÃO DO MINERAL

A biodisponibilidade é relatada pela fração da quantidade total de um nutriente ingerido que é absorvível e poderá, posteriormente, ser metabolizada ou utilizada no organismo. No caso de elementos traço, inúmeros fatores influenciam a proporção do nutriente que permanece biologicamente disponível ao organismo (FORBES e ERDMAN, 1983). A interação do zinco com outros nutrientes da alimentação pode aumentar ou diminuir sua absorção. Exemplos de inibidores da absorção presentes nos alimentos são as fibras alimentares, os polifenóis, cálcio, fósforo e o ácido fítico. Em 1960, O'Dell e Savage estudaram o efeito da adição do fitato à caseína numa concentração semelhante à da proteína de soja, verificando que o crescimento de frangos reduzira como para aqueles alimentados com a proteína de soja. A adição de zinco à dieta eliminou este efeito inibitório do crescimento, sugerindo que era devido à baixa biodisponibilidade do zinco. Outros estudos com porcos e ratos reproduziram esta conclusão.

A barreira física conferida pelas fibras, hidratadas ou não (hemicelulose, celulose, lignina, etc.), podem limitar posteriormente a quantidade de um certo mineral que poderia entrar no enterócito e ser liberado na circulação sanguínea através da membrana basolateral (SOLOMONS e COUSINS, 1984); tal resultado corrobora os resultados do trabalho de Kelsay e colaboradores (1979), onde encontraram efeitos negativos significantes de fibras advindas de vegetais e frutas, embora Turnlund e colaboradores (1982) não tenham observado efeito inibitório da α -celulose, um componente isolado da fibra sobre a absorção do zinco. O resultado principal do estudo de Lopez e colaboradores (1998) em ratos mostrou que a fermentação cecal de carboidratos complexos (amido resistente) contrabalançou o efeito inibitório do ácido fítico, pelo aumento da solubilidade dos minerais em estudo (ferro, zinco e cobre). Os polissacarídeos que compõem a fibra alimentar estão associados a outras substâncias não hidrolisadas pelas enzimas digestivas, onde o amido resistente é uma delas (VAN SOEST e WINE, 1988). Este é definido como a fração do amido que não é digerida no intestino delgado e sua faixa de

absorção varia entre 3 a 20 %. O efeito de carboidratos fermentáveis e do ácido fítico sobre a biodisponibilidade mineral é parcialmente controverso devido à microflora digestiva poder expressar uma atividade de fitase.

A fonte protéica utilizada, analisada juntamente com a composição global das dietas, pode também influenciar a absorção do zinco. Estudo de Davidsson e colaboradores (1996) mostrou que alguns isolados protéicos, tal como albumina do soro bovino e isolado protéico de soja parcialmente desfitinizado inibiram a absorção do mineral, ao contrário da caseína que não se mostrou interferente. Por outro lado, o processamento da soja em países desenvolvidos, visando obter uma versão desfitinizada do produto, produz isolados protéicos de alto valor nutricional (WAPNIR, 1990).

O íon ferroso inibe a absorção do zinco por competição nos locais de absorção das células intestinais quando a razão molar do ferro for 2 ou 3 vezes maior que a do zinco (SOLOMONS e JACOB, 1979). Christian e colaboradores, em 2001, corroboram a informação com o resultado de seu estudo onde a razão molar entre ferro e zinco de 2:1 já mostrou um impacto mensurável adverso sobre o status de zinco em humanos. A biodisponibilidade do zinco, bem como para outros minerais, depende da eficiência líquida de fatores alimentares, os quais promovem ou inibem sua absorção e utilização (DAVIDSSON et al., 1996). Além do ferro, possivelmente o cálcio quando consumido como suplemento represente outra forma de inibidor da absorção do mineral (KREBS, 2000; PÉREZ-LLAMAS et al., 1996) podendo potencializar o efeito inibitório do ácido fítico sobre o zinco. Morris e Ellis (1980) num estudo sobre a influência do cálcio sobre a diminuição da absorção do zinco pelo ácido fítico, encontraram que a um nível basal de cálcio (0,75 %) a razão ácido fítico : zinco de 12 : 1 não afetou o crescimento de ratos, mas a um nível maior de cálcio (1,75 %) com razão molar para ácido fítico : zinco de 6 : 1 afetou o crescimento. Desta forma, os autores concluíram que o cálcio afeta a disponibilidade do zinco e que a razão molar ácido fítico : zinco que afeta a absorção do zinco é dependente da ingestão alimentar de cálcio e zinco.

2.6 RECOMENDAÇÃO NUTRICIONAL PARA O ZINCO E INTERFERÊNCIAS DO ÁCIDO FÍTICO

A recomendação nutricional de zinco para humanos varia de 11 a 15 mg / dia (RDA, 1989). Em roedores, a concentração mínima requerida do mineral na dieta é de 30 mg / kg (REEVES et al., 1993). Zúñiga e colaboradores (2001) recomendam para animais adultos e em crescimento 12 mg / Kg de dieta; para fêmeas em lactação e gestantes, 25 mg / Kg dieta.

O fitato naturalmente presente nas fontes alimentares, bem como o fitato adicionado a dietas purificadas diminuem a homeostase do zinco (HARLAND e MORRIS, 1995), tendo sido implicado como o grande responsável pela má-absorção do zinco desde o relato inicial da síndrome em iranianos por Prasad e colaboradores em 1961. O ácido fítico é comumente denominado ácido hexafosfórico mio-inositol (IP6) ou 1,2,3,4,5,6 hexaquis (diidrogênio fosfato) mio-inositol (INTERNATIONAL..., 1968). A molécula do ácido fítico está apresentada na figura 3, conforme a estrutura de Anderson citada por Kratzer e Vohra (1986). É um importante componente das sementes de plantas oleaginosas, legumes e cereais (LOPEZ et al., 1998), tendo diversas funções no estoque de fósforo (LOPEZ et al., 2000) e cátions ou proteção contra danos oxidativos durante a dormência ou germinação (KAMAO et al., 2000). Os seis grupamentos fosfato do ácido fítico podem formar complexos fortes e insolúveis com cátions, tal como Cu^{++} , Zn^{++} , Co^{++} , Mn^{++} , Fe^{+++} , e Ca^{++} , (OBERLEAS, 1973) não apenas com uma ou duas moléculas de fosfato do ácido fítico, mas também entre duas moléculas de ácido fítico (Figura 4); com proteínas (CHAMPAGNE e PHILLIPPY, 1989) ou também formar complexos ternários proteína-metal-fitato ilustrado na figura 5 (GRAF, 1983), devido a suas cargas negativas. O ácido fítico contém seis moléculas de fosfato para cada molécula de inositol.

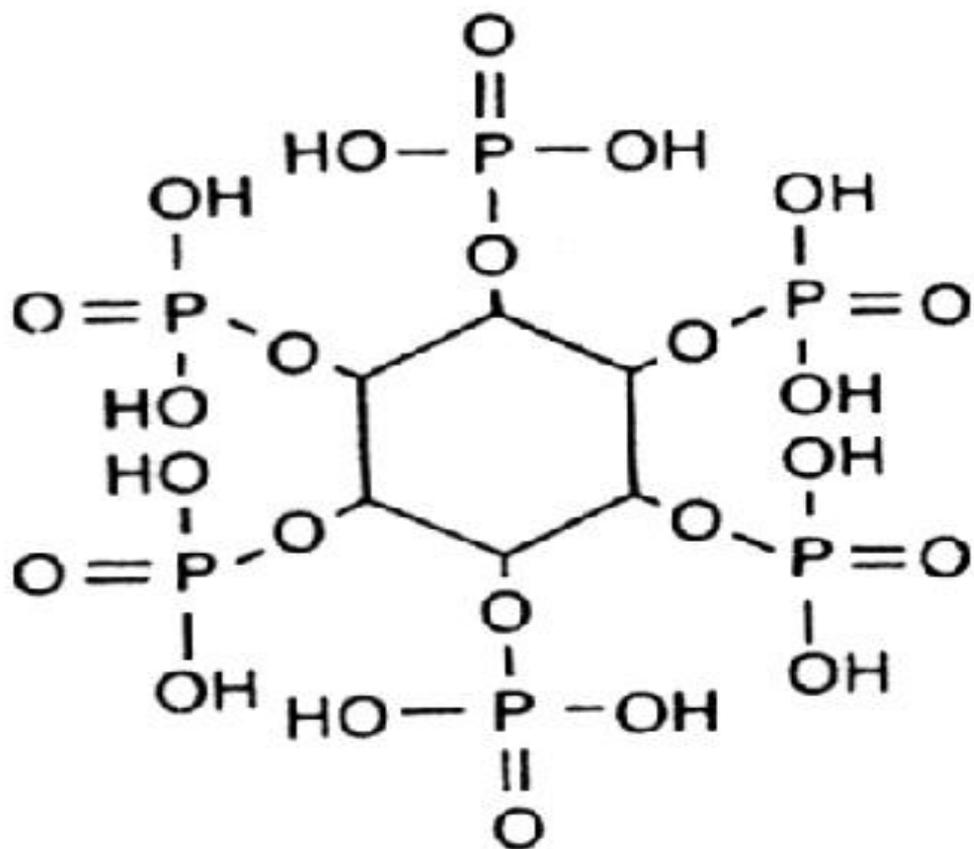


Figura 3. Estrutura da molécula de ácido fólico (KRATZER e VOHRA, 1986).

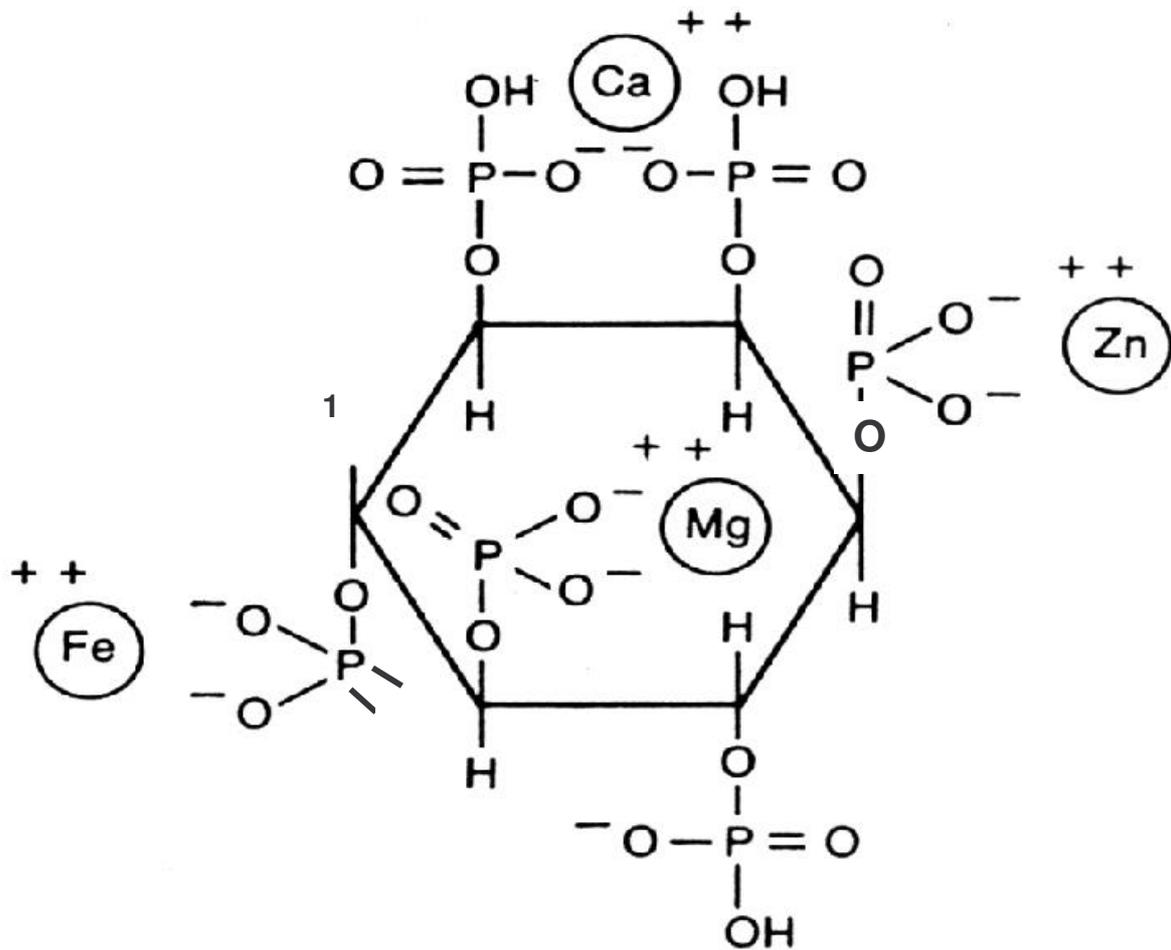


Figura 4. Complexação de metais na molécula de ácido fítico nos fosfatos presentes na mesma molécula ou entre moléculas de fosfato, conforme estrutura sugerida por Erdman, citado por Kratzer e Vohra (1986).

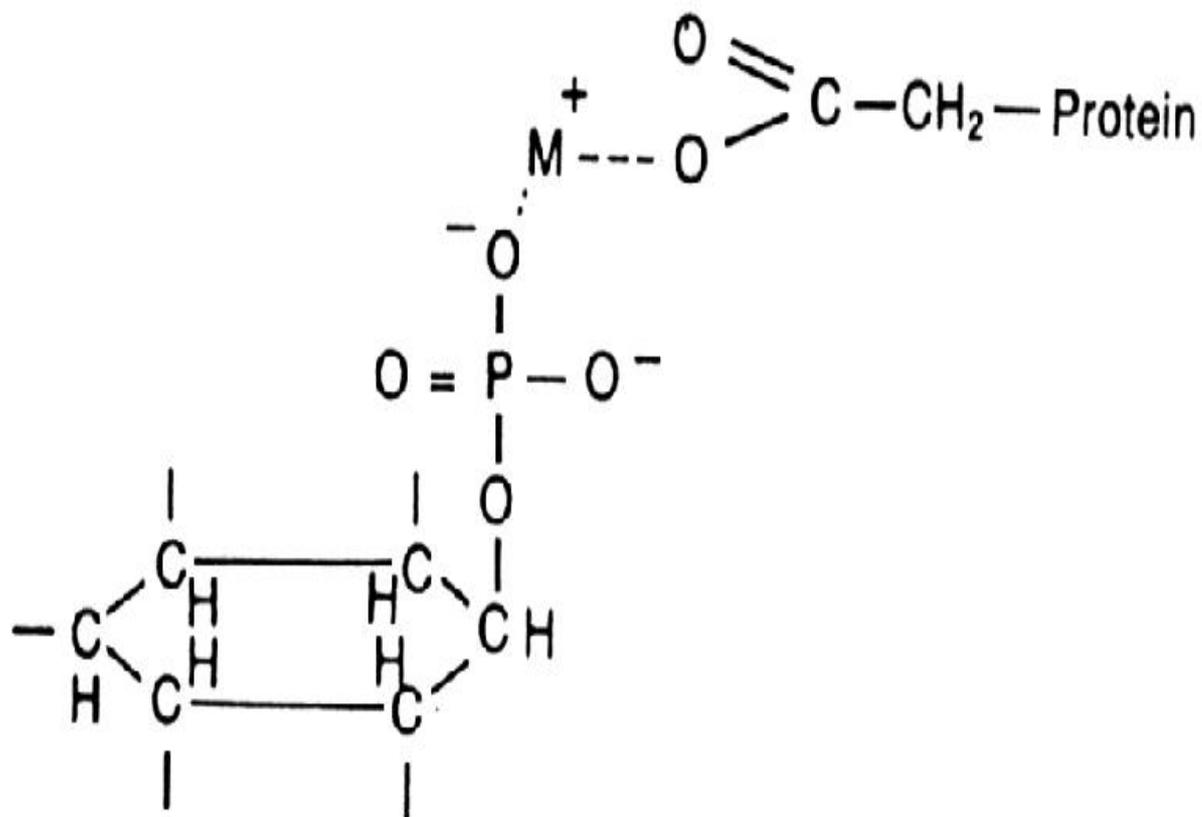


Figura 5. Representação da estrutura do complexo ternário proteína-metal-folato, onde o M^+ representa o metal ligado à molécula do ácido fólico (GRAF, 1983).

Embora animais como o rato, apresentem fitase em seu intestino (CHURELLA e VIVIAN, 1989) capaz de hidrolisar parcialmente os resíduos fosfato em várias posições do anel inositol e liberar fosfatos inorgânicos básicos mais biodisponíveis (KRATZER e VOHRA, 1986), espécies superiores perderam importante atividade gastrintestinal da fitase, sendo os minerais ligados ao fitato advindos da dieta bem como complexos de mineral e fitato, excretados nas fezes (LÖNNERDAL, 2000). Três fontes de fitase são encontradas no trato gastrintestinal: fitase das plantas, fitase da microflora intestinal e fitase da mucosa intestinal. A quebra do ácido fítico no estômago e intestino delgado de humanos é influenciada principalmente pelo primeiro tipo citado, uma vez que a atividade da fitase intestinal é cerca de 30 vezes menos ativa que em ratos (IQBAL et al., 1994).

Muitos autores sugerem que a absorção do zinco é inversamente correlacionada à concentração de fitato na dieta. Desta forma, qualquer redução no conteúdo de fitato alimentar provavelmente resultaria no melhoramento da absorção do zinco. O fitato presente em altas concentrações em alimentos ricos em fibras (cereais, legumes e vegetais folhosos) liga-se ao zinco e também ao ferro, formando complexos insolúveis e diminuindo sua digestibilidade e absorção (BRODY, 1994). O conteúdo de fitato da dieta típica dos Estados Unidos por exemplo, não é suficientemente elevado, a ponto de prejudicar a absorção do zinco alimentar; entretanto, em dietas consumidas por populações do Oriente Médio, pode reduzir a absorção abaixo de 20 % . Importante consideração que deve ser feita refere-se à razão molar fitato:zinco (MORRIS e ELLIS, 1980) proposta por Oberleas e Harland (1981) como um indicador da biodisponibilidade do mineral. Sob condições experimentais, acima de 85 % de zinco foi prontamente insolubilizado a pH 6,5 se a razão molar de fitato:zinco fosse maior que 5:1 (DAVIES e OLPIN, 1979). Em populações, é desejável que esta razão não exceda 10:1, visto que valores iguais ou maiores que 20 podem estar associados a manifestações clínicas ou químicas da deficiência do cátion.

O conteúdo de ácido fítico pode ser reduzido por processos como maceração (OLIVEIRA et al., 2001), germinação, fermentação (BEAL e

MEHTA, 1985) e cozimento que promovem a ativação da fitase (BULLOCK et al., 1993; OLOGHOBO e FETUGA, 1984), além do tratamento enzimático com a própria enzima (LÖNNERDAL et al., 1999) e precipitação com sais férricos. Segundo Domene (1996), é a partir da fitase naturalmente presente nos grãos e farelos que pode surgir a mais importante forma de diminuição do conteúdo de ácido fítico. Dos métodos de processamento registrados na literatura, apenas os que envolvem condições para o seu desenvolvimento e ação resultam em significativa redução do IP6. Desta forma, a maceração, a germinação e a fermentação são apontadas como formas efetivas de hidrólise do ácido fítico. O zinco presente em pães fermentados feitos com farinha de trigo integral, tem maior biodisponibilidade comparado a preparações não levedadas. Isto se deve provavelmente à hidrólise sofrida pelos grupamentos fosfato do ácido fítico presente na farinha, através da ação das enzimas produzidas durante o processo (BRODY, 1994). A fitase hidroliza o ácido fítico (TÜRK et al., 2000) para produzir fosfato inorgânico e mio-inositol via fosfatos intermediários de mio-inositol (IP-5, IP-4, IP-3, IP-2 e IP-1). A extensão da hidrólise depende do estágio de germinação, pH, umidade, temperatura, solubilidade do fitato e presença de inibidores. Apenas os maiores inositóis fosfato (IP-5 e IP-6) são capazes de inibir a absorção do zinco e ferro (GIBSON et al., 1998).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito do zinco e do ácido fólico no crescimento e concentração sérica de Zn de ratos Wistar recém-desmamados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar o efeito da remoção da fonte de zinco da mistura salina (ZnCO_3 , 56 % Zn) da dieta AIN-93G, o que daria origem à dieta basal, sobre o consumo de dieta, ganho de peso e concentração do zinco sérico durante 32 dias, além do valor nutritivo da caseína através do cálculo da Digestibilidade Aparente (DA), Digestibilidade Corrigida pela Dieta Aprotéica (DCDA), Quociente de Eficiência Líquida da Caseína (NPR), Quociente de Eficiência da Caseína (PER) e valor nutritivo da dieta através do índice Quociente de Conversão Alimentar (QCA).
- ✓ Adicionar o ZnCO_3 , 56 % Zn, à dieta basal em concentrações de até 4 vezes o teor recomendado pela dieta AIN-93G, com vistas a verificar o possível aumento do zinco no soro dos ratos, bem como o ganho de peso e o consumo de dieta durante oito dias.
- ✓ Adicionar ácido fólico (hexafosfato de mioinositol, solução 40 %) à dieta basal em adições crescentes até 33,1 g / kg de dieta, durante 32 dias, para verificar o efeito sobre os índices consumo de dieta, ganho de peso, concentração de zinco sérico dos ratos, Digestibilidade Aparente (DA), Digestibilidade Corrigida pela Dieta Aprotéica (DCDA), Quociente de Eficiência Líquida da Caseína (NPR), Quociente de Eficiência da Caseína (PER) e valor nutritivo da dieta através do Quociente de Conversão Alimentar (QCA).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Animais para experimentação

Devido à capacidade de espaço físico do Laboratório de Ensaio Biológicos (LEB), o trabalho experimental foi dividido em dois ensaios biológicos. Foram utilizados nos Ensaio Biológicos I e II, 49 ratos machos albinos SPF da linhagem Wistar, recém desmamados, com idade entre 21-23 dias. Os animais eram provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O peso inicial médio dos animais na chegada do Ensaio Biológico I foi de $64,1 \pm 7,3$ g e dos animais do Ensaio Biológico II, $53,7 \pm 6,7$ g. Os ratos, logo que chegaram ao LEB foram submetidos a um período de 8 dias de aclimação ao ambiente em gaiolas de crescimento individuais de aço inoxidável, sendo oferecido dieta não purificada de fórmula fechada (Nuvital®). Após este período foi verificado novamente o peso médio dos animais que foi de $121,2 \pm 11,5$ g no Ensaio Biológico I e $83,3 \pm 8,6$ g no Ensaio Biológico II.

As condições ambientais do Laboratório de Ensaio Biológicos eram temperatura de $22 \pm 2^{\circ}$ C, umidade relativa do ar entre 50 e 60 % e ciclo para claro e escuro com alternância automática de 12 horas. O protocolo do estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP – Protocolo 525-1, sendo o trabalho conduzido dentro dos padrões éticos internacionais que visam eliminar todo sofrimento desnecessário ao ser vivo.

4.1.2 Dietas experimentais

As dietas foram preparadas segundo a formulação do American Institute of Nutrition para a dieta AIN-93G, com modificação do conteúdo protéico para 12 % (GOENA et al., 1989). A fonte de zinco utilizada no preparo da mistura mineral foi carbonato de zinco proveniente da marca VETEC® com teor de zinco de 56 % (ZnCO_3 , 56 % Zn). No ensaio Biológico I, o ZnCO_3 , 56 % Zn, foi adicionado à mistura salina das dietas oferecidas aos tratamentos (exceto para os grupos Controle e Aprotéico) somente a partir do 33º dia de ensaio. Para tais adições, foi considerado o teor recomendado para a mistura mineral da dieta AIN-93G, de 1,65g de carbonato de zinco / kg de mistura salina. Os tratamentos partiram de adições de um grupo que teve o mineral removido da mistura salina (0 g de carbonato de zinco / kg mistura salina), até 4 vezes aquela recomendação (6,6 g de carbonato de zinco / kg mistura salina). Os grupos ficaram constituídos (Figura 6) pelo **Grupo Controle (C)**, n = 7, que recebeu a dieta AIN-93G contendo 12,2 % de proteína, com a mistura salina íntegra desde o início do ensaio fornecendo 32,2 mg de zinco / kg de dieta, e os demais animais, n = 35, chamados de **Controle sem ZnCO_3 , 56 % Zn**, que receberam dieta AIN-93G contendo 12,2 % de proteína, cujo ZnCO_3 , 56 % Zn, fora removido quando da elaboração da mistura salina, durante os primeiros 32 dias de ensaio biológico. O teor médio de umidade das dietas foi de $7,4 \pm 0,1$ %.

O principal objetivo da oferta da dieta basal aos animais do grupo Controle sem ZnCO_3 , 56 % Zn, (Tabela 1) durante 32 dias, e após as adições em concentrações crescentes do mineral por 8 dias, era verificar a resposta da ausência da fonte do mineral da mistura salina no zinco sérico dos ratos, ganho de peso e eficiência protéica e alimentar, para então correlacionar os dados quando das adições crescentes do ZnCO_3 , 56 % Zn, nos mesmos índices estudados. É digno de nota que a formulação da dieta AIN-93G foi recomendada pelo “American Institute of Nutrition” visando o suprimento adequado de qualquer nutriente aos roedores.

Os tratamentos (n=7) foram denominados de acordo com a concentração de zinco que receberam após 32 dias, sendo a identificação numérica

arredondada por questão de praticidade, ficando assim caracterizados: **Grupo 0 Zn** - dieta AIN-93G sem adição de ZnCO_3 , 56 % Zn, à mistura mineral; **Grupo 16 Zn** - dieta AIN-93G com adição de 0,825 g de carbonato de zinco / kg mistura mineral, representando 16,1 mg de zinco / kg dieta; **Grupo 32 Zn** - dieta AIN-93G com adição de 1,65 g de carbonato de zinco / kg mistura mineral, representando 32,2mg de zinco / kg dieta, semelhante ao grupo Controle; **Grupo 64 Zn** - dieta AIN-93G com adição de 3,30 g de carbonato de zinco / kg mistura mineral, representando 64,4 mg de zinco / kg dieta; e **Grupo 128 Zn** - dieta AIN-93G com adição de 6,60 g de carbonato de zinco / kg mistura mineral, representando 128,8mg de zinco / kg dieta. Para fins de correção dos dados de NPR e Digestibilidade, um **Grupo Aprotéico** foi monitorado por 14 dias, onde os 4 primeiros eram período de adaptação à dieta e os 10 seguintes o período experimental. A proteína da dieta aprotéica foi total e proporcionalmente substituída por amido, amido dextrinizado e sacarose. A caseína comercial utilizada foi M.CASSAB[®] (60 mesh) com teor de proteína bruta de 81,5 % e 10,0 % de teor de umidade. As dietas experimentais eram isoprotéicas ($12,2 \pm 0,2$ % e $12,4 \pm 0,2$ % para os Ensaio Biológicos I e II, respectivamente) e isoenergéticas (394,8 Kcal / 100 g de dieta). Devido ao fato de o valor energético ter sido determinado por cálculo matemático, o valor não apresentou desvio-padrão.

O preparo das dietas iniciou-se com a pesagem e mistura gradativa dos ingredientes que representavam menor quantidade, seguindo-se pelos de maior quantidade. Misturou-se muito bem manualmente sendo acrescentado por último o óleo de soja. Ato contínuo, seguiu-se criteriosa homogeneização da dieta e peneiramento no mínimo 6 vezes em peneira plástica (30 mesh), previamente descontaminada com ácido nítrico 10 % e água deionizada.

Tabela 1. Formulação da dieta basal sem a fonte de zinco da mistura mineral (ZnCO_3 , 56 % Zn) oferecida aos ratos Wistar nos 32 dias dos Ensaio Biológicos I e II, exceto para os grupos Controle* e Aprotéico*.

Ingrediente	grama / kg dieta
Caseína (81,5 %)	150,000
Amido de milho	430,000
Amido dextrinizado	140,074
Sacarose	109,412
Óleo de soja	70,000
Celulose	50,000
Mistura mineral sem ZnCO_3 , 56 % Zn	35,000
Mistura vitamínica	10,000
Cistina	3,000
Bitartarato de Colina	2,500
t- Butylhydroquinona	0,014
TOTAL	1 kg de dieta

* Animais que receberam a dieta basal com a mistura mineral íntegra.

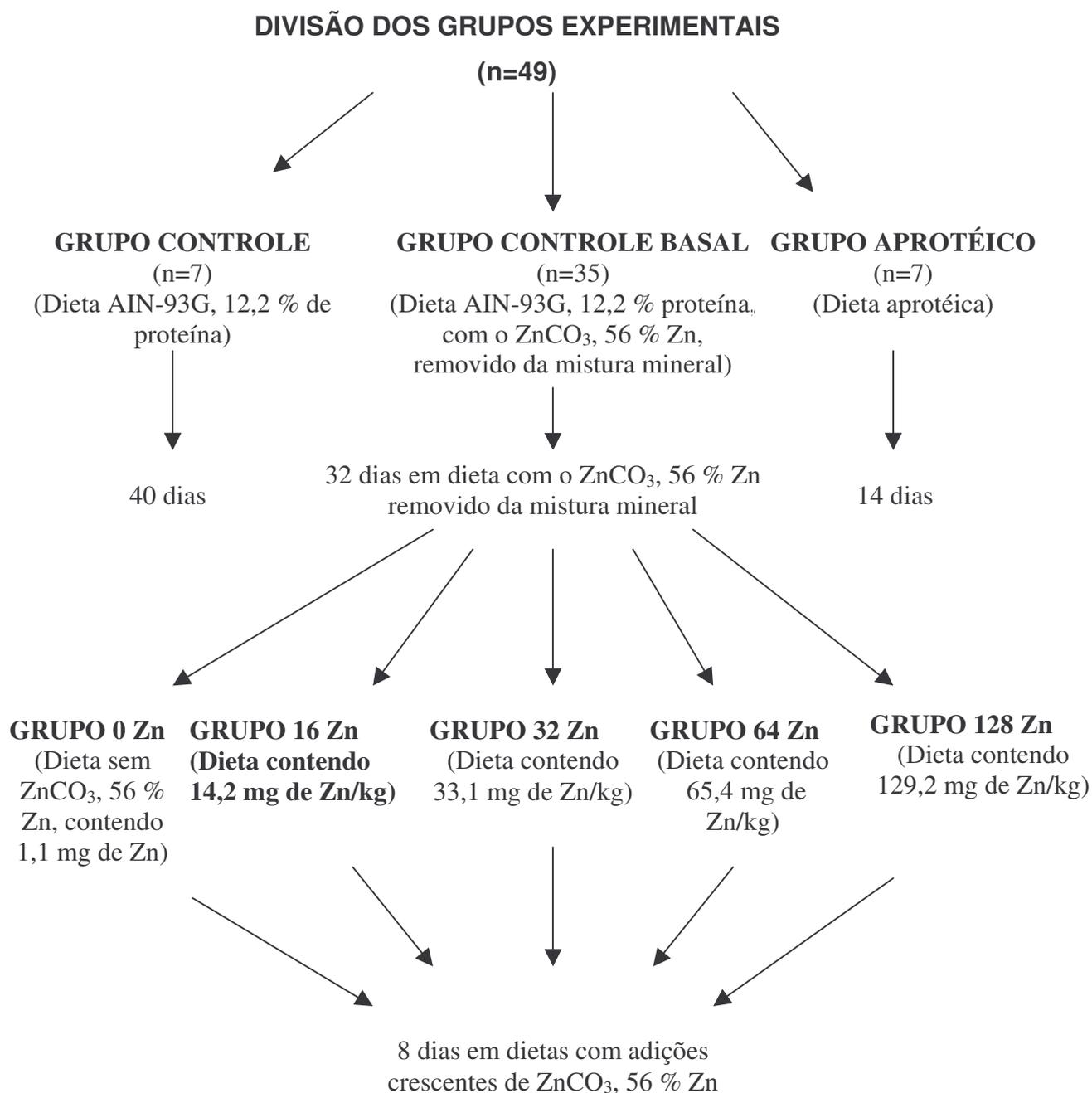


Figura 6. Divisão dos grupos experimentais e tempo de alimentação dos ratos com as respectivas dietas durante os 40 dias de duração do Ensaio Biológico I, incluindo período de adaptação e experimental propriamente dito.

A mesma dieta do Ensaio Biológico I foi preparada para o Ensaio Biológico II (Tabela 1), porém adicionada de ácido fítico nas respectivas concentrações desde o início do experimento. O ácido fítico utilizado era

solução 40 % marca Aldrich Chemical Company[®], na forma de hexa-fosfato de mioinositol. A adição do mesmo às dietas experimentais, em relação à quantidade de proteína da dieta, levou em consideração a densidade de 1,282 do ácido para fins de cálculo. Como parâmetro para as adições, levou-se em consideração os 14,7 mg de ácido fítico presentes em 1 g de feijão cru, encontrados anteriormente na determinação em cultivar IAC-Carioca do feijão-comum *Phaseolus vulgaris*, a partir da segunda maior adição de fitato por 100 gramas de caseína, utilizada no trabalho de Oliveira e colaboradores (2003). Foi usado o feijão como referência para o teor de fitato, por ser uma leguminosa amplamente consumida pela população brasileira e por ser rica em fitato.

Os tratamentos do Ensaio Biológico II ficaram assim constituídos: **Grupo Controle (C)** - dieta AIN-93G com a mistura salina integral desde o início do ensaio e sem adição de ácido fítico; **Grupo 0 AF** - dieta basal sem adição de ácido fítico; **Grupo 4 AF** - dieta basal com adição de 8,3 g de ácido fítico / kg dieta (20,7 mL de solução 40%); **Grupo 8 AF** - dieta basal com adição de 16,5 g de ácido fítico / kg dieta (41,2 mL de solução 40 %); **Grupo 12 AF** - dieta basal com adição de 24,8 g de ácido fítico / kg dieta (62 mL de solução 40 %); **Grupo 16 AF** - dieta basal com adição de 33,1 g de ácido fítico / kg dieta (82,7 mL de solução 40%). Quando das adições de ácido fítico, as dietas foram criteriosamente homogeneizadas e peneiradas pelo menos 6 vezes. Para fins de correção de dados de NPR e Digestibilidade, um **Grupo Aprotéico** foi monitorado por 14 dias (4 dias de adaptação e 10 dias experimentais), onde a proteína da dieta foi total e proporcionalmente substituída por amido, amido dextrinizado e sacarose.

4.1.3 Lavagem dos utensílios e vidraria

Segundo Zúñiga e colaboradores (2001), os animais podem suprir a necessidade de zinco através de gaiolas galvanizadas, comedouros e bebedouros. Desta forma, quantidades mínimas de zinco advindas de algum ingrediente da dieta ou por vias de contaminação, mesmo que presentes em quantidades aparentemente desprezíveis, poderiam garantir o crescimento dos animais. Conforme Wada e colaboradores (1985) os animais podem absorver quase 100 % do zinco alimentar quando deficientes no mineral. Com o objetivo de minimizar a contaminação com zinco, todos os utensílios empregados para a formulação das dietas, manejo dos animais (gaiolas, comedouros e bebedouros) e preparo de amostras, eram de plástico, vidro ou aço inoxidável. Os materiais e a superfície de contato das gaiolas foram tratados ou imersos em solução de ácido nítrico 10 % e posteriormente muito bem lavados com água deionizada para retirar o resíduo do ácido.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Ensaio Biológico de determinação do valor nutritivo da caseína e da dieta através do balanço de nitrogênio (Digestibilidade Aparente – DA – e Digestibilidade Corrigida pela Dieta Aprotéica – DCDA) e indicadores de crescimento Quociente de Conversão Alimentar (QCA), Quociente de Eficiência Líquida da Caseína (NPR) e Quociente de Eficiência da Caseína (PER)

O consumo das dietas foi monitorado durante todo o período experimental, bem como a evolução ponderal dos ratos em balança semi-analítica em intervalos de 4 dias. As fezes foram coletadas no 4º dia de ensaio, após adaptação de 4 dias às dietas, para determinação do nitrogênio excretado. No decorrer do período experimental, foram calculados os seguintes índices de balanço de nitrogênio: **Digestibilidade Aparente (DA)**, que mede a fração de nitrogênio ingerido que é absorvida pelo rato, dada pela divisão do Nitrogênio Absorvido (nitrogênio ingerido – nitrogênio fecal) x 100 pelo Nitrogênio Fecal e **Digestibilidade Corrigida pela Dieta Aprotéica (DCDA)**, cujos dados foram corrigidos pelo teor de nitrogênio das fezes de um grupo de animais em dieta aprotéica, dados pela divisão do teor de Nitrogênio Ingerido – Nitrogênio Fecal de Origem Alimentar (nitrogênio fecal – nitrogênio endógeno fecal) x 100 pelo Nitrogênio Ingerido.

Os índices de crescimento baseados no consumo de dieta e no ganho de peso foram o **Quociente de Conversão Alimentar (QCA)**, onde é feita a relação do ganho de peso (g) pela dieta consumida (g) e o **Quociente de Eficiência Líquida da Caseína (NPR)** onde foi avaliado o valor nutritivo da caseína durante 4 dias de adaptação e 10 dias de controle nas dietas experimentais sendo feita a relação do ganho de peso dos grupos em dieta com proteína + a perda de peso dos animais em dieta aprotéica, dividido pela proteína consumida (g) no tempo experimental; e **Quociente de Eficiência Protéica (PER)**, onde o valor nutricional da caseína foi verificado em 4 dias de adaptação às dietas e 28 dias de controle experimental pela razão do ganho de

peso (g) e a proteína consumida (g). Para cálculo destes índices, seguiu-se a metodologia descrita por Pellet e Young (1980).

Os indicadores de crescimento, quando utilizados para avaliar o “status” nutricional de zinco, têm como base a informação de que não existem reservas funcionais do mineral que possam estar disponíveis quando dietas deficientes em zinco são oferecidas aos animais, sendo que a manifestação inicial da carência do mineral refletem-se visivelmente no crescimento (KING, 1990). O cálculo da ingestão de zinco alimentar, quando presente na mistura salina foi feito a partir do consumo de dieta.

4.2.2 Determinações analíticas

4.2.2.1 Proteína bruta e nitrogênio

O teor protéico da caseína, das dietas experimentais e o teor de nitrogênio fecal foram determinados através do método semi-micro Kjeldahl preconizado pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1975) utilizando-se o fator de conversão 6,38 para a caseína (FAO, 1970).

4.2.2.2 Umidade

Cerca de 2 g de amostra foram pesados em balança analítica, em cadinhos previamente tarados. As amostras foram secas a 100 °C por 12 horas em estufa, sendo os pesos determinados até peso constante.

4.2.2.3 Determinação do teor de zinco no soro dos ratos e água deionizada utilizada nos procedimentos experimentais

A coleta de sangue dos animais no Ensaio Biológico I foi realizada em três tempos: Tempo Zero (T0) – coleta de sangue de um grupo de ratos utilizados como referência da concentração sérica de zinco antes do período experimental utilizando-se animais que estavam recebendo a dieta não purificada de fórmula fechada Nuvital[®] e que não chegaram a participar do ensaio biológico; Tempo 1 (T1) - final dos 32 dias de consumo da dieta sem a fonte de zinco da mistura mineral (ZnCO₃, 56 % Zn); e Tempo 2 (T2) – ao final dos 8 dias nas respectivas dietas com concentrações crescentes de ZnCO₃, 56 % Zn. Para o Ensaio Biológico II, foi coletado soro ao final dos 32 dias. O material foi coletado através de punção cardíaca com os animais levemente sedados em câmara de éter etílico, visando reduzir o desconforto causado pelo procedimento. O sangue era acondicionado em recipiente descontaminado numa quantidade entre 2,5 – 3,0 mL, deixando-se precipitar à temperatura ambiente, sendo então centrifugado em Centrífuga Excelsa[®] II Modelo 206-MP, a 1075 x g por 10 minutos. O soro foi guardado em microtubos de centrífuga de polipropileno, em congelador a -25°C para posterior análise.

Quando da análise, o soro e a água foram diluídos 12 vezes em HCl 0,1 M a partir de uma alíquota de pelo menos 200 µL, dependendo da quantidade de amostra disponível, até o máximo de 400 µL visando obtenção de pelo menos 2 mL de solução (SUBRAMANIAN, 1996), quantidade esta mínima necessária para a leitura no espectrofotômetro de absorção atômica Perkin Elmer AA-300, com lâmpada de Zn – Lumina e chama de ar / acetileno. Esta técnica apresenta certas vantagens como rapidez, simplicidade, exatidão, custo acessível e facilidade de operação, além de determinar facilmente o teor de zinco nas amostras em estudo. Os padrões utilizados para calibração da curva padrão eram diluídos em glicerol 5%.

4.2.2.4 Determinação do teor de zinco nas dietas, caseína e mistura salina sem a fonte de zinco

Amostras das dietas experimentais, caseína e mistura salina sem o ZnCO₃, 56 % Zn, tiveram o teor de zinco determinado segundo metodologia

descrita por Kamao e colaboradores (2000), sendo igualmente utilizado o aparelho de espectrofotometria de absorção atômica Perkin Elmer AA-300, com lâmpada de Zn – Lumina e chama de ar / acetileno para leitura das amostras.

4.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados obtidos nos Ensaio Biológicos I e II foram submetidos à análise de variância ANOVA e teste de Tukey para confronto entre as médias, aceitando-se significação estatística a $p < 0,05$ através do uso do software SAS 8.0[®] (The Sas Institute, Inc., USA), possibilitando correlações entre os grupos com números diferentes de amostra. Foram realizadas análises de regressão que permitiram explicar a tendência e o comportamento dos tratamentos nas condições específicas a que foram submetidos, tendo a curva retificada quando necessário.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIO BIOLÓGICO I (ZINCO) e ENSAIO BIOLÓGICO II (ZINCO X ÁCIDO FÍTICO)

5.1.1 Consumo de Dieta e Ganho de Peso

O consumo de dieta e o ganho de peso médios dos animais dos **Grupos Controle e Controle sem a fonte de zinco** da mistura mineral (ZnCO_3 , 56% Zn) durante 32 dias de experimento no Ensaio Biológico I apresentados na tabela 2, mostraram não haver diferença estatística ao nível de significância de 5 % entre os tratamentos. A tabela 3 apresenta os valores médios para o ganho de peso e consumo de dieta durante os 8 dias recebendo as adições crescentes do carbonato de zinco (56 % Zn) às dietas de caseína pelos diferentes tratamentos, mostrando diferença estatística ao nível de 5 %.

Tabela 2. Consumo de Dieta (CD) e Ganho de Peso (GP) dos ratos Wistar durante 32 dias no Ensaio Biológico I alimentados com dieta basal de caseína, sem a fonte de zinco da mistura mineral.

GRUPO	CD em 32 dias (g)	GP em 32 dias (g)
Controle (n=7)*	595,7 ± 27,0 ^a	148,3 ± 18,7 ^a
Controle sem ZnCO_3, 56 % Zn (n=35) **	587,4 ± 28,7 ^a	155,5 ± 22,5 ^a

^a Valores médios assinalados na mesma coluna com a mesma letra não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$).

* Grupo em dieta de caseína AIN-93G (12,2 % proteína) com 33,1 mg de zinco / kg.

** Grupo em dieta de caseína (12,2 % proteína) com a fonte de zinco (ZnCO_3 , 56%Zn) removida da mistura mineral, contendo 1,1 mg de zinco / kg.

Tabela 3. Ganho de Peso (GP) e Consumo de Dieta (CD) para os ratos Wistar (n=7) durante 8 dias no Ensaio Biológico I recebendo dietas de caseína com

adições crescentes de $ZnCO_3$, 56% Zn, após 32 dias em dieta basal de caseína, sem a fonte de zinco da mistura mineral

GRUPO	GP (g)	CD médio de 8 dias (g)
Controle (C)*	41,7 ± 37,2 ^a	134,0 ± 10,2 ^a
0 Zn**	28,7 ± 20,6 ^a	144,7 ± 13,2 ^{a,c}
16 Zn***	36,0 ± 7,4 ^a	165,0 ± 6,3 ^{b,c}
32 Zn[#]	78,2 ± 12,1 ^b	126,6 ± 13,5 ^a
64 Zn^{##}	88,4 ± 36,0 ^b	146,6 ± 16,2 ^{a,c}
128 Zn^{###}	87,6 ± 12,1 ^b	158,0 ± 11,4 ^{b,c}

^{a,b,c} Valores médios assinalados na mesma coluna com a mesma letra não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$).

* Grupo em dieta de caseína AIN-93G (12,2 % de proteína) contendo 33,1 mg de zinco / kg.

** Grupo em dieta de caseína (12,2 % de proteína) com a fonte de zinco ($ZnCO_3$, 56%Zn) removida da mistura mineral, contendo 1,1 mg de zinco / kg.

*** Grupo em dieta de caseína (12,2 % de proteína) contendo 14,2 mg de zinco / kg.

[#] Grupo em dieta de caseína (12,2 % de proteína) contendo 33,1 mg de zinco / kg.

^{##} Grupo em dieta de caseína (12,2 % de proteína) contendo 65,4 mg de zinco / kg.

^{###} Grupo em dieta de caseína (12,2 % de proteína) contendo 129,2 mg de zinco / kg.

A fonte de zinco preconizada pela dieta AIN-93G (1,65 g de ZnCO_3 , 52,14 % Zn, por kg de mistura salina) oferece 30 mg do mineral por kg de dieta (REEVES et al., 1993). Nos Ensaio Biológicos I e II utilizou-se o carbonato de zinco da marca comercial Vetec[®] numa concentração de 56 % Zn (1,65 g de ZnCO_3 , 56 % Zn, por kg de mistura salina), fornecendo 32,2 mg do mineral por kg de dieta. A análise elementar por espectrofotometria de absorção atômica de chama de ingredientes da dieta como a caseína e mistura salina, bem como das dietas experimentais onde a fonte de zinco fora manipulada, permitiram comprovar os valores teóricos para as dietas dos **Grupos Controle, 0Zn, 16 Zn, 32 Zn, 64 Zn e 128 Zn** (Figura 7). Os animais dos **Grupos Controle** nos Ensaio Biológicos I e II consumiram em média 0,62 e 0,56 mg de Zn ao dia, respectivamente. Para o **Grupo Controle sem ZnCO_3 , 56 % Zn**, o consumo médio diário de zinco foi de 0,02 nos Ensaio Biológicos I e II. Os valores encontrados para o consumo de dieta dos animais dos **Grupos Controle e Controle sem ZnCO_3 , 56 % Zn**, nos Ensaio Biológicos I (Tabela 2) e II (Tabela 4) mostraram que mesmo com a remoção do carbonato de zinco durante a elaboração da mistura salina, conferindo um aporte diário do mineral em até 30 vezes mais, por conta da caseína, não foi observada diferença estatística em 32 dias, bem como para o ganho de peso daqueles dois grupos (Tabela 2).

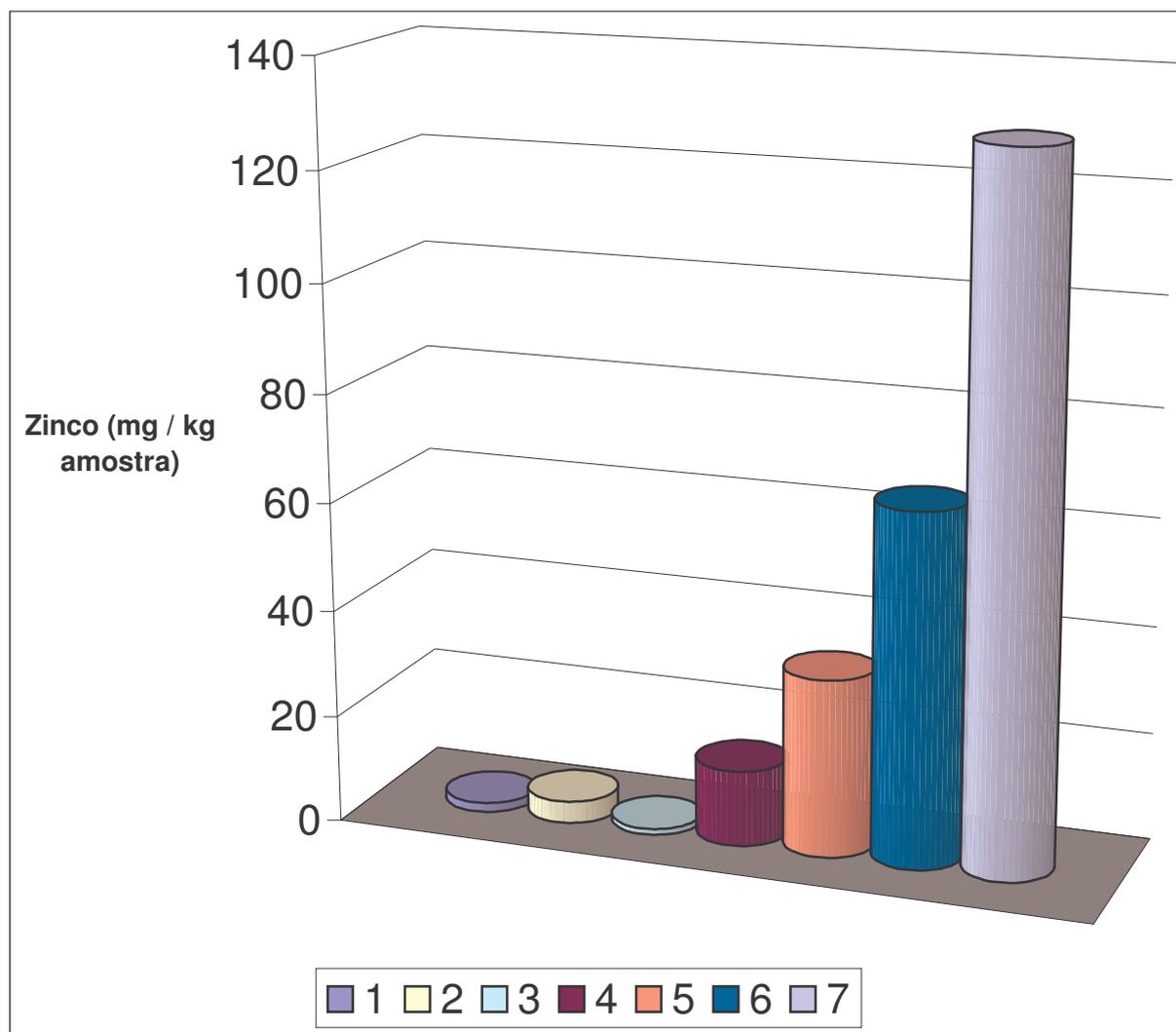


Figura 7. Determinação do teor de zinco por espectrofotometria de absorção atômica de chama em amostras das dietas experimentais, caseína e mistura salina, onde a seqüência numérica significa: **(1) Mistura salina sem ZnCO₃ (56 % Zn)** contendo $1,8 \pm 0,3$ mg de zinco / kg de mistura salina; **(2) Caseína** contendo $4,2 \pm 0,3$ mg de zinco / kg de caseína; **(3) Dieta 0 Zn** contendo $1,1 \pm 0,6$ mg de zinco / kg de dieta; **(4) Dieta 16 Zn** contendo $14,2 \pm 10,6$ mg de zinco / kg de dieta; **(5) Dieta 32 Zn** contendo $33,1 \pm 4,3$ mg de zinco / kg de dieta; **(6) Dieta 64 Zn** contendo $65,4 \pm 1,2$ mg de zinco / kg de dieta; **(7) Dieta 128 Zn** contendo $129,2 \pm 7,1$ mg de zinco / kg de dieta.

Os animais do **Grupo Aprotéico** monitorados durante 14 dias (4 adaptativos e 10 experimentais) para fins de cálculos do NPR (Coeficiente de Eficiência Líquida da Caseína) nos Ensaio Biológicos I e II, consumiram o mesmo teor de zinco por dia que aqueles dos **Grupos Controle sem ZnCO₃** (56 % Zn) anteriormente citados, devido à menor ingestão alimentar e ausência da caseína. Pode ser observado que a perda de peso associada à dieta aprotéica não apresentou correlação com a presença da fonte de zinco (ZnCO₃, 56%Zn) na formulação da mistura mineral, visto que a falta de proteína foi o suficiente para manifestação de um quadro de perda de peso e desnutrição. Visando observar a recuperação dos animais em dieta aprotéica após o término dos 14 dias de NPR, dividiu-se o grupo em dois sub-grupos (n=4) sendo oferecido a dieta AIN-93G a um sub-grupo e a mesma dieta sem a fonte de zinco (ZnCO₃, 56 % Zn) da mistura mineral ao outro com monitoração do ganho de peso por 13 dias. Conforme ilustrado na figura 8, pode-se confirmar a informação anterior de que a presença da caseína quando em quantidade suficiente para o adequado crescimento dos animais é decisiva na composição global das dietas, visto que a remoção da fonte de zinco da mistura mineral (ZnCO₃, 56 % Zn) não interferiu na recuperação do peso dos ratos desnutridos no período de 13 dias. Desta forma, concluiu-se que a presença de caseína num percentual de 12 % se sobrepôs à ausência do carbonato de zinco na dieta, levando-se em consideração a semelhança da evolução ponderal em 13 dias daqueles dois sub-grupos, uma vez que a **Dieta 0 Zn** contém zinco, embora em quantidade menor que a indicada para os roedores.

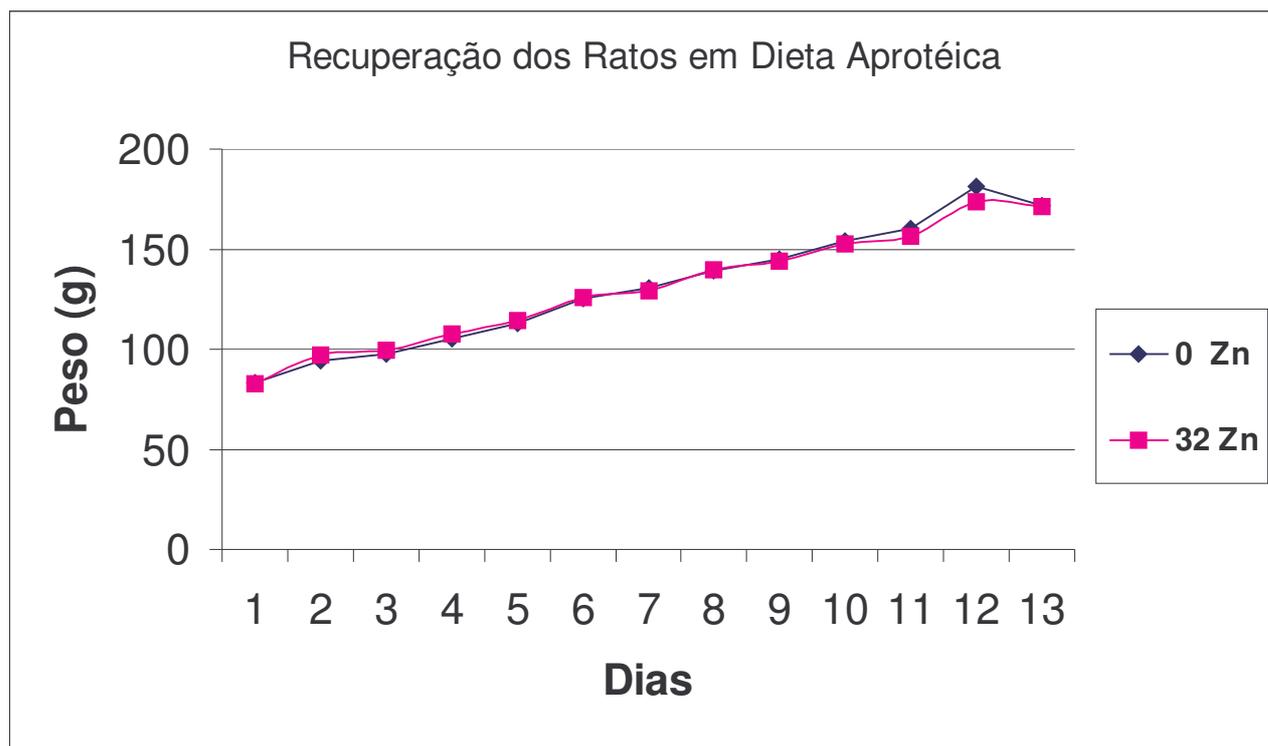


Figura 8. Recuperação dos ratos Wistar desnutridos que foram alimentados com dieta aprotéica, com vistas à verificação da evolução ponderal durante 13 dias com dietas de caseína (12,2 % de proteína; n=4): **0 Zn** – grupo em dieta cuja fonte de zinco (ZnCO_3 , 56% Zn) fora removida da mistura salina; **32 Zn** – grupo em dieta AIN - 93G.

A análise de regressão para o ganho de peso dos ratos nos 8 dias (Figura 9) recebendo as respectivas adições de ZnCO_3 (56 % Zn) às dietas, após 32 dias na dieta basal (Tabela 1), indicou que o ganho de peso dos tratamentos foi maior à medida que as concentrações de ZnCO_3 (56% Zn) aumentaram, porém não de forma linear. O teste feito para verificar o máximo da função quadrática mostrou que nestas condições o nível máximo de zinco para o maior ganho de peso (98,6 g) foi de 86,7 mg/ kg dieta. Tendo em vista a tendência para o decréscimo da linha na figura 9 para a maior adição de ZnCO_3 , 56% Zn, tal resultado é corroborado pela informação de Lönnnerdal (2000) de que com o aumento da concentração de zinco na dieta sua absorção fracional diminui e que altas doses do mineral não representam maior absorção devido à saturação dos mecanismos de transporte para o zinco. Então, se o mineral não for absorvido, não exercerá influência na evolução ponderal dos animais. King e colaboradores (2000) citam o trabalho de Kirchgessner (1993) que demonstrou a capacidade para manter constante a zincemia de animais recém-desmamados quando oferecidas concentrações de zinco numa variação de 10 vezes. Mudanças na concentração sérica de zinco foram observadas apenas quando consumo muito baixo (< 10 mg de Zn / kg de dieta) ou muito alto (> 100 mg de Zn / kg de dieta) de zinco era oferecido, mostrando que os mecanismos homeostáticos para o zinco foram ineficazes para manter a zincemia com aqueles valores extremos de ingestão, havendo tanto perda quanto acúmulo de zinco corpóreo. Os 129,2 mg de zinco / kg dieta oferecido ao **Grupo 128 Zn** não representaram melhora no crescimento dos animais provavelmente por conta destes fatores de regulação homeostática, mesmo recebendo a maior adição de zinco à dieta em 8 dias. É provável que a absorção do zinco aumente quando seus níveis corporais comecem a diminuir e vice-versa. Em animais, a capacidade de absorção do zinco alimentar é de quase 100 % quando deficientes no mineral; em estudos com humanos a extensão da absorção do zinco alimentar foi relativamente alta (50 %) quando baixos níveis de zinco (5,5 mg / dia) foram consumidos. Esta absorção diminuiu para 25 % quando altos níveis do mineral (16,5 mg/ dia) foram consumidos (WADA et al., 1985).

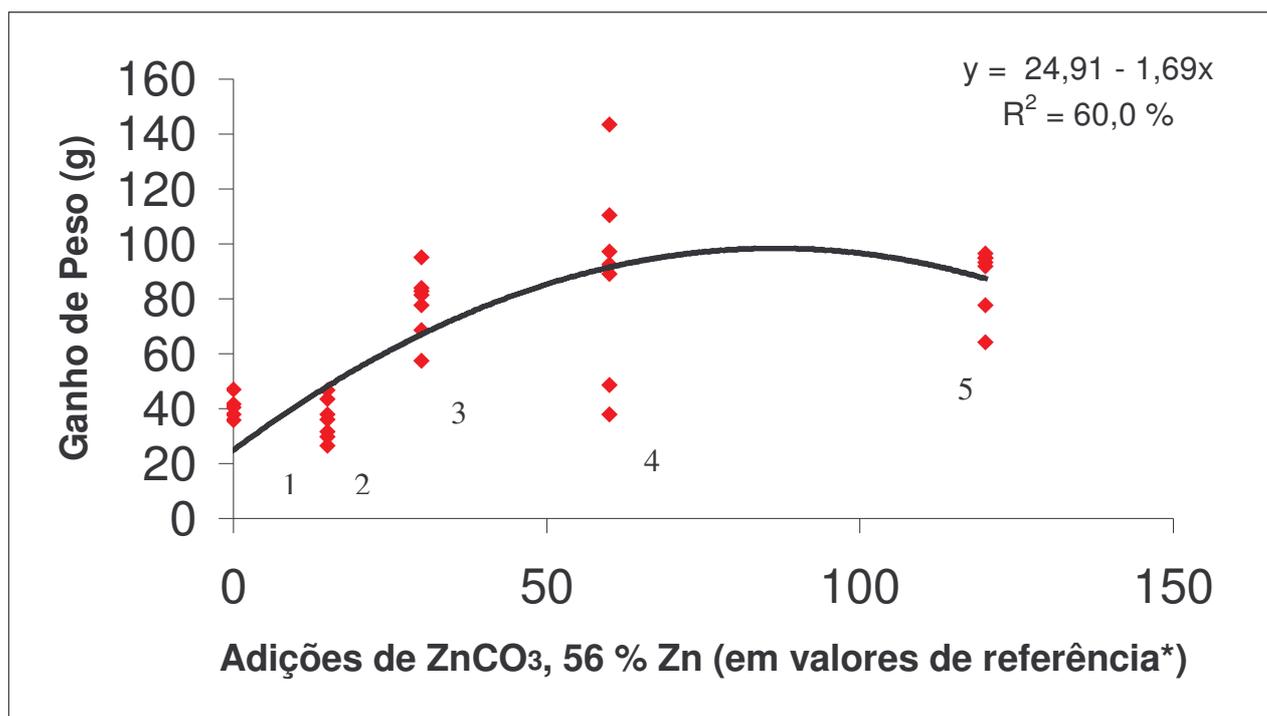


Figura 9. Regressão para o ganho de peso dos ratos Wistar durante 8 dias em dieta de caseína (12,2 % de proteína) com adições específicas de carbonato de zinco (ZnCO₃, 56 % Zn): **(1) Grupo 0 Zn** sem adição de ZnCO₃, 56 %Zn, à mistura mineral, contendo $1,1 \pm 0,6$ mg Zn / kg de dieta; **(2) Grupo 16 Zn** contendo $14,2 \pm 10,6$ mg de zinco / kg de dieta; **(3) Grupo 32 Zn** contendo $33,1 \pm 4,30$ mg de zinco / kg de dieta; **(4) Grupo 64 Zn** contendo $65,4 \pm 12,0$ mg de zinco / kg de dieta; **(5) Grupo 128 Zn** contendo $129,2 \pm 7,1$ mg de zinco / kg de dieta, após 32 dias em dieta com a fonte de zinco (ZnCO₃, 56% Zn) removida da mistura mineral.

*Valor de referência = teor de zinco na dieta AIN-93G ($32,2$ mg de zinco / kg de dieta).

Fraker e colaboradores (2000) mantiveram os ratos durante 30 dias em dieta deficiente em zinco sendo observado que num período de 3 a 5 dias naquela dieta, a ingestão alimentar já apareceu diminuída sendo o primeiro sinal visível da deficiência do mineral. Em estudos de caráter mais absoluto como o trabalho de Huber e Gershoff (1973), além de omitir o carbonato de zinco da mistura mineral, a caseína foi tratada com EDTA para a retirada de possíveis contaminações com zinco. No presente trabalho tal procedimento não foi realizado pelo fato de a dieta basal elaborada ser deficiente em zinco ($1,1 \pm 0,6$ mg de Zn / kg dieta), conforme a classificação de Franz e colaboradores (1980). Foram analisadas amostras de água da torneira, água destilada e água deionizada cujos resultados encontrados foram 0,2 ppm, 0,06 ppm e 0,02 ppm de zinco, respectivamente.

No Ensaio Biológico II, onde a dieta basal sem o $ZnCO_3$, 56 % Zn, da mistura mineral recebeu adições até 33,1 g de ácido fítico / kg dieta, a evolução ponderal e o consumo de dieta dos ratos, apresentados nas figuras 10 e 11 pela análise de regressão, mostrou redução constante destas variáveis, por conta das adições de fitato. Em 1960, O'Dell e Savage estudaram o efeito da adição do fitato à caseína numa concentração semelhante à da proteína de soja, verificando que o crescimento de frangos reduzira como para aqueles alimentados com a proteína de soja. A adição de zinco à dieta eliminou este efeito inibitório do crescimento, sugerindo que era devido à baixa biodisponibilidade do zinco. Estudos citados por Brody (1994) relatam que a absorção do zinco é inversamente correlacionada à concentração de fitato na dieta, uma vez que o IP6 apresenta importante capacidade de complexação com o zinco e com a proteína alimentar. Conforme a tabela 4, os valores para ganho de peso e consumo de dieta apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) para os tratamentos, à medida que as dietas receberam as adições crescentes do ácido fítico. Segundo Shay e Mangian (2000) e MacDonald (2000) dentro de 3 a 5 dias a redução no crescimento e consumo alimentar de animais em dieta reduzida em zinco já são detectáveis. Rink e Kirchner (2000) e Baum e colaboradores (2000) relatam que as manifestações da deficiência do zinco, como redução do apetite e ganho de peso se mostram bem evidentes em 2 a 5 semanas após início da restrição alimentar do mineral. Estes sinais puderam

ser claramente observados no Ensaio Biológico II, onde as dietas com o ácido fítico foram oferecidas por um período de quase 5 semanas. Neste caso, onde apesar de ter sido removida a fonte de zinco da mistura salina e classificado a dieta como deficiente em zinco, quando na ausência do ácido fítico às dietas, o ganho de peso dos animais não foi prejudicado (Tabela 2). Como contribuição de zinco pela proteína alimentar, Lönnnerdal (2000) enfatiza que esta pode ser a principal fonte de zinco alimentar, dependendo da concentração protéica da dieta, bem como da biodisponibilidade do mineral. Uma vez que o ácido fítico forma complexos estáveis e insolúveis com o zinco e a caseína, no Ensaio Biológico II não foi assegurado o crescimento dos animais pela fonte protéica.

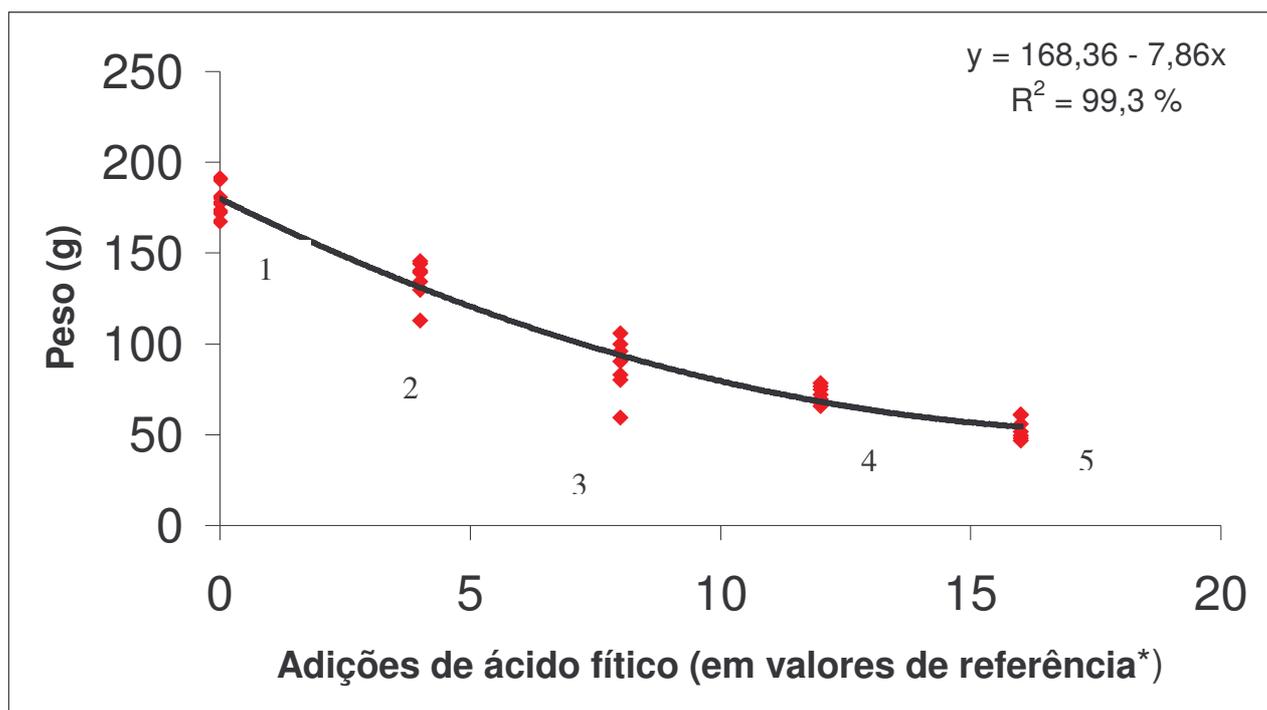


Figura 10. Regressão para o ganho de peso dos ratos Wistar em 32 dias do Ensaio Biológico II recebendo as respectivas dietas de caseína (12,4 % de proteína) sem o $ZnCO_3$, 56% Zn, adicionado à mistura mineral e com adições crescentes de ácido fóico (de zero até 16 vezes o teor de fitato encontrado em 1g de feijão cru) para os seguintes tratamentos: **(1) Grupo 0 AF** sem adição de ácido fóico à dieta; **(2) Grupo 4 AF** em dieta acrescida de 8,3 g de ácido fóico / kg; **(3) Grupo 8 AF** em dieta acrescida de 16,5 g de ácido fóico / kg; **(4) Grupo 12 AF** em dieta acrescida de 24,8 g de ácido fóico / kg; **(5) Grupo 16 AF** em dieta acrescida de 33,1 g de ácido fóico / kg.

*Valor de referência = teor de ácido fóico no feijão IAC-Carioca cru (14,7 mg de ácido fóico / g de feijão).

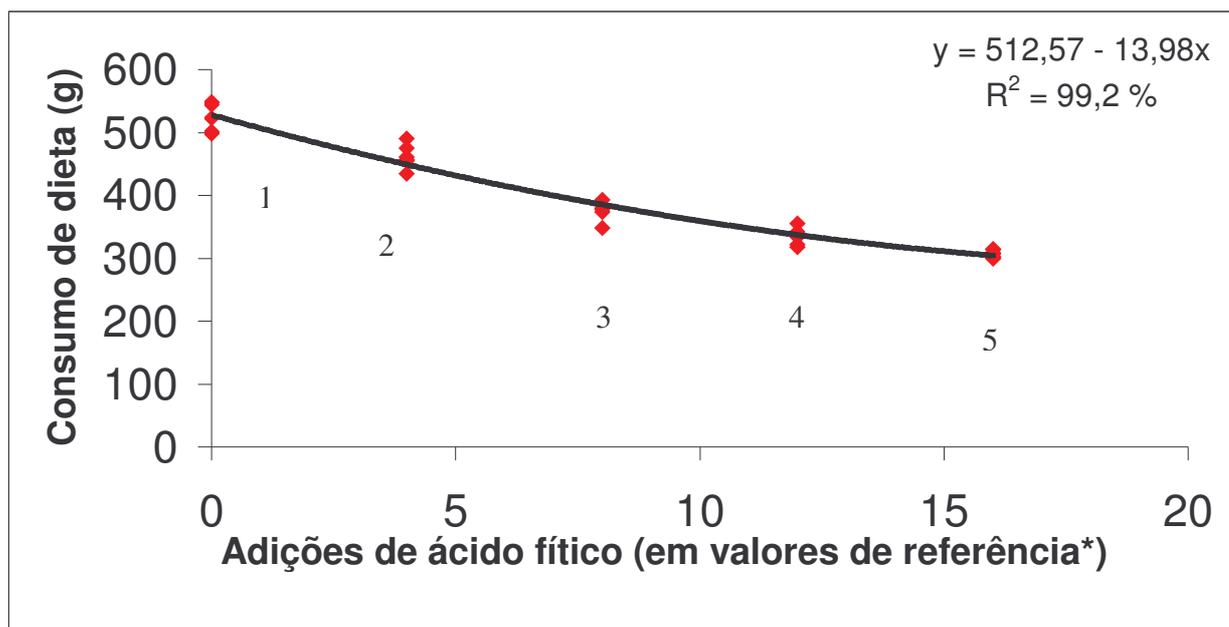


Figura 11. Regressão para o consumo dos ratos Wistar de dieta de caseína (12,4 % de proteína), sem adição do $ZnCO_3$, 56% Zn, à mistura mineral, e com adições crescentes de ácido fóico para os seguintes tratamentos, em 32 dias do Ensaio Biológico II: **(1) Grupo 0 AF** sem adição de ácido fóico à dieta; **(2) Grupo 4 AF** em dieta acrescida de 8,3 g de ácido fóico/ kg; **(3) Grupo 8 AF** em dieta acrescida de 16,5 g de ácido fóico / kg; **(4) Grupo 12 AF** em dieta acrescida de 24,8 g de ácido fóico / kg; **(5) Grupo 16 AF** em dieta acrescida de 33,1 g de ácido fóico/kg.

* Valor de referência = teor de ácido fóico no feijão IAC-Carioca cru (14,7 mg de ácido fóico / g de feijão).

Tabela 4. Consumo de Dieta (CD) e Ganho de Peso (GP) dos ratos Wistar (n=7) por grupo, durante 32 dias no Ensaio Biológico II recebendo dieta basal sem a fonte de zinco da mistura mineral ($ZnCO_3$, 56% Zn) e com adições crescentes de ácido fólico.

GRUPO	CD (g)	Ganho de Peso (g)
Controle (C)*	542,2 ± 13,6 ^a	180,0 ± 12,0 ^a
0 AF**	523,1 ± 23,5 ^a	179,1 ± 9,2 ^a
4 AF***	461,3 ± 17,4 ^b	135,2 ± 11,2 ^b
8 AF***	377,5 ± 14,2 ^c	88,0 ± 15,5 ^c
12 AF***	335,1 ± 12,6 ^d	72,1 ± 4,8 ^d
16 AF***	306,7 ± 6,0 ^e	53,5 ± 6,0 ^e

a,b,c,d,e Valores médios assinalados na mesma coluna com letras diferentes diferiram estatisticamente ($p < 0,05$).

* Grupo em dieta de caseína AIN-93G (12,4 % de proteína).

** Grupo em dieta de caseína (12,4 % de proteína) com a fonte de zinco ($ZnCO_3$, 56% Zn) removida da mistura salina e sem adição de ácido fólico.

*** Grupos experimentais (Tratamentos) em dieta de caseína (12,4 % de proteína) com a fonte de zinco ($ZnCO_3$, 56 % Zn) removida da mistura mineral e com adições crescentes de ácido fólico: **4 AF** – adição de 8,3 g de ácido fólico / kg dieta; **8 AF** - adição de 16,5 g de ácido fólico / kg dieta **12 AF** - adição de 24,8 g de ácido fólico / kg dieta e **16 AF** - adição de 33,1 g de ácido fólico / kg de dieta.

5.1.2 Determinação do valor nutritivo da caseína e da dieta através do balanço de nitrogênio (Digestibilidade Aparente – DA – e Digestibilidade Corrigida pela Dieta Aprotéica – DCDA) e indicadores de crescimento: Quociente de Conversão Alimentar (QCA), Quociente de Eficiência Líquida da Caseína (NPR) e Quociente de Eficiência da Caseína (PER)

Aos 32 dias do Ensaio Biológico I, quando os ratos Wistar receberam as dietas Controle (AIN-93G, 12,2 % de caseína) e Controle sem a fonte de zinco (ZnCO_3 , 56%Zn) da mistura mineral, os resultados para DA, DCDA e NPR apresentaram diferença estatística ao nível de significância $p < 0,05$, conforme os valores médios apresentados na tabela 5, a exceção do PER que não diferiu ($p > 0,05$).

No Ensaio Biológico II (Tabela 6) não foi observada diferença estatística entre as digestibilidades dos tratamentos que receberam as adições de ácido fítico à dieta de caseína (12,4 % de proteína) sem ZnCO_3 , 56 % Zn, e o Grupo Controle. Os dados para PER e NPR apresentaram comprometimento do valor nutritivo da caseína para os tratamentos que receberam as adições de ácido fítico, diferindo estatisticamente dos Grupos Controle e 0 AF, ao nível de significância de 5 %, confirmando os dados da literatura que o fitato forma um complexo forte e insolúvel com a proteína (Figura 5). Os **Grupos Controle e 0 AF sem ZnCO_3 , 56% Zn**, que não receberam o ácido fítico, não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Tabela 5. Digestibilidade Aparente (DA), Digestibilidade Corrigida pela Dieta Aprotéica (DCDA), Quociente de Eficiência Líquida da Caseína (NPR), Quociente de Eficiência da Caseína (PER) e Quociente de Conversão Alimentar (QCA)* para os grupos de ratos Wistar do Ensaio Biológico I.

GRUPO	DA (%)	DCDA (%)	NPR	PER	QCA
Controle (n=7)**	86,38 ± 1,85 ^a	91,76 ± 1,74 ^a	3,80 ± 0,19 ^a	2,20 ± 0,10 ^a	0,46 ± 0,02 ^a
Controle sem ZnCO₃, 56%Zn (n=35) ***	83,00 ± 3,24 ^b	88,34 ± 2,94 ^b	3,57 ± 0,27 ^b	2,31 ± 0,22 ^a	0,43 ± 0,03 ^b

^{a,b} Valores médios assinalados na mesma coluna com letras diferentes diferiram estatisticamente ($p < 0,05$).

* QCA determinado para os 10 dias de cálculo do NPR.

** Grupo em dieta de caseína AIN-93G (12,2 % proteína) contendo 33,1 mg de zinco / kg.

*** Grupo em dieta de caseína (12,2 % proteína) com a fonte de zinco (ZnCO₃, 56%Zn) removida da mistura mineral, contendo 1,1 mg de zinco / kg.

Tabela 6. Digestibilidade Aparente (DA) e Digestibilidade Corrigida pela Dieta Aprotéica (DCDA), Quociente de Eficiência Líquida da Caseína (NPR), Quociente de Eficiência da Caseína (PER) e Quociente de Conversão Alimentar (QCA)[#] para os grupos de ratos Wistar (n=7) do Ensaio Biológico II.

GRUPO	DA %	DCDA %	NPR	PER	QCA
Controle (C)*	70,27 ± 5,24 ^a	77,37 ± 5,34 ^a	3,58 ± 0,24 ^a	2,66 ± 0,10 ^a	0,40 ± 0,0 ^a
0 AF**	67,21 ± 3,68 ^{a,b}	74,53 ± 4,13 ^{a,b}	3,46 ± 0,20 ^{a,b}	2,63 ± 0,15 ^a	0,33 ± 0,05 ^a
4 AF***	64,90 ± 2,76 ^b	73,11 ± 2,43 ^b	3,15 ± 0,25 ^b	2,32 ± 0,07 ^b	0,24 ± 0,05 ^b
8 AF***	71,38 ± 3,54 ^a	80,58 ± 3,63 ^a	2,48 ± 0,33 ^{c,d}	1,90 ± 0,16 ^{c,d}	0,21 ± 0,04 ^{b,c}
12 AF***	74,48 ± 3,14 ^a	84,24 ± 3,01 ^a	2,28 ± 0,27 ^{d,e}	1,80 ± 0,17 ^d	0,16 ± 0,05 ^c
16 AF***	68,90 ± 5,78 ^a	79,01 ± 6,13 ^a	2,06 ± 0,28 ^e	1,27 ± 0,10 ^e	0,13 ± 0,04 ^d

^{a,b,c,d,e} Valores médios assinalados na mesma coluna com a mesma letra não diferiram estatisticamente (p>0,05).

[#]QCA determinado para os 10 dias de cálculo do NPR.

* Grupo em dieta de caseína AIN-93G (12,4 % de proteína).

** Grupo em dieta de caseína (12,4 % de proteína) com a fonte de zinco (ZnCO₃, 56%Zn) removida da mistura salina e sem adição de ácido fítico.

*** Grupos experimentais (Tratamentos) em dieta de caseína (12,4 % de proteína) com a fonte de zinco (ZnCO₃, 56 % Zn) removida da mistura mineral e com adições crescentes de ácido fítico: **4 AF** – adição de 8,3 g de ácido fítico / kg dieta; **8 AF** - adição de 16,5 g de ácido fítico / kg dieta **12 AF** - adição de 24,8 g de ácido fítico / kg dieta e **16 AF** - adição de 33,1 g de ácido fítico / kg de dieta.

O QCA, entendido como a relação entre o ganho de peso e consumo de dieta, foi calculado durante os 10 dias de NPR (Tabela 6), onde foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) e nos últimos oito dias, quando o zinco foi adicionado em concentrações crescentes à dieta para os diferentes tratamentos (Tabela 7) no Ensaio Biológico I. Naqueles 8 dias, o QCA diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) indicando maior eficiência da dieta na promoção do ganho de peso para o **Grupo 32 Zn**, seguido dos **Grupos 64 Zn e 128 Zn**. A quantidade de carbonato de zinco oferecida ao **Grupo 32 Zn** (33,1 mg de Zn / kg dieta) é a mais próxima daquela recomendada pela dieta AIN-93G (30 mg de Zn / kg dieta), que se apresenta como a quantidade ideal para suprir as necessidades de animais em crescimento. Trinta miligramas de Zn por kg dieta foram também eficientes para manter a zincemia constante, segundo estudo citado por King e colaboradores (2000).

Um fator de relevante importância como potencializador do efeito quelante do ácido fítico sobre o zinco é o cálcio (KREBS, 2000; PÉREZ-LLAMAS et al., 1996). Este mineral faz parte da formulação da dieta AIN-93 como constituinte da caseína e como parte da formulação da mistura mineral. Morris e Ellis (1980) num estudo sobre a influência do cálcio sobre a diminuição da absorção do zinco pelo ácido fítico, encontraram que a um nível basal de cálcio de 0,75 % a razão ácido fítico : zinco de 12:1 não afetou o crescimento de ratos, mas a um nível maior de cálcio (1,75 %) com razão molar para ácido fítico : zinco de 6 : 1, afetou o crescimento. Desta forma, os autores concluíram que o cálcio afeta a disponibilidade do zinco e que a razão molar ácido fítico : zinco que afeta a absorção do zinco é dependente da ingestão alimentar de cálcio e zinco.

Tabela 7. Quociente de Conversão Alimentar (QCA) para os ratos Wistar em 8 dias nas respectivas dietas AIN-93G de caseína (12,2 % de proteína) com adições crescentes de ZnCO₃, 56 % Zn, no Ensaio Biológico I, após 32 dias em dieta AIN-93G cuja fonte de zinco (ZnCO₃, 56 % Zn) fora removida.

GRUPO	QCA (g peso / g dieta)
Controle (C)*	0,38 ± 0,16 ^a
0 Zn**	0,27 ± 0,02 ^a
16 Zn***	0,23 ± 0,03 ^a
32 Zn[#]	0,62 ± 0,06 ^b
64 Zn^{##}	0,53 ± 0,16 ^b
128 Zn^{###}	0,55 ± 0,08 ^b

^{a,b} Valores assinalados na mesma coluna com a mesma letra não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$); ($n = 7$).

* Grupo em dieta de caseína AIN-93G (12,2 % de proteína) com 33,1 mg de zinco / kg dieta.

** Grupo em dieta de caseína (12,2 % de proteína) com a fonte de zinco (ZnCO₃, 56%Zn) removida da mistura mineral, contendo 1,1 mg de zinco / kg.

*** Grupo em dieta de caseína (12,2 % de proteína) contendo 14,2 mg de zinco / kg.

[#] Grupo em dieta de caseína (12,2 % de proteína) contendo 33,1 mg de zinco / kg.

^{##} Grupo em dieta de caseína (12,2 % de proteína) contendo 65,4 mg de zinco / kg.

^{###} Grupo em dieta de caseína (12,2 % de proteína) contendo 129,2 mg de zinco / kg.

5.1.3 Determinação do teor de zinco no soro dos ratos

Para quantificar o zinco presente no soro dos animais dos Ensaio Biológicos I e II, foi utilizada a técnica de espectrofotometria de absorção atômica de chama. Os padrões utilizados para a curva de calibração do equipamento foram diluídos em glicerol 5 % para a correção da viscosidade das amostras (SUBRAMANIAN, 1996). Para traçar a curva de calibração foram utilizados padrões até 0,8 ppm. Doretto e colaboradores (2002) encontraram 0,9 µg / mL de zinco no soro de ratos Wistar do grupo Controle em seu estudo. Estes resultados estão dentro da faixa de concentração sérica esperada para o mineral em ratos, que segundo Fick e colaboradores (1980) é de 0,5 a 1,2 µg / mL. No início do Ensaio Biológico I, isto é, após os 4 dias de adaptação às dietas, foi determinado o teor de zinco no soro dos animais do **Grupo Controle** (n=7) e dos animais em dieta **Controle sem ZnCO₃, 56 % Zn** (n=35). Não foi observada diferença estatística (p>0,05) para os dois tratamentos, sendo o teor encontrado considerado o valor de referência no tempo zero, sendo igual a 1,1 ± 0,1 µg Zn / mL de soro.

A tabela 8 indica que não foi encontrada diferença estatística na concentração sérica de zinco dos ratos no ensaio Biológico I após 32 dias (Tempo 1) em dieta sem a fonte de zinco (ZnCO₃, 56% Zn) da mistura mineral, indicando que apesar de o carbonato de zinco não ter sido oferecido naquele período, a zincemia ainda se apresentou normal, por conta da contribuição de zinco da caseína e dos mecanismos de controle homeostáticos. Fato contrário foi observado no estudo de Hardie-Muncy e Rasmussen (1979) onde as fontes protéicas do estudo, caseína e isolado protéico de soja, num percentual de 20 % na dieta não ocasionaram melhora no status de zinco dos ratos alimentados com as dietas cuja única fonte de zinco advinha da proteína.

Tabela 8. Concentração de zinco no soro* de ratos Wistar do Ensaio Biológico I verificada no final dos 32 dias (Tempo 1).

GRUPO	Zinco Sérico ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
	Tempo 1
Controle (n=7)**	$1,1 \pm 0,1^a$
Controle sem ZnCO_3 , 56 % Zn (n=35)***	$1,0 \pm 0,2^a$

^a Valores médios assinalados na mesma coluna com a mesma letra não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$).

* Valores de referência para zinco sérico encontrado na literatura: $0,5 - 1,2 \mu\text{g} / \text{mL}$ (FICK et al., 1980).

**Grupo em dieta de caseína AIN-93G (12,2 % proteína) contendo 33,1 mg de zinco / kg.

*** Grupo em dieta de caseína (12,2 % proteína) com a fonte de zinco (ZnCO_3 , 56%Zn) removida da mistura mineral, contendo 1,1 mg de zinco / kg.

Privação alimentar em curto prazo ou jejum tem sido associada a mudanças no metabolismo do zinco, particularmente à síntese da metalotioneína com o conseqüente determinante do status nutricional do organismo (RICHARDS e COUSINS, 1976_a, 1976_b). Da mesma forma, a história nutricional precedente do zinco, bem como a atual, influenciam a razão do metabolismo do mineral em duas vias: a absorção intestinal é alterada pela dieta atual, porém o “turnover” tecidual do zinco é regulado tanto pela ingestão alimentar imediata, quanto pela anterior (JOHNSON et al., 1988), devendo ser considerado o fato de que tempo longo de dieta deficiente pode levar à adaptação metabólica. A dieta não purificada de fórmula fechada inicialmente oferecida a todos os animais na etapa de aclimatação proporcionou um teor sérico de zinco de $1,0 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{mL}$, o que pode ter contribuído para este sistema adaptativo de regulação metabólica e, sob avaliação relativa, com a simples retirada do carbonato de zinco da mistura mineral (ZnCO_3 , 56 % Zn), não pôde ser observada redução no zinco sérico dos ratos no período de 32 dias em dieta de caseína.

Outros fatores de significativa importância em relação à concentração sérica de zinco e crescimento dos ratos quando na ausência de fonte alimentar de zinco nas dietas devem ser considerados. Em estudos experimentais com animais têm sido demonstradas as relações existentes entre zincemia e concentração de proteína na dieta. Em ratos alimentados com 12,5, 18,8, ou 25,0 % de proteína, a dose resposta foi observada apenas nas dietas deficientes em cobre. Em dietas suficientes neste mineral, o efeito da proteína sobre o zinco plasmático foi mascarado (KHAN et al., 1987). No presente trabalho, a dieta oferecida forneceu 12,2 % de caseína aos ratos Wistar no Ensaio Biológico I e 12,4 % no ensaio Biológico II, com quantidade adequada de cobre. Os resultados publicados por Reeves em 1995, concluíram que períodos maiores que 15 dias de suplementação com zinco, resultaram em uma resposta adaptativa do metabolismo em relação às metalotioneínas, significando uma alteração no período de intensa síntese durante as duas primeiras semanas, a níveis basais estabilizados nas semanas seguintes. Tais conclusões estão de acordo com os achados de Henriques e Cozzolino (2001). A análise de regressão apresentada na figura 12 mostrou que conforme o aumento da concentração de $ZnCO_3$, 56 % Zn, às dietas, a zincemia dos ratos foi aumentando até 3,0 μg Zn sérico por mL de soro, embora o ganho de peso tenha apresentado aumento somente até adição de 86,7 mg Zn / kg de dieta, conforme demonstrado na figura 9, diminuindo logo após. Tais resultados corroboram a discussão anterior (LÖNNERDAL, 2000) de que adições maiores de zinco à dieta não mantêm a zincemia constante, tampouco se refletem em aumento no ganho de peso.

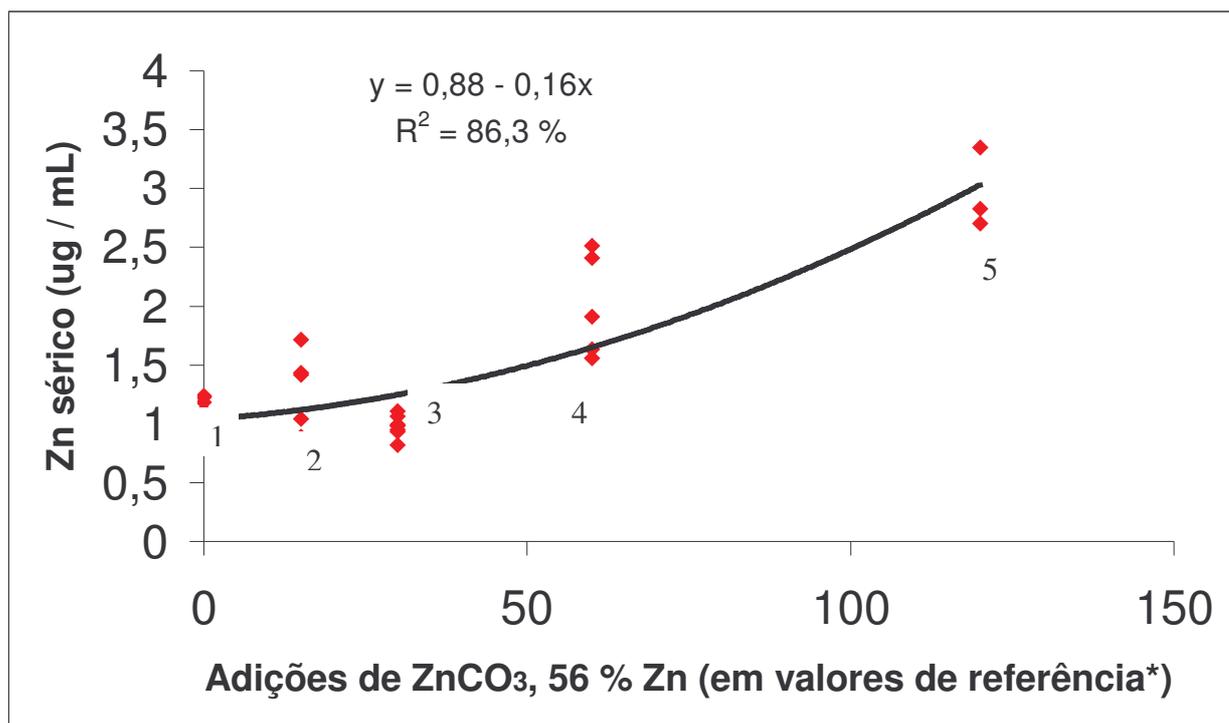


Figura 12. Regressão para as adições de ZnCO₃, 56 % Zn, na dieta basal e as conseqüentes concentrações de zinco no soro dos ratos Wistar do Ensaio Biológico I, durante um período de 8 dias (Tempo 2): **(1) Grupo 0 Zn** em dieta sem adição de ZnCO₃ (56 % Zn) da mistura mineral contendo 1,1 ± 0,1 µg Zn / mL de soro; **(2) Grupo 16 Zn** em dieta com adição de 14,2 mg de zinco / kg contendo 1,1 ± 0,4 µg Zn / mL de soro; **(3) Grupo 32 Zn** em dieta com adição de 33,1 mg de zinco / kg contendo 1,0 ± 0,1 µg Zn / mL de soro; **(4) Grupo 64 Zn** em dieta com adição de 65,4 mg de zinco / kg contendo 2,0 ± 0,5 µg Zn / mL de soro; **(5) Grupo 128 Zn** em dieta com adição de 129,2 mg de zinco / kg contendo 3,0 ± 0,3 µg Zn / mL de soro.

* Valor de referência = teor de zinco na dieta AIN-93G (32,2 mg de zinco / kg de dieta).

No Ensaio Biológico II, entretanto, onde os diferentes tratamentos receberam as respectivas dietas com adições crescentes de ácido fítico desde o início do experimento, pôde ser observado que com o aumento da concentração de ácido fítico presente nas dietas, a concentração de zinco no soro dos animais foi diminuindo (Figura 13). Tal fato comprova a capacidade de formação de complexos fortes e insolúveis do fitato com cátions como o zinco (OBERLEAS, 1973). Segundo Franco (1995), a concentração de zinco em plasma de sangue não hemolisado e livre de contaminação, quando expressa em valores menores de 0,5 µg / mL, já indicam deficiência em zinco. De acordo com esta classificação, pode-se dizer que os animais dos **Grupos 8 AF, 12 AF e 16 AF** apresentavam-se deficientes em zinco aos 32 dias do Ensaio Biológico II.

No estudo de Freeland-Graves e colaboradores (1980), onde indivíduos foram experimentalmente privados de zinco pela adição de fitato e fosfoproteínas à dieta durante 3 semanas, os resultados mostraram que níveis máximos de zinco seguiram à ingestão de 50 mg de dose teste de zinco. A depleção experimental de zinco em homens por dieta baixa em zinco por 8 semanas, seguida de um período de repleção de 2 semanas, não produziu mudanças significativas nos níveis plasmáticos de zinco. Curvas teste de tolerância indicaram apenas diferenças marginais que foram atribuídas a uma alteração no status de zinco, sugerindo índices pouco fidedignos de suficiência deste elemento (FICKEL et al., 1986). De forma inversa, indivíduos altamente suplementados com zinco (100 e 50 mg / dia) durante 4 semanas, apresentaram baixo pico de resposta plasmática após alteração oral para 25 mg de zinco. Tendo em vista os fatos mencionados, pode-se concluir com os achados de Hoadley e colaboradores (1987) que a depleção de zinco modifica seu transporte intestinal pelo aumento da capacidade do componente saturável da absorção do mineral, pela redução do fator homeostático secretório e pelo aumento do “turnover” metabólico.

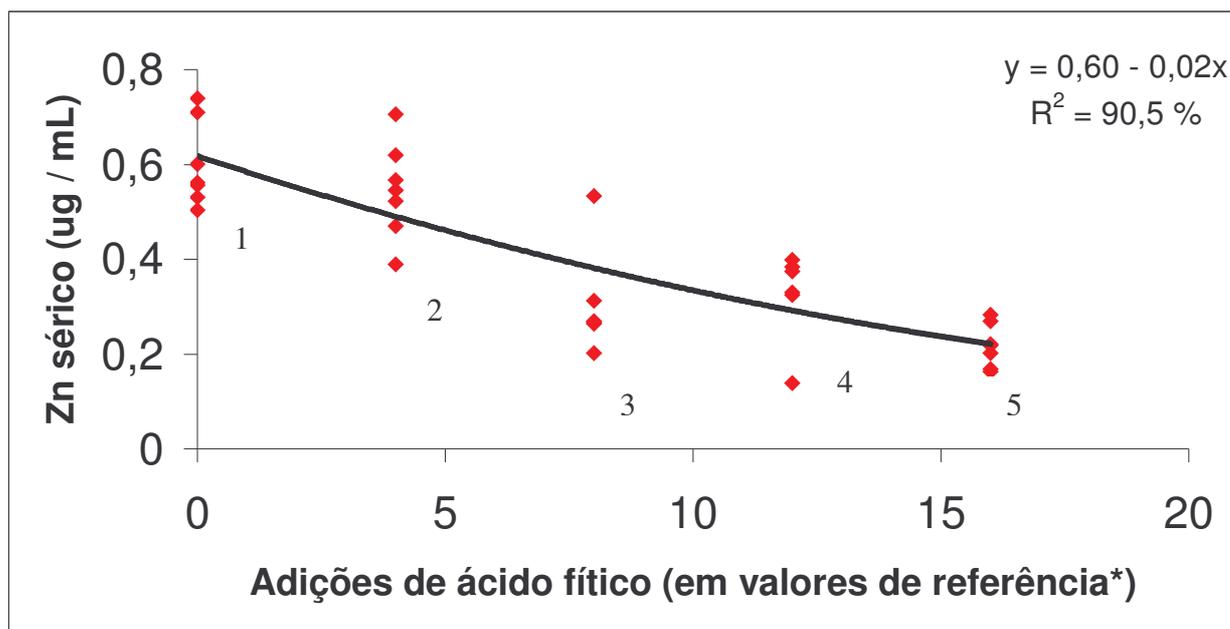


Figura 13. Regressão para as adições crescentes de ácido fítico (de zero até 16 vezes o teor de fitato encontrado em 1g de feijão cru) à dieta basal e as conseqüentes concentrações de zinco no soro de ratos Wistar do Ensaio Biológico II, durante um período de 32 dias: **(1) Grupo 0 AF** sem adição de ácido fítico à dieta, contendo $0,84 \pm 0,03 \mu\text{g Zn / mL}$ de soro; **(2) Grupo 4 AF** em dieta acrescida de 8,3 g de ácido fítico / kg contendo $0,55 \pm 0,10 \mu\text{g Zn / mL}$ de soro; **(3) Grupo 8 AF** em dieta acrescida de 16,5 g de ácido fítico / kg contendo $0,31 \pm 0,12 \mu\text{g Zn / mL}$ de soro; **(4) Grupo 12 AF** em dieta acrescida de 24,8 g de ácido fítico / kg, contendo $0,32 \pm 0,10 \mu\text{g Zn / mL}$ de soro; **(5) Grupo 16 AF** em dieta acrescida de 33,1 g de ácido fítico/kg, contendo $0,22 \pm 0,05 \mu\text{g Zn / mL}$ de soro.

* Valor de referência = teor de ácido fítico no feijão IAC-Carioca cru (14,7 mg de ácido fítico / g de feijão).

Em estudos de deficiência em zinco, o tempo requerido para depleção orgânica do mineral é sempre maior que o tempo para a repleção; para alguns trabalhos o período é em torno de 2 a 5 semanas para a depleção (FRANZ et al., 1980; RINK e KIRCHNER, 2000; FRAKER et al., 2000). O'Dell (2000) comenta resultados de alguns estudos onde o tempo para restabelecer a zincemia plasmática após 6 dias em dieta deficiente no mineral foi de 1 a 2 dias. A redução alimentar observada como manifestação da deficiência em zinco provoca o catabolismo de tecidos contendo zinco, liberando desta forma o zinco endógeno para as funções metabólicas mais importantes (King et al., 2000). No trabalho desenvolvido por Clausen e Dorup (1998) com ratos submetidos à dieta deficiente em zinco, foi observado rápido declínio na concentração sérica do mineral representado por 42 % do nível inicial em 3 dias de alimentação sem o zinco. Com a retomada da alimentação normal, estes índices foram imediatamente restabelecidos e igualmente restaurados num período de 3 dias.

Por fatores alheios à nossa vontade, não foi possível determinar as perdas fecais e urinárias do zinco, como forma de mensurar a quantidade do mineral não absorvida. Tendo em vista a fragilidade de mensuração do estado nutricional de zinco visto que inúmeros fatores estão associados e a escolha de um método isoladamente poderá indicar com pouca precisão o real estado, é aconselhado fazer uso de mais de um indicador, como o consumo alimentar, evolução ponderal, determinação da concentração de zinco plasmática podendo ser detectada 15 minutos após ingestão, atingindo um pico após 4 horas (FISBERG e BRAGA, 1998), determinações de zinco eritrocitária e urinária. Além destes parâmetros, indicadores funcionais como análise da atividade das metaloenzimas (anidrase carbônica, fosfatase alcalina e carboxipeptidase) poderiam ser igualmente monitorados (MARREIRO et al., 1998).

6 CONCLUSÕES

A análise dos dados obtidos neste trabalho onde a fonte de zinco da mistura mineral (ZnCO_3 , 56 % Zn) da dieta AIN-93G foi removida e após, adicionada separadamente com o ácido fítico (IP6) à dieta de caseína de ratos Wistar, permitiu as seguintes conclusões:

- ✓ A remoção do ZnCO_3 , 56 % Zn, durante 32 dias da dieta a base de caseína (12,2 %), não foi eficiente para depletar o zinco do soro dos animais, não comprometendo os índices de crescimento (consumo de dieta e ganho de peso) e o valor nutritivo da caseína, determinado pelo Quociente de Eficiência da Caseína (PER).
- ✓ A caseína é uma fonte protéica de alto valor biológico, com teor apreciável de zinco (4,2 mg / kg). Sua presença na dieta dos ratos Wistar como única fonte protéica num teor de 12,2 % foi eficiente para assegurar o crescimento dos animais e evitar a depleção sérica do zinco.
- ✓ Adições de carbonato de zinco (56 % Zn) à dieta de caseína durante 8 dias, após remoção desta fonte por 32 dias, resultaram em valores maiores para o ganho de peso, sendo eficiente até 86,7 mg de zinco / kg de dieta, para um máximo de 98,6 g de ganho ponderal; a eficiência alimentar apresentou valores maiores a partir de 33,1 mg Zn / kg de dieta e a deposição sérica de zinco, valores maiores para as adições de 65,4 e 129,2 mg / kg de dieta.
- ✓ Adições crescentes de ácido fítico, na forma de hexafosfato de mioinositol (IP6) à dieta basal sem o ZnCO_3 , 56 % Zn, da mistura mineral, num período de 32 dias, ocasionaram redução constante nos índices de crescimento (consumo de dieta e ganho de peso), no valor nutritivo da caseína, determinado pelo Quociente de Eficiência Líquida da Caseína (NPR) e PER, no valor nutritivo dietético determinado pelo Quociente de Conversão Alimentar (QCA) e na concentração sérica de zinco dos ratos. Os valores das

digestibilidades (Aparente e Corrigida pela Dieta Aprotéica) não foram comprometidos pelas adições crescentes de fitato.

✓ Pelo exposto, pôde ser inferido que o baixo teor de zinco da dieta basal (1,1 mg Zn / kg de dieta) praticamente não afetou o crescimento dos ratos, enquanto a influência de adições crescentes de ácido fítico tiveram um efeito de notável redução dos índices determinados, com exceção da digestibilidade da caseína, num período experimental de 32 dias.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONSON, D.L.; BARAK, A.J; VANDERHOF, J.A. Determination of the site of zinc absorption in the rat small intestine. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 109, n. 1, p. 142-147, 1979.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. **12.ed.** HORWITZ, W. (Ed). Washington, DC: AOAC, 1975. 1094p.

BAUM, M.K.; SHOR-POSNER, G.; CAMPA, A. Zinc status in human immunodeficiency virus infection. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1421-1423, 2000. Supplement.

BEAL, L., MEHTA, T. Zinc and phytate distribution in peas. Influence of heat treatment, germination, pH, substrate and phosphorus on pea phytase and phytase. Journal of Food Science, Chicago, v. 50, n. 1, p. 96-100, 1985.

BLACK, R.E. Therapeutic and preventive effects of zinc on serious childhood infectious diseases in developing countries. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, p. 476-479, 1998. Supplement.

BRODY, T. **Nutritional biochemistry.** San Diego: Academy Press, 1994. p. 581-590.

BULLOCK, J.I., DUFFIN, P.A., NOLAN, K.B. In vitro hydrolysis of phytate at 95°C and the influence of metal iron in the rate. Journal of the Science of Food and Agriculture, Surrey, v. 63, n. 2, p. 261-263, 1993.

CHAMPAGNE, E.T.; PHILLIPPY, B.Q. Effects of pH on calcium, zinc, and phytate solubilities and complexes following in vitro digestions of soy protein isolate. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 54, n. 3, p. 587-592, 1989.

CHANDRA, R.K. Excessive intake of zinc impairs immune responses. **Journal of the American Medical Association**, Bethesda, v. 252, n. 11, p. 1443-1446, 1984.

CHANDRA, R.K. Influence of multinutrient supplement on immune responses and infection-related illness in 50-65 year old individuals. **Nutrition Research**, St. John, n. 22, p. 5-11, 2002.

CHRISTIAN, P.; KHATRY, S.K.; LECLERQ, S.C.; SHRESTHA, S.R.; KIMBROUGH-PRADHAN,E.; WEST-JR, K.P. Iron and zinc interactions among pregnant Nepali women. **Nutrition Research**, Oxford, v. 21, p. 141-148, 2001.

CHURELLA, H.R.; VIVIAN, V.M. Effect of phytic acid level in soy protein based infant formulas on mineral availability in the rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v. 37, n. 5, p. 1352-1357, 1989.

CLAUSEN, T.; DORUP, I. **Micronutrients, minerals and growth control**. In: SANDSTROM, B.; WALTER, P. (Eds.). Role of trace elements for health promotion and disease prevention. Basel : Karger, 1998. p. 84-92.

COPPEN, D.E.; DAVIES, N.T. Studies on the effects of dietary zinc dose on ⁶⁵Zn absorption in vivo and on the effects of Zn status on ⁶⁵Zn absorption and body loss in young rats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 57, p. 35-44, 1987.

COUZY, F.; MANSOURIAN, R.; LABATE, A.; GUINCHARD, S.; MONTAGNE, D.H.; DIRREN, H. Effect of dietary phytic acid on zinc absorption in the healthy elderly, as assessed by serum concentration curve tests. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, n. 80, p. 177-182, 1998.

CURTY, M.G.; CRUZ, A.C. **Guia para apresentação de trabalhos acadêmicos, dissertações e teses**. Maringá: Dental Press, 2001. 104 p.

DAVIDSSON, L.; ALMGREN, A.; SANDSTRÖM, B.; JUILLERAT, M.A.; HURRELL, R.F. Zinc absorption in adult humans: the effect of protein sources added to liquid test meals. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, n. 75, p. 607-613, 1996.

DAVIES, N.T.; OLPIN, S.E. Studies on the phytate : zinc molar contents in diets as a determinant of zinc availability to young rats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, n. 41, p. 590, 1979.

DISILVESTRO, R.A. Zinc in relation to diabetes and oxidative disease. **Journal of Nutrition**, Bethesda, n. 130, p. 1509-1511, 2000. Supplement.

DOMENE, S.M.A. **Estudo do valor nutritivo mineral do farelo de arroz. Utilização do zinco, ferro, cobre e cálcio pelo rato em crescimento.** Campinas, 1996. 104 p. Tese (Doutor em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

DORETTO, M.C.; SIMÕES, S.; PAIVA, A.M.R.; OSÓRIO-NETO, E. Zinc, magnesium and copper profiles in three experimental models of epilepsy. **Brain Research**, Amsterdam, v. 956, n. 1, p. 166-172, November, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Amino-acid content of food and biological data on proteins. FAO Nutritional Studies, Roma, n. 24, 1970.

FICK, K.R.; McDOWELL, L.R.; MILES, P.H.; WILKINSON, N.S.; FUNK, J.D.; CONRAD, J.H.; DAYRELL, M.S.; ROSA, I.V. **Latin american mineral research.** Gainesville: University of Floryda, 1980. p. 10-20.

FICKEL, J.J.; FREELAND-GRAVES, J.H.; ROBY, M.J. Zinc tolerance tests in zinc deficient and zinc supplemented diets. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 43, p. 47, 1986.

FISBERG, M.; BRAGA, J.A.A.A.P. **Oligoelementos.** In: NÓBREGA, F.J. Distúrbios da nutrição. Rio de Janeiro: Revinter. 1998, p. 353-354.

FORBES, R.M.; ERDMAN, J.W., Jr. Bioavailability of trace mineral elements. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 3, p. 213-231, 1983.

FRAKER, P.J.; KING, L.E.; LAAKKO, T.; VOLLMER, T.L. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1399-1406, 2000. Supplement.

FRANCO, L.V. Papel del zinc en la nutrición. **Revista Mexicana de Pediatría**, v. 62, n. 4, p. 157-164, 1995.

FRANZ, K.B.; KENNEDY, B.M.; FELLERS, D.A. Relative bioavailability of zinc using weight gain of rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 110, n. 11, p. 2263-2271, 1980.

FREDERICKSON, C.J. Importance of zinc in the central nervous system. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1471-1483, 2000. Supplement.

FREELAND-GRAVES, J.H.; EBANGIT, M.L.; HENRIKSON, P.J. Alterations in zinc absorption and salivary sediment zinc after a lacto-ovo-vegetarian diet. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 33, n. 8, p. 1757-1766, 1980.

GIBSON, R.S.; YEUDALL, F.; DROST, N.; MTITIMUNI, B.; CULLINAN, T. Dietary interventions to prevent zinc deficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, n. 2, p. 484-487, 1998. Supplement.

GOENA, M., MARZO, F., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, L., TOSAR, A., FRÜHBECK, G., SANTIDRIÁN, S. Effect of the raw legume *Vicia ervilia* on the muscle and liver protein metabolism in growing rats. Revista Española de Fisiología, Pamplona, n. 45, p.55-60, 1989. Suplemento.

GRAF, E. Applications of phytic acid. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Champaign, v. 60, n. 11, p. 1861-1867, 1983.

HAMBIDGE, M. Human zinc deficiency. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1344-1349, 2000. Supplement.

HARDIE-MUNCY, D.A.; RASMUSSEN, A.I. Interrelationships between zinc and protein level and source in weaning rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 109, p. 321, 1979.

HARLAND, B.F.; MORRIS, E.R. Phytate: a good or a bad food component? **Nutrition Research**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 733-754, 1995.

HENRIQUES, G.S.; COZZOLINO, S.M.F. Determination of metallothionein levels in tissues of young rats fed zinc-enriched diets. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 3, p.163-169, Set/Dez, 2001.

HOADLEY, J.E., LEINART, A.S.; COUSINS, R.J. Kinetic analysis of the uptake and serosal transfer by vascularly perfused rat intestine. **American Journal of Physiology**, v. 252, p. G825, 1987.

HUBER, A.M.; GERSHOFF, S.N. Effects of dietary zinc on enzymes in the rat. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 103, p. 1175-1973, 1973.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry. The nomenclature of cyclitols. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 5, n. 1, p. 1-12, 1968.

IQBAL, T.H.; LEWIS, K.O.; COOPER, B.T. Phytase activity in the human and rat small intestine. **Gut**, London, v. 35, n. 9, p. 1233-1236, 1994.

JOHNSON, P.E.; HUNT, J.R.; RALSTON, N.V.C. The effect of past and current dietary Zn intake on Zn absorption and endogenous excretion in the rat. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 118, n. 10, p. 1205-1209, 1988.

KAMAO, M.; TSUGAWA, N.; NAKAGAWA, K.; KAWAMOTTO, Y.; FUKUI, K.; TAKAMATSU, K.; KUWATA, G.; IMAI, M.; OKANO, T. Absorption of calcium, magnesium, phosphorus, iron and zinc in growing male rats fed diets containing either phytate-free soybean protein or soybean protein isolate or casein.

Journal of Nutrition Science and Vitaminology, Tokyo, v. 46, n. 1, p. 34-41, 2000.

KELSAY, J.L.; JACOBS, R.; PRATHER, E.S. Effect of fiber from fruits and vegetables on metabolic response of human subjects. III. Zinc, copper, and phosphorus balances. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 32, n. 11, p. 2307-2311, 1979.

KHAN, A.; VOHRA, P.N.; KRATZER, F.H. The effect of protein level and dietary guar gum and pectin on copper and zinc utilization in chicks. **Nutrition Reports International**, v. 36, n. 1, p. 193-200, 1987.

KING, J.C. Assessment of zinc status. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 120, n. 11, p. 1474-1479, 1990. Supplement.

KING, J.C.; SHAMES, D.M.; WOODHOUSE, L.R. Zinc homeostasis in humans. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1360-1366, 2000. Supplement.

KRATZER, F.H.; VOHRA, P. **Chelates in nutrition**. Florida: CRC Press, 1986. 169p.

KREBS, N.F. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1374-1377, 2000. Supplement.

LÖNNERDAL, B.; JAYAWICKRAMA, L.; LIEN, E.L. Effect of reducing the phytate content and of partially hydrolyzing the protein in soy formula on zinc and copper absorption and status in infant rhesus monkeys and rat pups. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 69, p. 490-496, 1999.

LÖNNERDAL, B. Dietary factors influencing zinc absorption. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1378-1383, 2000. Supplement.

LÖNNERDAL, B. Phytic acid-trace element (Zn, Cu, Mn) interactions. **International Journal of Food Science and Technology**, Bethesda, v. 37, p. 749-758, 2002.

LOPEZ, H.W.; COUDRAY, C.; BELLANGER, J.; YOUNES, H.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Intestinal fermentation lessens the inhibitory effects of phytic acid on mineral utilization in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 128, p. 1192-1198, 1998.

LOPEZ, H.W.; VALLERY, F.; VERNY, M.A.L.; COUDRAY, C.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Dietary phytic acid and wheat bran enhance mucosal phytase activity in rat small intestine. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 2020-2025, 2000. Supplement.

MacDONALD, R.S. The role of zinc in growth and cell proliferation. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1500-1508, 2000. Supplement.

MAHAN, L.K.; STUMP, S.E. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9. ed. São Paulo: Rocca, 1998.

MARREIRO, D.N.; FISBERG, M.; COZZOLINO, S.M.F. Considerações sobre o estado nutricional relativo ao zinco na obesidade. **Cadernos de Nutrição: Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 16, p. 31-40, 1998.

MARET, W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1455-1458, 2000. Supplement.

McCALL, K.A.; HUANG, C.C.; FIERKE, C.A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1437-1446, 2000. Supplement.

MOCCHIGIANI, E.; MUZZIOLI, M. Therapeutic application of zinc in human immunodeficiency virus against opportunistic infections. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1424-1431, 2000. Supplement.

MORRIS, E.R., ELLIS, R. Bioavailability to rats of iron and zinc in wheat bran. Response to low-phytate bran and effect of the phytate / zinc molar ratio. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 110, n. 10, p. 2000-2010, 1980.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recommended dietary allowances**. 10. ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1989. p. 205-213.

OBERLEAS, D. **Phytates**. In: NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Toxicants occurring naturally in foods. Washington: National Academy of Sciences, 1973. p. 363-371.

OBERLEAS, D.; HARLAND, B. Phytate content of foods: effect on dietary zinc bioavailability. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 79, n. 4, p. 433-436, Oct. 1981.

O'DELL, B.L.; SAVAGE, J.E. Effect of phytic acid on zinc bioavailability. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, n. 103, p. 304-306, 1960.

O'DELL, B.L.; BROWNING, J.D.; REEVES, P.G. Zinc deficiency increases the osmotic fragility of rat erythrocytes. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 117, p. 1883-1889, 1987.

O'DELL, B.L. Role of zinc in plasma membrane function. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1432-1436, 2000. Supplement.

OLOGHOBO, A.D., FETUGA, B.L. Distribution of phosphorus and phytate in some Nigerian varieties of legumes and some effects of processing. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, n. 1, p. 199-201, 1984.

OLIVEIRA, A.C.; QUEIROZ, K.S.; HELBIG, E.; REIS, S.M.P.M.; CARRARO, F. O processamento doméstico do feijão-comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência, estaquiose e verbascose. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 51, n. 3, 2001.

OLIVEIRA, A.C.; REIS, S.M.P.M.; CARVALHO, E.M.; PIMENTA, F.M.V.; RIOS, K.R.; PAIVA, K.C.; SOUSA, L.M.; ALMEIDA, M.; ARRUDA, S.F. Adições crescentes de ácido fólico à dieta não interferiram na digestibilidade da caseína e ganho de peso em ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 211-217, 2003.

PEARCE, L.L.; WASSERLOOS, K.; CROIX, C.M.S.; GANDLEY, R.; LEVITAN, E.S.; PITT, B.R. Metallothionein, nitric oxide and zinc homeostasis in vascular endothelial cells. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1467-1470, 2000. Supplement.

PELLET, P.L., YOUNG, V.R. **Nutritional evaluation of protein foods**. Tokyo: The United Nations University, 1980. 154p.

PÉREZ-LLAMAS, F.; DIEPENMAAT-WOLTERS, M.G.E.; ZAMORA, S. In vitro availability of iron and zinc: effects of the type, concentration and fractions of digestion products of the protein. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 76, p. 727-741, 1996.

PRASAD, A.S.; HALSTED, J.A.; NADIMI, M. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagy. **American Journal of Medicine**, New York, v. 31, p. 532-546, 1961.

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

REEVES, P.G. Adaptation responses in rats to long-term feeding of high-zinc diets: emphasis on intestinal metallothionein. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 6, n. 1, p. 48-54, 1995.

RICHARDS, M.P.; COUSINS, R.J. Metallothionein and its relationship to the metabolism of dietary zinc in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 106, n. 11, p. 1591-1599, 1976_a.

RICHARDS, M.P.; COUSINS, R.J. Zinc-binding protein: relationship to short term changes in zinc metabolism. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 153, n. 1, p. 52-56, 1976_b.

RINK, L.; KIRCHNER, H. Zinc-altered immune function and cytokine production. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1407-1411, 2000. Supplement.

ROTH, H.P.; KIRCHGESSNER, M. The effect of dietary fats on the hemolysis resistance of the erythrocyte membrane during alimentary zinc and calcium deficiency in rats. **Z. Ernährungswiss**, n. 30, p. 98-108, 1991.

SAHAGIAN, B.M.; HARDING-BARLOW, I.; PERRY-JR, H.M. Transmural movements of zinc, manganese, cadmium and mercury by rat small intestine. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 93, n. 3, p. 291-&, 1967.

SHAY, N.F.; MANGIAN, H.F. Neurobiology of zinc-influenced eating behavior. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1493-1499, 2000. Supplement.

SOLOMONS, N.W.; JACOB, R.A. Effect of heme and nonheme iron on the absorption of zinc. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 76, n. 5, p. 1252-1252, 1979.

SOLOMONS, N.W.; COUSINS, R.J. Zinc. In: SOLOMONS, N.W.; ROSENBERG, I.H., (Ed.); LISS, A.R. **Absorption and malabsorption of mineral nutrients**. New York, 1984. 125 p.

STARCHER, B.C.; GLAUBER, J.G.; MADARAS, J.G. Zinc absorption and its relationship to intestinal metallothionein. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 110, n. 7, p. 1391-1397, 1980.

SUBRAMANIAN, K.S. Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 291-319, 1996.

TAMARA, T.; GOLDENBERG, R.L. Zinc nutrition and pregnancy outcome. **Nutrition Research**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 139-181, 1996.

TÜRK, M.; SANDBERG, A.S.; CARLSSON, N.G.; ANDLID, T. Inositol hexaphosphate hydrolysis by baker's yeast. Capacity, kinetics, and degradation products. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 1, p. 100-104, 2000.

TURNLUND, J.R.; KING, J.C.; KEYES, W.R.; GONG, B.; MICHEL, M.C. A stable isotope study of zinc absorption in young men: effects of phytate and α -celulose. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 40, n. 1, p. 1071-1077, 1982.

US NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (USA). **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids**. Washington DC: National Academy Press, 2000. 506 p. (A report on the antioxidants and related compounds. Subcommittees on Upper Reference Intake Levels of Nutrients and Interpretation of Uses of Dietary Reference Intakes and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Food and Nutrition Board).

VAN SOEST, P.J.; WINE, R.H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant wall constituents. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v. 50, n. 1, p. 50-55, 1988.

WADA, L.; TURNLUND, J.R.; KING, J.C. Zinc utilization in young men fed adequate and low zinc intakes. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 115, n. 1, p. 1345-1354, 1985.

WAPNIR, R.A.; GARCIA-ARANDA, J.A.; MEVORACH, D.E.K.; LIFSHITZ, F. Differential absorption of zinc and low-molecular-weight ligands in the rat gut in protein-energy malnutrition. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 115, p. 900, 1985.

WAPNIR, R.A.; STIEL, L. Zinc intestinal absorption in rats: specificity of amino acids as ligands. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 116, n. 11, p. 2171-2179, 1986.

WAPNIR, R.A. **Protein nutrition and mineral absorption**. Florida: CRC Press, 1990. 334 p.

WAPNIR, R.A. Zinc deficiency, malnutrition and the gastrointestinal tract. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1388-1392, 2000. Supplement.

WOOD, R.J. Assessment of marginal zinc status in humans. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1350-1354, 2000. Supplement.

WOODHOUSE, L.R.; SUTHERLAND, B.; LEDERER, L.J.; LOWE, N.M.; KING, J.C. The effect of zinc intake on erythrocyte fragility in humans. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 12, n. 4, p. A1270-A1270, 1998.

ZÚÑIGA, J.M.; MARÍ, J.A.T.; MILOCCO, S.N.; PIÑEIRO. **Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal**. 1.ed. Aravaca: McGraw-Hill, 2001. 682p.

