UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

BIODISPONIBILIDADE DE FERRO EM DIETA
REGIONAL DE SÃO PAULO

CÉLIA COLLI

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. JOSÉ CARLOS BARBÉRIO

São Paulo
1987

11528

Ao Rubens

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Carlos Barbêrio pela orientação segura.

Ao Prof. Dr. Franco M. Lajolo pela dedicação e apôio constan
tes.

Aos Drs. Flávio Midio, amigo sempre presente, Primavera Bo-
relli e Júlio Kijner, do Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas.

Aos Drs. Silvia M. F. Cozzolino e Fernando S. Moreno e as
pós-graduandas Lúcia Pedrosa, Renata Cintra e Roseane Porto
Dantas, do Laboratório de Nutrição.

Ao Sr. Carlos Henrique Mesquita, do IPEN, pela amizade.

A Silvania Neves, zootecnista responsável pelo biotério da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas -USP.

A João da Penha e Sandra Maria M. Nascimento, preciosos cola-
boradores, funcionários do Laboratório de Nutrição.

A Mirna Greco, estagiária do Laboratório de Nutrição, pela
colaboração técnica.

À FINEP e à Associação Brasileira de Indústrias de Alimentos
(ABIA) pelo suporte financeiro.

A

Beatriz Cordenusi,

Elisabeth Garcia,

Flávio Finardi Filho,

Heloisa Tavares,

Leda Saba, e

Maria Helena Buazar,

pelo carinho de sempre.

S U M Á R I O

	pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Preparação e análise das rações	11
3.1.1. Material	11
3.1.1.1. Ração à base de caseína	11
3.1.1.2. Ração à base de feijão	14
3.1.1.3. Ração à base da dieta regional de São Paulo	15
3.1.2 Métodos	18
3.1.2.1. Preparação das rações	18
3.1.2.2. Determinação da composição centesi- mal das rações	19
3.1.2.3. Determinação de minerais	20
a) Ferro total	20
b) Ferro não hemínico	20
c) Cálcio e fósforo	21
3.2. Repleção de hemoglobina em ratos anêmicos ...	21
3.2.1. Material	21
3.2.1.1. Animais	21
3.2.2. Métodos	21
3.2.2.1. Obtenção de ratos anêmicos	21
3.2.2.2. Repleção da hemoglobina	23

	pág.
3.3. Determinação da porcentagem de ferro dialisável das rações em estudos	24
3.3.1. Material	24
3.3.2. Métodos	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Composição de dieta regional	26
4.2. Padronização das condições de obtenção de <u>ra</u> tos anêmicos	30
4.3. Valor biológico do ferro em dietas	39
4.4. Determinação do ferro dialisável	46
5. CONCLUSÕES	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
7. RESUMO	69
8. SUMMARY	70

1. INTRODUÇÃO

O ferro, elemento presente em todas as células do organismo e envolvido com um grande número de reações bioquímicas, tem uma importância nutricional largamente conhecida⁽¹⁹⁾.

A anemia nutricional é de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) um dos maiores problemas de saúde pública de países em desenvolvimento.

É conceituada como: "a condição na qual a concentração de hemoglobina está abaixo do nível considerado normal para um dado indivíduo, devido à deficiência de um ou mais dos nutrientes necessários para a hematopoiese; ou alternativamente, como a condição na qual a concentração de hemoglobina se eleva com o aumento de nutriente(s) absorvido(s)". Sua maior causa é a deficiência de ferro.

Os levantamentos da prevalência da anemia em uma população, para caracterização dos grupos de risco aos quais dirigir campanhas de suplementação ou fortificação de alimentos são metas a serem cumpridas necessariamente para a resolução do problema.

Embora não diretamente letal ao organismo⁽⁸⁾, a anemia por deficiência de ferro prejudica grandemente as atividades fundamentais do ser humano, tanto no contexto individual, como no social.

A relação que existe entre a ocorrência de anemia e condições sócio-econômicas e culturais de uma população é evidente.

GRIVETTI⁽²⁶⁾, em ensaio feito sobre o tema que denominou Nutrição Cultural aponta a ampla associação entre o tipo de dieta sugerida, o estado nutricional e o comportamento humano.

Assim, quando se pensa na melhoria da qualidade nutricional de uma dieta, deve-se ter em mente que a cultura é considerada o seu maior determinante.

Por outro lado, fatores sócio-econômicos dificultam a possibilidade da escolha adequada de alimentos e estão associados a condições higiênico-sanitárias insatisfatórias.

Essas condições, em sua interação, explicam a eleva da incidência de anemia em países como o nosso⁽³⁾⁽⁹⁾⁽²¹⁾⁽⁶⁵⁾⁽⁷³⁾.

O ferro, não obstante ser um dos minerais mais abundantes na natureza, tem uma biodisponibilidade geralmente limitada, e espécies superiores frequentemente apresentam esta dos de deficiência do elemento.

O conceito de biodisponibilidade, utilizado inicialmente no campo da farmacologia, aplicável aos estudos na área de Nutrição expressa a fração de um nutriente aportado por

um alimento ou dieta, que é absorvido e metabolizado pelo organismo⁽³²⁾.

O ferro está presente em todas as células do organismo como parte de metaloproteínas, que podem ser classificadas em três grupos⁽³¹⁾⁽⁸⁵⁾.

O primeiro é o de proteínas que caracterizam-se por sua habilidade em ligar oxigênio reversivelmente; a esse grupo pertencem a hemoglobina e a mioglobina. O ferro proveniente dessas duas moléculas corresponde a cerca de 2,5 e 1,5g respectivamente, no homem adulto.

O segundo grupo é o de proteínas que formam complexos reversíveis com o elemento e cuja função principal é de transporte e armazenamento. Assim, o ferro de ferritina e hemossiderina corresponde a 0,5-1,0g no homem adulto e menos do que 0,5g na mulher adulta. O ferro de transferrina, a proteína de transporte, é cerca de 3mg em ambos os casos.

Ao terceiro grupo pertencem o extenso número de enzimas relacionadas, na maioria dos casos, com reações de oxido-redução e que equivale a um total de 6 a 8mg do elemento.

O balanço de ferro no organismo é mantido por ajustes fisiológicos dos mecanismos de absorção.

NARASINGA RAO⁽⁵⁰⁾, sistematizando as fases de absorção de ferro, subdividiu-as em três: intra-luminal, mucosa e corpórea.

A fase intra-luminal em que o alimento é digerido

por enzimas gástricas e pancreáticas no lúmen intestinal. É nessa fase que as interações entre o ferro e componentes dos alimentos tem a sua maior influência.

A fase mucosa, que ocorre principalmente no duodeno e que se caracteriza pela retirada, por receptores da célula mucosa, do ferro iônico liberado dos alimentos. Esse processo é dependente de energia⁽³⁷⁾⁽⁶⁸⁾.

Na última fase, dita corpórea o elemento é retirado pela transferrina e levado pelo sistema circulatório, ao fígado e tecidos hematopoiéticos.

Consideram-se dois "pools" de ferro no processo de absorção: o ferro hemínico, que normalmente representa uma parte menor (10-15% em países desenvolvidos) na ingestão total do elemento, e o ferro não hemínico, na forma de sais ligados ou não a componentes do alimento.

Ferro hemínico e não hemínico entram na célula mucosa por diferentes vias. O ferro não hemínico é liberado dos alimentos na forma solúvel e ionizada, ou como sais inorgânicos insolúveis. Considera-se que o ferro na forma solúvel seja o mais disponível para a absorção.

O ferro hemínico é absorvido intacto pela célula da mucosa. Há evidências de que uma heme-oxigenase catalise a quebra do grupo heme absorvido, levando à liberação do ferro⁽⁶⁰⁾⁽⁸³⁾.

A quantidade de ferro que atravessa a barreira do

epitêlio gastro-intestinal relaciona-se com o estado nutricional em ferro do organismo.

O transporte da mucosa intestinal para o plasma é limitante, e varia inversamente com as alterações no ferro corporal.

O controle da absorção intestinal do ferro pela mucosa do intestino delgado está estreitamente relacionado com o balanço entre dois compartimentos intra-celulares: a transferrina de transporte e a ferritina, de armazenamento⁽¹¹⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁸⁾⁽⁶⁹⁾.

Em situações de equilíbrio fisiológico, as necessidades de ferro são determinadas, em sua maior parte, pela quantidade de ferro perdido pelo organismo. Essas perdas são, em geral, devidas à descamação de superfícies epiteliais, às perdas de sangue pelo trato gastro-intestinal e à excreção biliar.

A absorção de ferro não hemínico é muito afetada pelo estado nutricional em ferro, o que não é observado com o ferro hemínico abaixo de poucos miligramas por refeição⁽³¹⁾⁽⁸⁴⁾.

A biodisponibilidade de ferro é, em primeiro lugar, determinada pela fração do mineral liberada pelo alimento e, em segundo lugar, pela solubilidade, peso molecular e estabilidade dos complexos formados com o ferro liberado.

Fatores como a digestibilidade do alimento, a pre -

sença de redutores e ligantes e o pH do trato gastro-intestinal, são imediatamente lembradas quando se trata dessa liberação.

Estes fatores são divididos em fatores facilitadores e fatores inibidores⁽¹⁶⁾⁽²⁰⁾.

Entre os chamados fatores facilitadores o ácido ascórbico e a carne são os mais importantes⁽¹⁶⁾.

STEKEL⁽⁷⁷⁾ relata que a absorção de ferro de fortificação em diferentes formulações varia de 3 a 12% dependendo de seu conteúdo em ácido ascórbico.

BERNER⁽⁷⁾ em revisões sobre os efeitos da proteína na biodisponibilidade de ferro aponta a importância da carne como agente facilitador da absorção pela liberação de peptídeos que formam, com o ferro, complexos solúveis de baixo peso molecular.

Por outro lado, outras proteínas, como a caseína, a gelatina e a proteína de soja tem ação contrária, liberando peptídeos que formam complexos insolúveis com o elemento.

Entre os fatores inibidores presentes nos alimentos podemos destacar os taninos contidos por exemplo, no chá e no café. Moléculas orgânicas, como os oxalatos e os fitatos, também são considerados inibidores da absorção de ferro⁽¹³⁾⁽²⁰⁾⁽⁴⁹⁾, embora no caso dos oxalatos a questão ainda não esteja esclarecida⁽⁸²⁾.

A questão da fibra como fator interferente ainda é

discutível. É considerada por alguns um inibidor modesto⁽¹⁶⁾ e contrariamente por outros um fator facilitador que, ligando o ferro, diminuiria a tendência de formação de hidróxidos pouco solúveis no intestino⁽⁶⁴⁾.

CLYDESDALE⁽¹³⁾, em ampla revisão sobre o tema, resalta a importância desses conceitos na escolha de uma forma de ferro para fortificação de alimentos. Assim, pirofosfatos, ortofosfatos, hidróxidos e óxidos são relativamente insolúveis em água, quando comparados com hidróxidos e cloretos⁽¹⁶⁾.

Diversos trabalhos desenvolvidos sobre o assunto⁽³⁸⁾ (48)(49)(53)(66)(75) mostram que a biodisponibilidade de ferro e de outros nutrientes é portanto o resultado de um conjunto de fatores.

Assim, a biodisponibilidade de ferro de uma dieta depende da forma em que o elemento se apresenta, das interações que se processam no lúmen intestinal e de variações inerentes ao organismo.

O estudo desses fatores, através de métodos já consagrados é importante, como aponta STEKEL⁽⁷⁶⁾, na medida em que define a possibilidade de absorção de ferro por populações de países em desenvolvimento e explicam a alta incidência de ane

mia nestas populações.

Um ponto de partida para possíveis modificações desse quadro é a caracterização dos alimentos mais consumidos em um país.

No Brasil, o inquérito feito em 1975, publicado no ESTUDO NACIONAL DE DESPESA FAMILIAR (ENDEF)⁽²⁵⁾ é um documento oficial de que se dispõe para a sistematização desses estudos.

Esse documento atesta a variedade dos hábitos alimentares da população brasileira e a importância de se avaliar, por regiões, as dietas mais consumidas, e os alimentos que as compõem.

A determinação quantitativa do ferro aportado pela dieta, e a avaliação de sua biodisponibilidade, são passos essenciais na direção dessas metas, constituindo o objetivo geral de nosso trabalho.

Paralelamente aos estudos de biodisponibilidade desenvolvem-se as técnicas para sua determinação. Segundo HALLBERG⁽³⁴⁾, a escolha entre eles depende, em grande parte, de seu custo.

O rato tem sido muito utilizado nos estudos de absorção e metabolismo do ferro⁽¹⁵⁾⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾⁽⁴¹⁾⁽⁶⁹⁾⁽⁸⁰⁾.

O rato anêmico é o modelo experimental utilizado na determinação da biodisponibilidade, pelo método chamado curativo⁽²⁾,

O parâmetro medido por esse método é o aumento da concentração de hemoglobina desses animais, quando alimentados com diferentes fontes de ferro que compõem as rações, a serem testadas. A restrição feita a esse método é a impossibilidade de extrapolar para seres humanos, os resultados obtidos⁽⁸¹⁾.

Uma alternativa que surgiu para os estudos de bio-disponibilidade foi a utilização de métodos "in vitro" como os descritos por NARASINGA RAO⁽⁴⁷⁾ e MILLER⁽⁵¹⁾.

Baseiam-se, fundamentalmente, na simulação da digestão do alimento ou dieta, seguida de uma diálise em membrana semi-permeável.

A porcentagem de ferro dialisado é, então, determinada e esse resultado segundo SCHRICKER⁽⁷²⁾ apresenta uma boa correlação com os métodos "in vivo" feitos em seres humanos.

2. OBJETIVOS

Determinar a biodisponibilidade de ferro de dieta Regional de S.Paulo (com base no ENDEF), em ratos anêmicos.

Determinar a porcentagem de ferro dialisável nessa dieta pelo método "in vitro" .

Comparar os resultados com os obtidos pelos mesmos métodos com dietas a base de caseína.

Fazer uma avaliação preliminar da adequação da dieta regional de S. Paulo em relação ao ferro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação e análise das rações

3.1.1 Material

3.1.1.1 Ração à base de caseína

Foram preparados dois tipos de ração à base de caseína, seguindo as especificações do COMMITTEE on Laboratory ANIMAL DIETS/NCR, cuja composição é descrita no Quadro 1.

QUADRO 1 - COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES À BASE DE CASEÍNA

	Ração de caseína controle %	Ração de caseína "livre de ferro" %
Caseína	20,0 (12)	20,0 (12)
DL-metionina	0,2	0,2
Bitartarato de colina	0,1	0,1
Óleo de soja	8,0	8,0
Mistura salina*	3,5	-
Mistura salina isenta de ferro	-	3,5
Mistura vitamínica	1,0	1,0
Celulose	1,0	1,0
Sacarose	10,0	9,0
Sacarose + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^{**}$	-	1,0
Amido de milho qsp	100,0	100,0

* a quantidade de ferro foi ajustada de forma a chegar na concentração presente na dieta regional.

** sempre que a concentração de ferro na caseína foi maior do que $70\mu\text{g/g}$, reduziu-se o teor de proteína na ração.

Nos Quadros 2 e 3, estão descritas as composições das misturas salina e vitamínica utilizadas nas rações à base de caseína.

QUADRO 2 - COMPOSIÇÃO DA MISTURA SALINA UTILIZADA NAS RAÇÕES À BASE DE CASEÍNA

Sais	g/kg
CaCO_3	367,80
KH_2PO_4	500,00
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,10
$\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	499,26
KIO_3	214,00
$\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$	221,11
MgO	40,32
ZnCO_3 (70-73% ZnO)	1,60
NaCl	74,00
K_2SO_4	174,20
$\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01

QUADRO 3 - COMPOSIÇÃO DA MISTURA VITAMÍNICA UTILIZADA NAS
RAÇÕES À BASE DE CASEÍNA

	g/kg	uI/kg
Cloridrato de tiamina	0,6	-
Riboflavina	0,6	-
Vitamina B6	0,7	-
Ácido nicotínico	3,0	-
Pantotenato de cálcio	1,6	-
Ácido fólico	0,2	-
Biotina	0,02	-
Cianocobalamina	0,001	-
Vitamina K	0,005	-
Vitamina A	-	400.000
Vitamina D3	-	100.000
Vitamina E	-	5.000
Sacarose qsq	1000	-

3.1.1.2 Ração à base de feijão

A ração à base de feijão foi formulada após a determinação da porcentagem de proteína do feijão carioca cozido em autoclave, seco e moído.

O feijão foi então colocado em porcentagem tal que fornecesse 20% de proteína.

A composição dessa ração consta do Quadro 4, abaixo.

QUADRO 4 - RAÇÃO À BASE DE FEIJÃO

Componentes	%
Feijão	73,0
Óleo de milho	8,0
Celulose	1,0
Mistura salina*	4,0
Mistura vitamínica*	1,0
Metionina	1,0
Amido qsp	100,0

* as misturas salina e vitamínica têm a mesma composição das utilizadas nas rações de caseína controle (Quadros 2 e 3).

3.1.1.3 Ração à base da dieta regional de São Paulo

A ração à base da dieta regional de São Paulo foi preparada com alimentos adquiridos em um supermercado local.

Os alimentos que a compõem constam do Quadro 4. A formulação dessa dieta foi baseada nos dados fornecidos pelo Estudo Nacional de Despesa Familiar (ENDEF-1978)⁽³⁴⁾.

De cada grupo de alimentos contantes da tabela do ENDEF foram escolhidos os que aportavam 75% ou mais de calorias do grupo. O déficit de calorias (25% ou menos) foi coberto pelos mesmos alimentos na proporção em que se apresentam dentro do grupo.

QUADRO 5 - COMPOSIÇÃO PORCENTUAL DA DIETA REGIONAL DE SÃO PAULO

Componentes	%
Cereais e derivados	
arroz	20,4
pão	8,0
Raízes, tubérculos e similares	
batata	6,4
farinha de mandioca	0,4
	cont.

continuação

Componentes	%
Leguminosas	
feijão carioca	4,7
Hortalças folhosas	
couve	0,3
repolho	0,3
Não-folhosos	
tomate	2,7
cebola	1,6
abóbora	0,7
abobrinha	0,7
beterraba	0,5
cenoura	0,5
chuchu	0,4
pepino	0,4
pimentão	0,4
Frutas	
banana nanica	2,9
laranja	3,2
limão	3,2
abacaxi	2,1
maçã	1,0
Carnes	
boi	4,8
porco	0,8
frango	3,2
salsicha	1,1
	cont.

continuação

Componentes	%
Ovos	
ovo de galinha	2,3
Leite	
leite de vaca	14,0
Óleos e gorduras	
óleo de soja	3,2
banha de porco	1,1
Açúcar e derivados	
açúcar de cana	8,7

3.1.2 Métodos

3.1.2.1 Preparação das rações

Os componentes da ração controle de caseína e de feijão foram misturados em homogeneizador de pás.

Os componentes sólidos da ração de caseína livre de ferro foram, em uma primeira etapa, misturadas manualmente. Em seguida essa mistura foi passada em peneira de plástico e homogeneizada em moinho de bolas.

Foi acrescentado o óleo e repetiu-se o processo por mais quatro vezes.

Todos os acessórios utilizados foram previamente desmineralizados em banho de HNO_3 a 20% e lavados com água desionizada.

Os alimentos componentes da dieta regional (Quadro 4) foram preparados da maneira normalmente utilizada pela população e secos em estufa ventilada a 60°C.

Após a secagem, foram pulverizados em moinho de facas e misturados em homogeneizador de pás.

A ração pronta foi armazenada em recipiente de plástico e conservada a 4°C.

3.1.2.2 Determinação da composição centesimal das rações

A composição centesimal das rações foi feita segundo os métodos preconizados pelo Instituto Adolfo Lutz⁽³⁶⁾ e pela ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS⁽⁴⁾. São os seguintes:

- a) Umidade - gravimetria em estufa a 105°C;
- b) Fração cinza - gravimetria em mufla a 550°C;
- c) Nitrogênio total - método de micro Kjeldahl (utilizou-se o fator 6,25 para conversão a proteína);
- d) Extrato etéreo - extração com éter etílico p.a. em extrator de Soxhlet;
- e) Fibra - método enzimático⁽⁵⁾.

A fração livre de nitrogênio foi determinada por diferença.

3.1.2.3 Determinação de minerais

a) Ferro total

As amostras das rações foram oxidadas em mufla a 550°C e solubilizadas com ácido nítrico a 20%.

A determinação de ferro foi feita por espectrofotometria de absorção atômica, utilizando-se o equipamento PERKIN ELMER modelo 373, e lâmpada de catodo oco.

As condições de calibração foram as seguintes:

- comprimento de onda: 248,3 nm;
- fenda: 0,2 nm;
- mistura de gases: acetileno/ar;
- tipo de chama: oxidante.

O padrão utilizado foi o FeCl_3 Merck (Titrisol), numa faixa de concentração de 0,5 a 5 $\mu\text{g/ml}$.

b) Ferro não hemínico

O ferro não hemínico foi determinado somente na ração à base da dieta regional de São Paulo, pelo método de Torrence⁽⁷⁹⁾ e Hallgren, modificado por Hallberg⁽³³⁾.

c) Cálcio e fósforo

A determinação desses três componentes da dieta regional foi feita segundo as técnicas analíticas do Instituto Adolfo Lutz⁽³⁶⁾.

3.2 Repleção de hemoglobina em ratos anêmicos

3.2.1 Material

3.2.1.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), machos, da linhagem Wistar, recém-desmamados pesando de 45-50 g e de criação do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Obtenção de ratos anêmicos (Fase I)

Os animais, alojados em gaiolas de aço inoxidável, foram alimentados com a ração à base de caseína, com bai

xa concentração de ferro, por períodos que variaram entre 35 e 45 dias, em quatro ensaios (nº 1 - 4). Nos ensaios 1 e 2 os animais foram colocados em gaiolas individuais, e nos ensaios 3 e 4, 2 animais por gaiola.

A ração e a água (desionizada) foram fornecidas "ad libitum".

Em um grupo de 6 a 10 animais, escolhidos por sorteio, foi controlado o consumo de ração a cada três dias e o peso semanalmente.

Após o período determinado, foram colhidas amostras de sangue através de corte feito na cauda dos animais, para a determinação da concentração da hemoglobina.

No segundo experimento, foram escolhidas aleatoriamente dez animais recém-desmamados para a determinação da concentração inicial da hemoglobina do grupo. O sangue foi colhido dos animais anestesiados, por punção cardíaca.

Ainda nesse experimento foi constituído um grupo controle alimentado com ração de caseína adequada quanto à concentração de ferro.

3.2.2.2 Repleção da hemoglobina (Fase II)

Os animais anêmicos, obtidos na Fase I, foram agrupados segundo a concentração de hemoglobina no sangue, de forma a se obter o menor coeficiente de variação intra e intergrupos. O número de animais, por grupo, foi de 6 a 10.

Foram testadas as rações à base da Dieta Regional de São Paulo, de feijão e de caseína com 70 e 35 $\mu\text{g/g}$ de ferro, fornecidas "ad libitum" por períodos de 7 a 12 dias.

Após esse período, procedeu-se à coleta de sangue como já descrito no item 3.2.2.1. No entanto, foram feitas também coletas de sangue em intervalos de 4 dias em pelo menos um dos grupos constituídos para cada ração testada.

A partir da diferença de peso e de concentração de hemoglobina, calculou-se a quantidade de ferro incorporado durante o período de repleção (ΔFe). Assume-se que o volume de sangue dos animais corresponde a 0,067% de seu peso corporal e que a porcentagem de ferro na hemoglobina é de 0,355% (39).

A porcentagem de ferro absorvido foi calculada pela relação entre ΔFe e quantidade de ferro consumido.

3.3 Determinação da porcentagem de ferro dialisável das rações em estudo

3.3.1 Material

As amostras das rações à base de caseína e da Dieta Regional de São Paulo foram acrescidas de água em quantidade correspondendo a 2,5 vezes o seu peso.

Após a homogeneização o pH foi levado para 2 com HCl 0,1 N e as amostras foram conservadas em congelador a -20°C.

3.3.2 Método

A porcentagem de ferro dialisável foi determinada pelo método "in vitro" descrito por Miller (47).

Para tanto, foi estabelecida a concentração de ferro não hemínico de amostras da Dieta Regional de São Paulo, como descrito no item

A determinação radiométrica da porcentagem de ferro dialisado foi feita somente nessa dieta. O traçador em-

pregado foi o $^{59}\text{FeCl}_3$ (Amersham) com 100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de atividade específica.

As medidas de radioatividade foram feitas em contador sólido de cintilações, de NaI (Tl) tipo poço acoplado a espectrômetro (modelo nuclear Chicago).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição de Dieta Regional

O objetivo primeiro de nosso trabalho é o de avaliar a biodisponibilidade de ferro em uma dieta que corresponda, o máximo possível, à consumida pela população de São Paulo.

Assim, partindo dos resultados do inquérito do ENDEF⁽²⁵⁾, preparamos essa dieta que, depois de seca, foi utilizada como ração experimental.

A avaliação de sua adequação, feita a partir da composição centesimal da ração (tabelas I e II), mostra-nos que essa dieta não satisfaz às necessidades energéticas diárias de adultos normais que, conforme as recomendações da FAO/OMS,⁽⁵⁵⁾⁽⁵⁶⁾ corresponde a 3100 kcal e 2300 kcal para homens e mulheres, respectivamente.

A ingestão diária de 54 g de proteína a partir da dieta está acima das recomendações, embora não esteja implícito que o aproveitamento da proteína seja adequado. Uma avaliação do valor biológico dessa proteína não foi objetivo nosso.

No entanto, vale ressaltar que a dieta formulada por nós, com base nos dados do ENDEF, corresponde à média das dietas consumidas pela população do Estado.

TABELA I - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS RAÇÕES À BASE DE
DIETA REGIONAL DE SÃO PAULO (DRSP)

Umidade	6,2
Cinzas	2,2
Proteína	11,7
Lipídeos	11,8
Fibra	6,3
Extrato livre de nitrogênio	61,8
<hr/>	
Energia (kcal/g)	4,00
<hr/>	
Ferro (g/g)	33
Cálcio (mg%)	257
Fósforo (mg%)	180
<hr/>	

TABELA II - COMPOSIÇÃO DA DIETA REGIONAL DE SÃO PAULO (DRSP)⁽¹⁾

Componentes	Ingestão diária		Necessidades diárias ⁽³⁾	
	DRSP ⁽¹⁾	DRSP ⁽²⁾	Mulher adulta	Homem adulto
Energia (kcal)	1830	1529	2300	3100
Proteína (g)	54	46	41	49
Lipídeos (g)	54	23	15-25	15-25
Carboidratos (g)	282	285	285	
Minerais (g)	10	11		
Ferro (mg)	15	12	14-28 ⁽⁴⁾	5- 9
Cálcio (mg)	388	313	400-500	400-500
Fósforo (mg)	823	1965	800	800

(1) Para uma ingestão diária média de 895 g segundo o ENDEF/1974.

(2) Dados reproduzidos de estudo feito com a dieta da população de renda menor do que 2 salários mínimos (<2SM) ⁽⁵⁹⁾.

(3) Segundo a FAO/OMS. ⁽⁵⁵⁾(56)

(4) Segundo a RDA ⁽⁶³⁾

Segundo Campana⁽¹¹⁾ em sua análise final de vários inqueritos sobre o consumo de alimentos em diversas regiões brasileiras (ENDEF incluído), há uma relação evidente entre o nível sócio-econômico e o consumo de energia e a qualidade da proteína ingerida pela população.

Quando comparamos pela tabela II a composição da dieta do Estado com a da população de baixa renda feita por Porto Dantas⁽⁵⁸⁾, observamos diferenças quantitativas no aporte diário de nutrientes.

Especificamente quanto à ingestão diária de ferro, podemos dizer que ambas estão no limite da adequação para a mulher adulta (14-28 mg/d)⁽³⁴⁾.

Sabemos que essas recomendações assumem uma absorção de 10% do ferro consumido. No entanto, dados obtidos no Programa de Prevenção de Deficiência de Ferro na América Latina⁽¹⁾ revelam uma absorção de 3% a partir de uma dieta de arroz e feijão formulada com base no ENDEF. O mesmo valor foi obtido por Hallberg⁽³³⁾ com dieta semelhante.

4.2 Padronização das condições de obtenção de ratos anêmicos

A composição centesimal das rações à base de caseína com baixo teor de ferro, utilizadas nessa fase de depleção, e a da caseína com concentração de ferro adequada (usada como controle) constam da Tabela III. Devido ao alto teor de ferro presente na caseína e em outros componentes da ração, houve necessidade de se reduzir a concentração de proteína de 17% para 10% para se manter a concentração ao redor dos 15 µg/g.

Uma forma alternativa de indução de anemia seria o sangramento repetido dos animais⁽⁵⁷⁾. No entanto, a perda de proteína e de minerais ocasionada por esse processo seria uma agressão bioquímica que traria variáveis não controláveis ao ensaio.

Por outro lado, a anemia mais branda resultante da redução menos drástica no teor de ferro da ração cria um modelo experimental mais condizente com o grau de anemia por deficiência de ferro, encontrado em uma população como a nossa.

A avaliação do crescimento dos animais alimentados com dietas com baixo teor de ferro (14 µg/g) mostra que essa redução não leva a uma alteração no ganho de peso, quando esses animais são comparados com o grupo alimentado com ração

TABELA III - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS RAÇÕES DE CASEÍNA COM BAIXO TEOR DE FERRO E DE CASEÍNA CONTROLE

Ensaio nº	Caseína baixo teor				Caseína Controle
	1	2	3	4	
Componentes					
Umidade	10,0	9,6	8,1	9,2	8,8
Cinzas	2,8	2,4	3,1	3,0	2,6
Proteína	17,2	10,8	10,5	17,0	10,0
Lipídeos	8,0	8,0	8,0	8,3	9,0
Fibra*	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Extrato livre de nitrogênio	61,0	68,2	69,3	61,5	68,6
Energia (kcal)	3,85	3,88	3,91	3,89	3,95
Ferro (mg)	14	19	16	19	32

* Valores de formulação

com teor de ferro adequado ($32 \mu\text{g/g}$). Contudo, houve uma diferença significativa no coeficiente de eficácia protéica (CEP) que indica menor aproveitamento da caseína da ração com baixo teor de ferro (Tabela IV e Figura 1).

Esse dado não corresponde ao obtido por outros autores⁽²⁸⁾⁽⁷³⁾ em experimentos semelhantes. Nesse sentido, observou-se a partir de vários ensaios que a redução de ferro nas rações não altera o ganho de peso e o consumo de ração.

Sendo assim, uma avaliação da proteína nessas condições deveria ser comprovada por meio de outros índices como o NPR e o CEA.

Na Tabela V, em que se tem o valor de hemoglobina final obtida em dois ensaios de depleção, observa-se que esses valores relacionam com o consumo diário de ferro. Assim, partindo-se do valor de hemoglobina de $11,4 \text{ g/dl}$ obtido no início do período de depleção, chegou-se a valores de $6,5$ e $8,3 \text{ g/dl}$ para consumos diários de $0,13$ e $0,23 \text{ mg}$ de ferro, respectivamente.

Dados obtidos por outros autores⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾⁽⁴¹⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁷³⁾ mostram a relação entre os teores de ferro (como FeSO_4) na ração e a concentração de hemoglobina em ensaios de depleção feitos em ratos, por períodos de 35d, e que podem ser resumidos conforme relação abaixo:

TABELA IV - GANHO DE PESO E CONSUMO DE PROTEÍNA DE ANIMAIS ALIMENTADOS COM RAÇÕES À BASE DE CASEÍNA COM BAIXO TEOR DE FERRO E CONTROLE, POR 28 DIAS

N	Ferro ($\mu\text{g/g}$)	Proteína (%)	ΔP (g)	Consumo de proteína (g)	CEP
10	19	11,0	118 ± 16	38 ± 4	$3,065 \pm 0,226^*$
9	32	10,0	115 ± 17	33 ± 4	$3,448 \pm 0,123$

* diferença significativa $P < 0,05$

FIGURA 1: CURVAS DE CRESCIMENTO

RAÇÕES DE CASEÍNA a 11%:

○ 32 µg/g de ferro

△ 19 µg/g de ferro

TABELA V - GANHO DE PESO, CONSUMO DE FERRO E CONCENTRAÇÃO FINAL DE HEMOGLOBINA DE RATOS ALIMENTADOS COM RAÇÕES À BASE DE CASEÍNA COM BAIXO TEOR DE FERRO, E CASEÍNA CONTROLE DURANTE 35 a 45 DIAS.

Ensaio nº	n	Ferro ($\mu\text{g/g}$)	Δt (dias)	Consumo de ferro mg/d	Peso Inicial (g)	Peso final (g)	ΔP (g)	Hemoglobina final (g/dl)
1	8	14	39	$0,13 \pm 0,02$	$46,4 \pm 3,1$	$180,4 \pm 30,2$	$134,4 \pm 29,4$	$6,5 \pm 0,9$
2	10	19	43	$0,23 \pm 0,02$	$43,6 \pm 1,7$	$219,7 \pm 18,6$	$176,2 \pm 19,4$	$8,3 \pm 1,3$
*		32	43	$0,38 \pm 0,03$	$43,4 \pm 1,5$	$221,8 \pm 19,4$	$178,4 \pm 19,3$	$12,7 \pm 0,6$
3**	7	16	41	$0,18 \pm 0,01$	$52,3 \pm 2,3$	$185,4 \pm 25,0$	$133,1 \pm 24,3$	$11,1 \pm 1,0$
4**	7	19	35	$0,19 \pm 0,01$	$52,5 \pm 3,9$	$195,5 \pm 13,3$	$143,0 \pm 11,4$	$12,5 \pm 2,3$

*O valor médio de hemoglobina inicial no começo do experimento corresponde a $11,4 \pm 0,4 \text{ g/dl}$ (n = 10)

**Experimento feitos com dois animais por gaiola

n - corresponde ao número de gaiolas

Teor de ferro na ração ($\mu\text{g/g}$)	Concentração final de hemoglobina (g/dl)
4-7	5
17	9
>25	13

A redução da concentração de hemoglobina dos animais alimentados com as rações com teores de ferro entre 14 e 20 $\mu\text{g/g}$ em relação ao controle é de cerca de 40%.

É importante que se comente o fato de a média de concentração de hemoglobina do grupo controle ($12,7 \pm 0,6$ g/dl) não atingir os valores normais para o rato de 50 dias (15 g/dl).

Embora sabendo do cuidado que se deve ter com esse tipo de comparação (dadas as variações do método entre laboratórios) esse dado sugere que os 32 mg/kg de ferro na ração estão aquém das necessidades do rato.

Além desses ensaios, foram feitos mais dois, em que se utilizaram animais de maior peso (com 50 g ou mais) e com dois animais por gaiola. Nesses, apesar de o consumo médio diário por gaiola ter sido de 0,18 mg de ferro, obteve-se a concentração média de hemoglobina de 12,5 e 11,4 g/dl, respectivamente.

Uma explicação possível, fundamentada em dados da literatura⁽⁸⁶⁾, para essa pouca redução na concentração de hemoglobina desses animais seria a ingestão de fezes e, em conse

quência, uma absorção maior de ferro nesses dois grupos.

Por outro lado, o peso maior dos animais no início do período de depleção pode significar níveis maiores de ferro de reserva o que dificultaria a redução da concentração de hemoglobina com as rações com concentração de ferro nos níveis utilizados.

Além desses 4 experimentos descritos, foi feito um outro no qual se modificou a composição da ração basal, aumentando-se a concentração de sacarose e diminuindo-se a de amido, com base em experimentos que demonstram que a sacarose diminui a biodisponibilidade de ferro nessa substituição⁽⁴³⁾. Esses dados sugerem que animais de menor peso, colocados em gaiolas individuais, respondem melhor nesse período de depleção.

Nesse experimento também lavou-se a caseína - que apresentava um teor de ferro de cerca de 65 µg/g - com uma solução de EDTA (ác. etileno diaminotetracético) a 1%.

É importante comentar a importância de se determinar a concentração de ferro nos componentes da ração. Além da caseína, o amido e a celulose também apresentam teores altos (40 µg/g e 100 µg/g) e variável a cada lote.

Segundo Fritz⁽²⁹⁾ que padronizou o método de repleção da hemoglobina, o teor de 5 a 7 mg/kg nas rações é facilmente obtido com a utilização de caseína com concentrações de ferro da ordem de 9 mg/kg.

Ao final do período de depleção, a média da concentração de hemoglobina desses animais chegou a 7 g/dl, para um consumo médio de ferro de 0,130 mg/d.

Entretanto, o ganho de peso foi de 78 ± 7 g, muito abaixo dos valores dos outros experimentos. É possível ter havido uma alteração a nível da mucosa intestinal, por excesso de quelante residual na caseína. A outra possibilidade é uma alteração na resposta desses animais provocada pela substituição do amido por sacarose, na dieta basal. (45)

Assim, os dados de repleção da hemoglobina feita com esses animais, vão ser tratados à parte.

4.3 Valor biológico do ferro em dietas

Os ensaios de repleção da hemoglobina em ratos anêmicos são objeto de muita discussão, principalmente quanto ao desenho experimental e ao tratamento dos dados para se expressar a absorção de ferro.

O método preconizado pela AOAC⁽²²⁾⁽²³⁾ implica a utilização de um grande número de animais anêmicos para a constituição dos vários grupos correspondentes aos diferentes níveis de ferro da dieta controle.

Utilizamos o método sugerido por Mahoney⁽³⁸⁾ que tem a vantagem da simplicidade e que tem sido validado em diversos experimentos de avaliação de biodisponibilidade de ferro⁽³⁸⁾⁽⁴²⁾⁽⁵³⁾⁽⁵⁶⁾⁽⁸⁰⁾.

Esse método apresenta ainda uma boa correlação segundo diversos autores, como descrito por Linder⁽⁵⁶⁾ com os ensaios de absorção feitos em seres humanos.

Na Tabela VI estão os resultados da determinação da composição centesimal das rações testadas nessa fase de repleção; a figura 2 indica a linearidade da resposta - concentração de hemoglobina em função do tempo a partir dos valores iniciais de 8 g/dl, e atestam a validade do ensaio.

Nos animais alimentados com as rações à base de feijão com 200 µg/g de ferro e de caseína com 70 µg/g, a concen-

TABELA VI - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS RAÇÕES UTILIZADAS NA FASE DE REPLEÇÃO DA HEMOGLOBINA.

	DRSP	Feijão	Caseína		
			1	2	3
Umidade	6,2	7,0	10,2	8,8	9,0
Cinzas	2,2	3,4	2,7	2,6	3,1
Proteína	11,7	16,6	18,0	10,0	12,5
Lipídios	11,8	9,3	8,1	9,0	11,0
Fibra*	6,3	N.D.*	1,0**	1,0**	1,0**
Extrato Livre de Nitrogênio	61,8	63,7	60,0	68,6	63,4
Energia (kcal/g)	4,00	4,05	3,85	3,95	4,03
Ferro (µg/g)	33	200	70	25	32

* não determinada

** valores de formulação

DRSP - Dieta Regional de S. Paulo

**FIGURA 2: REPLEÇÃO de
HEMOGLOBINA**

Fe (μ g/g)

- Caseina 70
- Caseina 32
- Feijão 200
- ▽ DRSP 33

tração de hemoglobina final chegou a valores de 16 g/dl, considerado normal para animais dessa idade.

Por outro lado, nos grupos alimentados com as rações de caseína com 25 e 32 $\mu\text{g/g}$ de ferro, e à base da dieta regional (DRSP), esse parâmetro hematológico não foi superior a 13,5 g/dl.

Temos, descritos na Tabela VII, os resultados da absorção de ferro das três diferentes dietas que foram objeto de nosso trabalho.

Como mencionado anteriormente, os cálculos da eficiência de regeneração da hemoglobina foram feitos assumindo-se que o volume de sangue dos animais corresponde a 0.067% de seu peso, e que a proporção de ferro na hemoglobina é de 0,355%.

Segundo Mahoney⁽³⁸⁾, esse tipo de procedimento elimina as variações devidas a diferenças no consumo de ração, que não são consideradas quando se tem somente a variação da concentração de hemoglobina ($\text{Hg final} - \text{Hg inicial}$).

A partir dos dados da Tabela VII, podemos então dizer que a absorção de ferro da ração à base da dieta regional, por ratos anêmicos, é de 50%. Fizemos a média dos três grupos uma vez que não houve diferenças entre elas.

Um dado interessante nessa primeira avaliação é que esse valor obtido não dependeu da concentração inicial de hemoglobina. Partindo de concentrações de 8 e de 10 g/dl, obti-

TABELA VII - REPLEÇÃO DA HEMOGLOBINA EM RATOS ANÊMICOS ALIMENTADOS COM RAÇÕES À BASE DE: DIETA REGIONAL, CASEÍNA E FEIJÃO.

Fe na Ração µg/g	Dieta Regional			Caseína			Feijão
	33	33	33	70	25	32	200
Peso							
Inicial (g)	233 [±] 19	188 [±] 21	195 [±] 17	194 [±] 21	223 [±] 22	188 [±] 25	189 [±] 48
Peso							
Final (g)	266 [±] 24	246 [±] 30	231 [±] 15	250 [±] 17	256 [±] 22	247 [±] 22	207 [±] 24
ΔP (g)	33 [±] 8	41 [±] 9	36 [±] 3	27 [±] 2	33 [±] 7	59 [±] 10	18 [±] 3
Hg Inicial							
(g/dl)	8,3 [±] 1,4	8,9 [±] 0,8	10,3 [±] 0,8	8,4 [±] 0,3	8,3 [±] 1,4	8,9 [±] 1,0	8,1 [±] 0,5
Hg Final							
(g/dl)	11,1 [±] 0,8	11,7 [±] 1,6	12,6 [±] 1,2	16,2 [±] 0,6	13,5 [±] 1,1	10,5 [±] 1,5	16,9 [±] 0,6
ΔFe	2,4 [±] 0,2	1,9 [±] 0,6	2,2 [±] 0,6	4,6 [±] 1,0	3,8 [±] 0,5	2,2 [±] 0,4	4,7 [±] 0,4
Consumo:							
ração (g)	168 [±] 19	167 [±] 39	160 [±] 23	178 [±] 6	165 [±] 17	127 [±] 9	123 [±] 8
ferro (mg)	5,2 [±] 1,0	5,5 [±] 1,2	5,3 [±] 0,8	12,5 [±] 0,3	4,1 [±] 0,4	4,0 [±] 0,3	24,6 [±] 1,5
proteína (g)	20 [±] 2	19 [±] 5	19 [±] 3	34 [±] 2	16 [±] 2	14 [±] 1	21 [±] 1
% A	48 [±] 9	52 [±] 8	42 [±] 11	46 [±] 2	92 [±] 11	54 [±] 12	19 [±] 1
Δt(d)	11	11	9	12	11	7	12
n	6	10	9	6	6	6	6

vemos os mesmos resultados finais.

Esse dado é válido para esses dois níveis de hemoglobina inicial, uma vez que quando se considera uma variação maior, a tendência é haver uma diminuição da porcentagem de absorção⁽⁷⁰⁾.

Nessa fase, houve, portanto, uma linearidade tanto na variação de hemoglobina com o tempo e com o ferro consumido, como no ganho de peso com o tempo.

Os resultados obtidos com as rações de caseína exigem uma discussão mais detalhada.

A absorção de ferro dos animais alimentados com as rações de caseína com 70 $\mu\text{g/g}$ e 32 $\mu\text{g/g}$ foi a mesma, de 50%.

Embora o período de repleção tenha tido diferente, a mesma fundamentação usada para a avaliação dos resultados obtidos com a dieta regional assegura-nos da validade da comparação.

Park⁽⁵⁶⁾ obteve em 2 ensaios semelhantes feitos com ratos anêmicos uma absorção de 58 e 62% de ferro como FeSO_4 , com rações à base de caseína.

Esse autor demonstra a boa correlação encontrada entre o resultado desses ensaios e aqueles feitos em seres humanos anêmicos, nos quais para as mesmas fontes de proteína e de ferro a absorção foi da ordem de 50%

Uma questão deve ser colocada quando se avalia o resultado de 90% de absorção em ratos alimentados com a dieta

A comparação entre os dois grupos constituídos - caseína (32 $\mu\text{g/g}$) e DRSP - é válida, uma vez que podem ser considerados homogêneos.

Assim, a absorção de ferro das duas rações foi a mesma e da ordem de 50%.

4.4 Determinação do ferro dialisável

O método "in vitro"⁽⁴⁶⁾⁽⁵¹⁾ de determinação da biodisponibilidade de ferro é útil para uma avaliação preliminar, sendo indicativo da biodisponibilidade "relativa" do elemento presente em um alimento ou dieta.

Os resultados obtidos na determinação do ferro dialisável nas rações de caseína e regional constam do quadro 6. Essa determinação foi feita pelos métodos colorimétrico e radiométrico somente para a dieta regional.

Entre os valores de 7,4 e 8,4, não houve interferência do pH final do dialisado, na porcentagem de ferro, determinada, nessa ração, pelo método colorimétrico entre 4,3 e 4,9%.

Os valores encontrados para a dieta de caseína (5,2 e 5,6%) foram significativamente mais altos do que os obtidos com a dieta regional.

A razão provável é que, embora com a mesma composição química, as dietas apresentaram diferenças qualitativas de componentes como carboidratos, gorduras e sais inorgânicos.

COOK⁽¹⁷⁾, em ensaio feito "in vivo", comparou a biodisponibilidade de ferro de uma dieta padrão, com a de uma dieta semi-sintética, tendo a mesma composição química.

Verificou que, mesmo acrescentando a esta, quantida-

QUADRO 6 - Ferro dialisável na dieta regional de S.Paulo e na de caseína(*)

pH	Dieta Regional(**)		Dieta de Caseína(***)
	Método Colorimétrico	Método Radiométrico	Método Colorimétrico
7,4	4,27 ± 0,40 ^a	3,69 ± 0,16 ^b	5,22 ± 0,30 ^c
7,5	4,87 ± 0,40 ^a		
7,6	4,38 ± 0,20 ^a		
8,4	4,37 ± 0,38 ^a		5,60 ± 0,20 ^c

(*) Médias de três determinações. Valores com o mesmo subscrito não são diferentes estatisticamente ($p < 0,01$)

(**) 5,1 µg/g de ferro não hemínico.

(***) 7,0 µg/g de ferro total.

de caseína com 25 µg/g de ferro e 10% de proteína.

Os efeitos da quantidade de proteína da dieta na absorção de ferro não hemínico, especialmente da alteração moderada desses teores, não são muito bem definidos.

Sabe-se que a deprivação severa da proteína diminui a velocidade de eritropoese e, a partir daí, a absorção de ferro.

Miller⁽⁴²⁾ não constatou nenhum efeito mensurável na repleção da hemoglobina de ratos anêmicos quando alterou de 12 para 8% a concentração de proteína das rações de caseína.

Assim, o teor de 10% de proteína dessa ração, mais baixo que a dos outros grupos provavelmente não é o fator responsável pelo aumento da absorção de ferro observado nesse grupo.

Por outro lado, a concentração de ferro nessa ração, de 25 µg/g, está no limite da adequação para o rato⁽¹⁴⁾⁽⁵²⁾.

A produção de proteínas heme pode ser restringida com ingestões de ferro abaixo desse valor⁽⁷³⁾.

No experimento com a ração basal em que se substituiu o amido por sacarose e se lavou previamente a caseína com solução de EDTA a 1%, obteve-se um grau acentuado de anemia, expressa por concentrações médias de hemoglobina da ordem de 6 g/dl nos grupos formados para o ensaio de repleção.

O resultado desse ensaio feito com animais cuja anemia foi provocada nas condições citadas constam da Tabela VIII.

TABELA VIII - REPLEÇÃO DA HEMOGLOBINA EM RATOS ANÊMICOS ALIMENTADOS COM RAÇÕES À BASE DE DIETA REGIONAL.

	Regional (35 μ g/g)			Caseína (32 μ g/g)		
Peso inicial (g)	134	$\pm$	14	120	$\pm$	12
Peso Final (g)	198	$\pm$	17	136	$\pm$	23
Hg inicial (g/dl)	6,8	$\pm$	1,1	6,8	$\pm$	1,0
Hg final (g/dl)	10,1	$\pm$	1,5	7,8	$\pm$	0,5
Δ Fe (mg)	2,6	$\pm$	0,2	2,32	$\pm$	0,3
Consumo						
ração	143	$\pm$	19	135	$\pm$	11
ferro	5,0	$\pm$	0,7	4,3	$\pm$	0,4
% A	52	$\pm$	8	54	$\pm$	7
Δ t (d)	7			7		
n	8			7		

des de carne variando entre 25 e 100g, os valores de ferro ab sorvidos, embora aumentados, foram sempre menores do que os obtidos com a dieta padrão.

Assim, esse fato deve ser considerado quando se pensa na comparação entre as duas dietas em questão.

A diferença encontrada na porcentagem de ferro, de terminada no dialisado pelos métodos radiométrico e colorimétrico (4,5 e 3,7%) respectivamente, está de acordo com dados da literatura⁽⁴⁶⁾⁽⁷⁰⁾, sendo o método radiométrico o de escolha devido à sua maior precisão.

Sabe-se que os resultados de porcentagem de ferro dialisável determinada pelo método "in vitro" apresentam boa correlação com os do método "in vivo", feito com seres humanos⁽⁷²⁾.

Como nosso objetivo foi o de ter uma avaliação do que seria a absorção de ferro das suas dietas em indivíduos normais, podemos dizer que houve uma diferença, embora pequena, da biodisponibilidade do ferro presente em ambas.

O comentário final é que os resultados obtidos sugerem que dieta formulada não apresenta diferença significativa na biodisponibilidade de ferro quando comparada à dieta de ca seína com o mesmo teor de ferro.

Quantitativamente, o ferro dessa dieta está no limi te da adequação para a mulher em período fértil, admitindo-se uma absorção de 10%.

No entanto, a biodisponibilidade desse ferro, determinada pelo método "in vitro" correlaciona-se, como já mencionado, com o método "in vivo", não sendo muito diferentes os valores determinados pelos dois.

Assim, fixando entre 3 e 5% a porcentagem de absorção do ferro dessa dieta, ela estaria inadequada quanto ao aporte de ferro disponível.

Esses dados são importantes para o estudo das possíveis modificações dessa dieta que possam melhorar esse quadro.

5. CONCLUSÕES

- 5.1 - Teores de ferro entre 14 e 19 mg/g, na ração basal de caseína fornecida a ratos em fase de crescimento, levam a uma redução de 40% na concentração de hemoglobina desses animais, quando comparados aos valores do grupo controle (12,7 g/dl e 7 g/dl, respectivamente).
- 5.2 - A redução de ferro de 30 para 5 mg/g em ração à base de caseína a 11% diminui o aproveitamento da proteína por ratos em fase de crescimento, medido pelo coeficiente de eficácia protéica.
- 5.3 - Em ratos anêmicos, a biodisponibilidade de ferro de uma ração à base da dieta regional de São Paulo, formulada a partir dos dados do ENDEF, é de 50% e igual à de ferro (como FeSO_4) de uma dieta de caseína com a mesma composição centesimal.
- 5.4 - A porcentagem de ferro dialisável da ração à base de dieta regional é de 4,5%; o valor para a dieta de caseína é de 5,4%; esses valores diferem significativamente.

5.5 - A concentração de ferro da dieta formulada com base no Estudo Nacional de Despesa Familiar (ENDEF) está no limite da adequação do nutriente segundo a FAO/OMS.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ACOSTA, A.; AMAR, M.; CORNBLOTH-SZARFARC, S.C.; DILLMAN, E.; FOSIL, M.; BIACHI, R.G.; GREBE, G.; HERTRAMPF, E.; KREMENCHUKY, S.; LAYRISSE, M.; MARTINEZ-TORRES, C.; MORON, C; PIZATTO, F.; REYNAFARJE, C.; STEKEL, A.; VILLAVICENCIO, D.; ZUNIGA, H. - Iron absorption from typical Latin America diets. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, 39: 953-962, 1984.
 02. AMINE, E.K.; HEGSTED, D.M. - Biological assessment of available iron in food products *J. Agri-Food. Chem.*, Washington, 22 (3): 470-476, 1974.
 03. ARAÚJO, R.L.; ARAÚJO, M.B.D.G.; MACHADO, R.D.P.; BRAGA, A.A.; LEITE, B.V.; OLIVEIRA, J.R. - Evaluation of a program to overcome vitamin A and iron deficiencies in areas of poverty in Minas Gerais, Brazil. *Arch. Latino Am. Nutr.*, Caracas, 37: 9-22, 1987.
 04. Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis 14ed. Arlington, 1984, 1141 p.
- * De acordo com as normas preconizadas pela associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 1985.

05. ASP, G.N.; JOHANSSON, C.G.; HALLMER, H.; SILJESTROM, H. -
Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary
fibre. *J. Agric. Food Chem.*, Berkeley, 31:
476-482, 1983.
06. BAKER, S.J.; DEMAYER, E.M. - Nutritional anemia: its
understanding and control with special reference to the
work of the world Health Organization. *Am. J. Clin
Nutr.*, Bethesda, 32: 368-417, 1979.
07. BERNER, L.A., MILLER, D.D. - Effects of dietary proteins on
iron bioavailability - A review *Food. Chem.*,
Washington, 18: 47-69, 1985.
08. BEUTLER, E.; FAIRBANKS, V.F. - The effects of iron
deficiency, In: JACOBS, A., WORWOOD, M., *Iron in
biochemistry and Medicine II*, London, Academic Press,
1980, p. 393-425.
09. BRESSANI, R. - Deficiencias Minerales en America Latina, en
produccion animal y en alimentos basicos
Arch. Latinoam. de Nutrición, Caracas,
32: 16-23, 1982.
10. BRUNE, M.; MAGNUSSON, B.; PERSSON, H.; HALLBERG, L. - Iron
losses in sweat. *Am.J.Clin.Nutr.* Bethesda,
43: 438-443, 1986.

11. CALLENDER, S.T. - The intestinal mucosa and iron absorption.
Br.Med.Bull., Edinbrugh
23 (3): 263-265, 1967.
12. CAMPANA, A.O.; BURINI, R.C.; ANSELMO, M.A.C. - Population surveys in Brazil: data on energy and protein intakes and on energy and protein intakes and on anthropometric measurements of adult people. World.Rev.Nutr.Diet., New York, 52: 209-234, 1987.
13. CLYDESDALE, F.M. - Physicochemical determinants of iron bioavailability. Food.Tech., Chicago, 37 (10): 133-138, 1983.
14. COMMITTEE ON LABORATORY ANIMAL DIETS/ASSEMBLY OF LIFE SCIENCES NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Control diets in laboratory animal experimentation Nutr.Abstr.Rev., Slough, 49: 413-419, 1973.
15. CONRAD, M.E.; PARMLEY, R.T.; OSTERLOH, K. - Small intestinal regulation of iron absorption in the rat.
J.Lab.Clin.Med., St Louis,
110: 418-426, 1987.
16. COOK, J.D. - Determinants of nonheme iron absorption in man.
Food.Tech., Chicago, 37 (10): 124-126, 1983.

17. COOK, J.D.; MONSEN, E.R. - Food iron absorption. I. Use of a semisynthetic diet to study absorption of nonheme iron. *Am.J.Clin.Nutr.* , Bethesda, 28: 1289-1295, 1975.
18. COX, T.M.; PETERS, T.J. - The kinetics of iron uptake "in vitro" by human duodenal mucosa: studies in normal subjects. *J.Physiol.* , London, 289: 469-479, 1979.
19. CROSBY, W.H. - Iron deficiency anemia in a nutritionally complex situation. *Am.J.Clin.Nutr.* , Bethesda, 32: 715-716, 1979.
20. DAVIES, N.T. - Anti-nutrient factors affecting mineral utilization. *Proc.Nutr.Soc.* , London, 38: 121-128, 1979.
21. FOSSI, M.; MENDEZ-CASTELLANO, H.; JAFFÉ , W.G.; MARTINEZ-TORRES, C.; LEETS, I.; TAYLOR, P., LAYRISSE, M. - Perfil hematológico y absorción del hierro de dietas que consume la población de estrato socioeconómico bajo de los Estados de Venezuela. *Arch.Latinoam.Nutr.* , Caracas, 37: 23-35, 1987.
22. FRITZ, J.C.; PLA, G.W.; HARRISON, B.N.; CLARK, G.A - Estimation of the bioavailability of iron. *J. Ass.Off.Anal.Chem.* , Washington, 58: 902-905, 1975.

23. FRITZ, J.C.; PLA, G.W.; HARRISON, B.N.; CLARK, G.A. - Collaborative study of the rat hemoglobin repletion test for bioavailability of iron. *J.Assoc.Off.Anal. Chem.*, Washington, 57: 513-517, 1977.
24. FRITZ, J.C.; PLA, G.W.; HARRISON, B.N.; CLARK, G.A.; SMITH, E.A. - Measurement of the bioavailability of iron using the hemoglobin repletion test. *J.Ass.Off.Anal. Chem.*, Washington, 61: 709-714, 1978.
25. FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO E GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (FIBGE). Estudo Nacional de despesa familiar. Consumo Alimentar Antropometria. Região II São Paulo. Região IV Minas Gerais e Espírito Santo. Rio de Janeiro, 1977, 109p.
26. GRIVETTI, L.E. - Cultural Nutrition: anthropological and geographical themes. *Ann.Rev.Nutr.*, Palo Alto, 1: 47-68, 1981.
27. GRUDEN, D. - Iron metabolism in rats from the fifth till the twenty-first day of life. *Nutr.Rep.Int.*, Los Altos, 28: 473-479, 1983.
28. GRUDEN, N. - The effect of iron dose on iron absorption in neonatal and weanling rats. *Nutr.Rep.Int.*, Los Altos, 33: 693-699, 1986.

29. HAGLER, L.; ASKEW, E.W.; NEVILLE, J.R.; MELLK, P.W.; COPPERS, R.I., LOWDER, J.F. - Influence of dietary iron deficiency on hemoglobin, myoglobin, their respective reductases and skeletal muscle mitochondrial respiration.
Am.J.Clin.Nutr. Bethesda, 34: 2169-2177, 1981.
30. HALLBERG, L. - Food Iron absorption, In: COOK, J.D.,
Iron, N. York, Churchill Livingstone Inc., 1980,
p. 116-133.
31. Hallberg, L. - Iron In: Olson, R.E. et al., eds.
Present knowledge in Nutrition 5 ed,
Washington, Nutrition Foundation, 1984. p. 459-478.
32. HALLBERG, L. - Bioavailable nutrient density: a new concept
applied in the interpretation of food iron absorption
data. *Am.J.Clin.Nutr.*, Bethesda,
34: 2242-2247, 1981.
33. HALLBERG. L., BJORN-RASMUSSEN, E.; ROSSANDER, L.; SUWANIK,
R.; PLEE HACHINDA, R.; TUNTAWIROON, M. - Iron absorption
from some Asian meals containing contamination iron.
Am.J.Clin.Nutr., Bethesda, 37: 272-277, 1983

34. HALLBERG, L.; ROSSANDER, L. - Improvement of iron nutrition in developing countries: comparison of adding meat, soy protein, ascorbic acid, citric acid and ferrous sulphate on iron absorption from a simple Latin American-type of meal *Am.J.Clin.Nutr.*, Bethesda, 39: 577-583, 1984.
35. HERBERT, V. - Recommended dietary intakes (RDI) of iron in humans. *Am.J.Clin.Nutr.*, Bethesda, 45: 679-686, 1987.
36. INSTITUTO ADOLFO LUTZ - Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 3a. ed., São Paulo, 1985. Vl, 533p.
37. LINDER, M.C.; MUARO, H.N. - The mechanism of iron absorption and its regulation. *Fed.Proc.*, Washington, 36: 2017-2023, 1977.
38. LYNCH, S.R., BEARD, J.L.; DASSENKO, S.A.; COOK J.D. - Iron absorption from legumes in humans. *Am.J.Clin.Nutr.*, Bethesda, 40: 42-47, 1984.
39. MAHONEY, A.W.; WITTAKER, P., FARMER, B.R., HENDRICKS, D.G. - Iron bioavailability in an anemic rat model: effect of food restriction. *Nutr.Rep.Intern.*, Los Altos, 31 (2): 457-462, 1985.

40. MAY, P.M.; WILLIAMS, D.R. - The inorganic chemistry of iron metabolism, I: JACOBS, A.; WORWOOD, M.; Iron in biochemistry and Medicine II, London, Academic Press, 1980.
41. MILLER, J. - Assessment of dietary iron availability by rat hemoglobin repletion assay. *Nutr.Rep.Intern.* Los Altos, 26 (6): 993-1005, 1982.
42. MILLER, J. - Effect of feed restriction on rate of hemoglobin regeneration in anemic rats. *Nutr.Rep. Intern.* Los Altos, 75 (3): 305-309, 1977.
43. MILLER, J. - Some effects of dietary protein on growth and iron metabolism in anemic rats. *Nutr.Rep.Intern.* Los Altos, 27 (3): 1187-1197, 1983.
44. MILLER, J.; LANDES, D.R. - Effects of starch sucrose and glucose on iron absorption by anemic rats. *Nutr. Rep.Intern.*, Los Altos, 14 (1): 7-11, 1976.
45. MILLER, J.; LANDES, D.R. - Modification of iron and copper metabolism by dietary starch and glucose in rats. *Nutr.Rep.Intern.*, Los Altos, 13 (2): 187-195, 1976.

46. MILLER, D.D.; SCHRICKER, B.R. - In vitro estimation of food iron bioavailability in Nutritional Bioavailability of iron. ACS Symp.Ser. No 23. Constance Kies, Ed., 1982.
47. MILLER, D.D.; SCHRICKER, B.R.; RASMUSSEN, R.R.; VAN CAMPEN, An in vitro method for estimation of iron availability from meals. D. Am.J.Clin.Nutr., Bethesda, 34: 2248-2256, 1981.
48. MORRIS, E.R. - An overview of current information on bioavailability of dietary iron to humans Fed.Proc., Washington, 42: 1716-1720, 1983.
49. MORK, T.A.; LYNCH, S.R.; COOK, J.D. - Inhibition of food iron absorption by coffee. Am.J.Clin.Nutr., Bethesda, 37: 416-420, 1983.
50. NARASINGA RAO, B.S. - Physiology of iron absorption and supplementation. Brit. Med. Bull., Edinbrugh, 37: 25-30, 1981.
51. NARASINGA RAO, B.S.; PRABHAVATHI, T. - An in vitro method for predicting the bioavailability of iron from foods. Am.J.Clin.Nutr., Bethesda, 31, 169-175, 1978

52. Nutrient Requirements of Laboratory rat. In Nutrient Requirements of Laboratory Animals, 3rd ed. The National Academic of Sciences, Washington, D.C. 1978: p. 7-37 [Report no. 10].
53. NOJEIN, S.J.; CLYDESDALE, F.M. - Effect of pH and ascorbic acid on iron valence in model systems and in foods. *J.Foof.Sci.* 46: 606-611, 1981.
54. OLSZON, E.; ISAKSSON, B.; NORRBY, A.; SOLVELL, L. - Food iron absorption in iron deficiency *Am.J.Clin.Nutr.*, Bethesda, 31: 106-111, 1978.
55. ORGANIZATION MUNDIAL DE LA SALUD - Comité de Expertos. Los oligoelementos en la nutrición humana, Ginebra, 1973. 71 p./ Série de Informes Técnicos, no. 532/.
56. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Comité de Expertos. Necesidades de energia y de proteínas. Ginebra, 1985, 220p./ Série de Informes Técnicos, no. 724/.
57. PARK, Y.W.; MAHONEY, A.W.; CONFORTH, D.P. COLLINGE, S.K.; HENDRICKS, D.G. - Bioavailability to anemic rats of iron from fresh, cooked or nitrosylated hemoglobin and myoglobin. *J.Nutr.*, Philadelphia, 113: 680-687, 1983.

58. POLLACK, S.; GEORGE, J.N.; REBA, R.C.; KAUFMAN, R.M.; CROSBY, W.H. - The absorption of nonferrous metals in iron deficiencies. *J.Clin.Invest.*, New York, 44: 1470-1473, 1965.
59. PORTO DANTAS, R. - *Disponibilidade de zinco em dieta Regional de São Paulo*. São Paulo 1987. 109 p. Tese-Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.
60. RAFFIN, S.B.; WOO, C.H.; ROOST, K.T.; PRICE, D.C.; SCHMID, R. - Intestinal absorption of hemoglobin iron - heme cleavage by mucosal heme oxygenase. *J.Clin.Invest.*, New York, 54: 1344-1352, 1974.
61. RANGER, C.R.; NEALE, R.J. - Iron availability from soy, meat and soy/meat samples in anemic rats with and without prevention of coprophagy. *J.Food.Sci.*, Chicago, 49: 585-589, 1985.
62. RANHOTRA, G.S.; GELROTH, J.A.; TORRENCE, F.A.; BOCK, M.A.; WINTERRINGER, G.L. - Iranian flat breads; relative bioavailability of iron. *Cereal.Chem.* St. Bet Paul, 58 (5): 471-474, 1981.
63. RECOMMENDED DIETARY ALLOWANCES 9ed. Washington National Academy of Sciences, 1980, 185p.

64. REINHOLD, J.G.; GARCIA, S.; GARZON, P. - Binding of iron by fiber of wheat and maize. *Am.J.Clin.Nutr.*, Bethesda, 34: 1384-1391, 1981.
65. RONCADA, M.J.; SZARFARC, S.C. - Hipovitaminose A e anemia ferropriva em gestante de duas comunidades do Vale do Ribeira (Estado de São Paulo, Brazil). *Rev. Saúde Públ.*, São Paulo, 9: 99-106, 1975.
66. ROSENBERG, I.H.; SOLOMONS, N.W. - Biological availability of minerals and trace elements a nutritional overview. *Am.J.Clin.Nutr.*, Bethesda, 35: 781-782, 1982.
67. ROSENMUND, A.; GERBER, S.; HUEBERS, H.; FINCH, C. - Regulation of iron absorption and storage iron turnover. *Blood*, New York, 56 (1): 30-37, 1980.
68. SANFORD, P.A. - Inhibition of intestinal absorption *Br. Med. Bull.*, Edinburgh, 23: 270-274, 1967.
69. SAVIN, M.A.; COOK, J.D. - Mucosal iron transport by rat intestine. *Blood*, New York, 56: 1029-1035, 1980.

70. SCHRICKER, B.R.; MILLER, D.D. - In vitro estimation of relative iron availability in breads and meals containing different forms of fortification iron. *J.Food.Sci.*, Chicago, 47: 723-727, 1982.
71. SCHRICKER, B.R.; MILLER, D.D.; VAN CAMPEN, D. - Effects of iron status and soy protein on iron absorption by rats. *J.Nutr.*, Philadelphia, 113: 995-1001, 1983.
72. SCHRICKER, B.R.; MILLER, D.D.; RASMUSSEN, R.R.; VAN CAMPEN, D. - A comparison of in vivo and in vitro methods for determining availability of iron from meals. *Am.J.Clin.Nutr.*, Bethesda, 34: 2257-2263, 1981.
73. SIGULEM, D.M.; TUDISCO, E.S.; GOLDENBERG, P.; ATHAIDE, M.M.M.; VAISMAN, E. - Anemia ferropriva em crianças do município de São Paulo. *Rev.Saúde Públ.*, São Paulo, 12: 168-178, 1978.
74. SIIMES, M.A.; REFINO, C.; DALLMAN, P.R. - Manifestation of iron deficiency at various levels of dietary iron intake. *Am.J.Clin.Nutr.*, Bethesda, 33: 570-574, 1980.
75. SMITH, K.T. - Effects of chemical environment on iron bioavailability measurements. *Food Tech*, Chicago, 37, (10): 115-120, 1983.

76. STEKEL, A. - Prevention of iron deficiency, In: STEKEL, A.,
Iron nutritition in infancy and childhood., New
York, Raven Press, 1984, p. 179-194.
77. STEKEL, A.; AMAR, M., CALVO, E.; CHADUD, P., HERTRANPF, E.;
LLAGUNO, S.; OLIVARES, M.; PIZARRO, F. - Nutritional
significance of interactions between iron and food
components. Arch.Latinam.Nutr., Caracas,
23 (1): 33-41, 1983.
78. SZAR FARC, S.C. - Anemia ferropriva em populações da região
sul do Estado de São Paulo. Rev.Saúde Públ.,
São Paulo, 6: 125-133, 1972.
79. TORRANCE, J.D.; BOTH WELL, T.H. - A simple technique for
measuring storage iron concentrations in formalinised
liver samples S.Afr.J.Med.Sci., Johannesburg,
33: 9-11, 1968.
80. VALBERG, S.; TAYLOR, K.B.; WITTS, L.J. - The effect of iron
deficiency on the stomach of the rat. Brit.J.
Nutr., London, 15: 473-480, 1961.
81. VAN CAMPEN, D.R. - Iron bioavailability techniques: an
overview. Food Tech., Chicago, 37: 127-132,
1983.
82. VAN CAMPEN, D.R.; WELCH, R.M. - Availability to rats of iron
from spinach: effects of oxalic acid. J.Nutr.,
Philadelphia, 110: 1618-1621, 1980.

83. WEINTRAUB, L.R.; WEINSTEIN, M.B.; HUSER, H.; RAFAL, S. -
Absorption of hemoglobin iron: the role of a heme
splitting substance in the intestinal mucosa.
J.Clin.Invest., New York, 47: 531-539, 1968.
84. WHEBY, M.S.; SUTTLE, G.E.; FORD, K.T. - Intestinal
absorption of hemoglobin iron. Gastroenterology,
New York, 58: 647-654, 1970.
85. WRIGGLES WORTH, J.M.; BAUM, H. - The biochemical functions
of iron. In: JACOBS, A.; WORWOOD, M., Iron in
biochemistry and medicine, II London, Academic
Press, 1980, p. 29-86.

7 - R E S U M O

Foi feito um estudo de determinação da biodisponibilidade de ferro em dieta regional de São Paulo, formulada com base no Estudo Nacional de Despesa Familiar (ENDEF).

Para tanto, foram utilizados o método de repleção da hemoglobina em ratos anêmicos e o método "in vitro" de determinação de ferro dialisável.

Paralelamente, avaliou-se as condições de obtenção de anemia em ratos. Concluiu-se que teores de 14 a 19 mg/g de ferro numa ração à base de caseína levam a uma redução de cerca de 40% (de 12,7g/dl para 7g/dl) da concentração de hemoglobina dos animais em períodos de 35 a 40 dias.

A biodisponibilidade de ferro, da dieta regional, para ratos anêmicos é de 50% e igual à da caseína com a mesma composição.

A porcentagem de ferro dialisável é maior na dieta à base de caseína do que na dieta à base de dieta regional (4,5% e 5,4% respectivamente).

Os resultados sugerem uma inadequação dessa dieta quanto ao aporte de ferro.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacéuticas
Universidade de São Paulo

SUMMARY

The hemoglobin repletion technique in anemic rats and an "in vitro" method were used to obtain data on iron bioavailability in a regional diet and in a diet based on milk.

Previously, optimum condition for obtaining iron deficiency anemia in rats were established.

Concentrations of iron from 14 to 19 mg/g in a basal casein diet led to a reduction of about 40% in hemoglobin concentration in a 35 days assay.

The percentage of bioavailable iron in both regional and casein diets for anemic rats was similar and averaged 50%.

The percentage of dialysable iron in the casein diet was greater than in regional diet (5.4% compared to 4.5%).

The results suggest an inadequacy of the regional diet related to iron.