UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Biodisponibilidade de minerais em ratos alimentados com frutanos
do tipo inulina

Alexandre Rodrigues Lobo

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof^a Dr^a Célia Colli

São Paulo
2008

Alexandre Rodrigues Lobo

Biodisponibilidade de minerais em ratos alimentados com frutanos
do tipo inulina

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Célia Colli
(Orientador / Presidente)

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

4° Examinador

São Paulo, _____ de _____.

Primeira aula

a Alexandre Rodrigues Lobo

Um cientista é aquele que não sabe:

a ciência nasce
das dúvidas
das faltas
das tentativas.

Nunca das certezas.

Jorge de Lima
São Paulo, 27/10/2008

Dedico esse trabalho à minha mãe, Eliane,
e à memória de meu pai, Joarez.

Agradeço, em especial:

À amiga e orientadora Célia Colli e
à amiga Malu Cocato.

Aos meus familiares que contribuíram,
direta ou indiretamente, para que esse
trabalho pudesse ser realizado.

Aos amigos Renato e Edu.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (FCF/USP).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos (processo no. 142219/2004-5).

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio à pesquisa (processo no. 2006/01735-0).

À professora Primavera Borelli, e ao grupo do Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (FCF/USP), em especial às alunas de pós-graduação Amanda Rabello Crisma e Karina Nakajima, pela colaboração nas análises hematológicas.

À doutora Vanda Jorgetti, e ao grupo do Laboratório de Investigação Médica 16 (LIM-16, FM/USP), pela colaboração nas análises histomorfométricas dos fêmures.

À professora Eliana Parisi Alvares, e ao grupo do Laboratório de Morfofisiologia do Sistema Digestivo do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento (ICB/USP), em especial ao técnico de laboratório Cruz Alberto Rigonati, pela colaboração nas análises histológicas do intestino.

À professora Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres, e ao grupo do Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição (FSP/USP), em especial à técnica de laboratório e aluna de pós-graduação Geni Rodrigues Sampaio, pela colaboração nas análises dos ácidos graxos de cadeia curta.

À professora Lilian Rose Marques de Sá, do Laboratório de Gastroenteropatia Comparada e Experimental do Departamento de Patologia (FMVZ/USP), pela colaboração nas análises histológicas do fígado e baço.

À professora Susana Marta Isay Saad, e a aluna de pós-graduação Flávia Carolina Alonso Buriti, do Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (FCF/USP), pela colaboração nas análises de frutanos.

Ao professor José Alfredo Gomes Arêas, do Laboratório de Bioquímica e Propriedades Funcionais dos Alimentos do Departamento de Nutrição (FSP/USP), pela colaboração nas análises de ácidos graxos de cadeia curta e resistência óssea.

Ao professor Luiz Antonio Gioielli, e ao técnico de laboratório Alexandre Mariani Rodrigues, do Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (FCF/USP), pela colaboração nas análises de resistência óssea.

À Cargill Agrícola S/A, pela doação das amostras de óleo de soja.

À Novozymes Latin America Ltda, pela doação da enzima frutanasase.

À Fermavi Eletroquímica Ltda, pela doação dos sais de ferro.

À Clariant S/A, pela doação da amostra de Raftilose P95.

Ao senhor Marco Katsuso, pela doação das raízes tuberosas de yacón.

À Liotécnica, pela liofilização das amostras de yacón.

Aos professores Jayme Amaya Farfán e Inar Alves de Castro, pelas críticas e sugestões dadas no exame de qualificação do doutorado.

À professora Maria Teresa Bertoldo Pacheco, do Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas (ITAL), pela doação da enzima frutanasase.

À senhora Silvana Peres Neves, responsável pelo Biotério de Produção e Experimentação da FCF/USP, e seus funcionários, em especial à Flávia Prates Ong e à Renata Spalutto Fontes, pela colaboração nos ensaios biológicos.

Às alunas de iniciação científica que participaram desse trabalho, Renata Trommer de Campos Vaz e Maura Sayuri de Andrade.

Ao colega Eduardo Yoshio Nakano, pela colaboração nas análises estatísticas.

Ao amigo Álvaro Augusto Feitosa, pela colaboração na revisão do inglês de todos os artigos e resumos originados desse trabalho.

Ao amigo Jorge Alves de Lima, pela revisão do português desta tese.

Aos colegas Tatiana Garofalo Quintal, Cristiane Hermes Sales, Vivianne de Souza Rocha, Ivana Lavanda, Luciana Setaro, Renata dos Santos Kanashiro, Cassiana Ganem Achtschin, Juliana Massi Campanholo, Edna Helena da Silva Machado, Liliana Perazzini Mistura, William César Latorre, Andréa Polo Galante, Caroline Dario Capitani, Karina Ochsenhofer, Bruna Bonchristiani Pincette e Patricia Dias Pereira, que fazem ou que fizeram parte do grupo do Laboratório de Nutrição e Minerais do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (FCF/USP).

Aos amigos Carlos Eduardo Andrade Chagas e Marcelo Macedo Rogero.

Às amigas Adriana e Patricia Cintra, e ao amigo Cristiano Sagrillo.

Aos colegas do Conjunto Residencial da Universidade de São Paulo (CRUSP), em especial ao Rogério Graça Pedrosa, ao Cléverson Busso, ao Wanderson Ferreira Alves e ao Álvaro Castroman.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e, em especial, a todos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

E a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	1
Lista de Tabelas.....	2
Lista de Abreviaturas.....	3
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUÇÃO.....	7
OBJETIVOS.....	12
Geral.....	12
Específicos.....	12
CAPÍTULO 1.....	13
Introdução.....	14
Material e métodos.....	15
Animais e rações experimentais.....	15
Delineamento experimental.....	17
Composição química das rações experimentais.....	18
Biodisponibilidade de Fe e conteúdo de minerais no fígado e baço.....	19
Propriedades mecânicas e conteúdo de minerais nos ossos.....	20
Histomorfometria óssea.....	20
Análises estatísticas.....	21
Resultados.....	22
Ganho de peso corporal, consumo de ração e peso dos órgãos.....	22
Avaliação dos parâmetros intestinais.....	22
Biodisponibilidade de Fe e conteúdo de minerais no fígado e baço.....	23
Avaliação dos parâmetros ósseos.....	23
Discussão.....	33
CAPÍTULO 2.....	39
Introdução.....	40
Material e métodos.....	42
Delineamento experimental.....	42
Formulação e análise da composição química das rações experimentais.....	47
Biodisponibilidade de Fe, parâmetros hematológicos e conteúdo de minerais nos órgãos....	48
Absorção aparente de minerais.....	50
Determinação das espécies de Fe no conteúdo intestinal.....	50
Determinação dos ácidos graxos de cadeia curta.....	50
Análises estatísticas.....	51
Resultados.....	51
Protocolo de deficiência de Fe.....	51
Ganho de peso corporal, consumo de ração e parâmetros intestinais.....	52
Parâmetros hematológicos e biodisponibilidade de Fe.....	53
Parâmetros intestinais.....	54
Concentração de minerais no fígado.....	55
Discussão.....	64
CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXOS.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Cortes histológicos da região distal do fêmur mostrando o osso trabecular.....	30
Figura 1.2. Parâmetros histomorfométricos de formação óssea trabecular.....	31
Figura 1.3. Parâmetros histomorfométricos de reabsorção óssea trabecular.....	32
Figura 2.1. Delineamento experimental.....	44
Figura 2.2. Valor biológico relativo.....	59
Figura 2.3. Absorção aparente de Fe (A), Cu (B) e Zn (C).....	60
Figura 2.4. Especificação de Fe no conteúdo do ceco.....	61
Figura 2.5. Concentração hepática de Fe (A), Cu (B) e Zn (C).....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Formulação das rações experimentais.....	17
Tabela 1.2. Composição química e relação molar entre minerais nas rações experimentais.....	25
Tabela 1.3. Ganho de peso, consumo de ração, excreção fecal, peso relativo dos órgãos e parâmetros intestinais.....	26
Tabela 1.4. Biodisponibilidade de Fe e concentração hepática de minerais no fígado e baço.....	27
Tabela 1.5. Propriedades mecânicas da tíbia direita.....	28
Tabela 1.6. Concentração de Ca, P, Mg e Zn e relação Ca/P do fêmur e da tíbia direitos.....	29
Tabela 2.1. Formulação das rações experimentais.....	45
Tabela 2.2. Composição química das rações experimentais.....	48
Tabela 2.3. Peso corporal e dos órgãos, parâmetros bioquímicos de Fe, concentração de minerais no fígado e parâmetros hematológicos.....	56
Tabela 2.4. Ganho de peso corporal, consumo de ração e parâmetros intestinais.....	57
Tabela 2.5. Concentração de hemoglobina (Hb), peso corporal, <i>pool</i> de Fe na Hb (<i>pool</i> Fe Hb), consumo de Fe e eficiência da regeneração da Hb (HRE).....	58
Tabela 2.6. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no conteúdo do ceco.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGCC:** ácidos graxos de cadeia curta
- AIN:** *American Institute of Nutrition*
- ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BV/TV:** volume ósseo/volume trabecular
- CEEA:** Comitê de Ética em Experimentação Animal
- COBEA:** Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- Dcytb:** *duodenal cytochrome b* (citocromo b duodenal)
- DMT-1:** *divalent metal transporter-1* (transportador de metais divalentes-1)
- DP:** desvio padrão
- EAA:** espectrofotometria de absorção atômica
- ES/BS:** superfície erodida
- FA:** fibra alimentar
- FAI:** fibra alimentar insolúvel
- FAS:** fibra alimentar solúvel
- FC:** fração carbonato
- FeD:** rações deficientes em ferro
- FI:** fração intercambiável
- FID:** *flame ionization detector* (detector de ionização de chama)
- FOR:** fração orgânica
- FOS:** frutoooligossacarídeos
- FOx:** fração óxido
- FR:** fração residual
- FTI:** frutanos do tipo inulina
- FY:** farinha de yacón
- GLP-2:** *glucagon-like peptide-2* (peptídeo semelhante ao glucagon-2)
- GP:** grau de polimerização
- HCM:** hemoglobina corpuscular média
- HRE:** *hemoglobin regeneration efficiency* (eficiência da recuperação da hemoglobina)
- IRE:** *iron responsive elements* (elementos responsivos ao ferro)
- IRP-1:** *iron-regulatory protein* (proteína regulada pelo ferro)
- LIP:** *labile iron pool* (pool de ferro lábil)
- N.Ob/T.Ar:** número de osteoblastos/área trabecular
- N.Oc/T.Ar:** número de osteoclastos/área trabecular
- OS/BS:** superfície osteóide/superfície óssea
- PF:** pirofosfato férrico
- RAF:** Raftilose P95

RBV: *relative biological value* (valor biológico relativo)

RT-PCR: *reverse transcription polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa)

SF: sulfato ferroso

SPSS: *Statistical Package for Social Sciences*

TfR: *transferrin receptor* (receptor de transferrina)

TIBC: *total iron binding capacity* (capacidade total de ligação de ferro)

UIBC: *unsaturated iron binding capacity* (capacidade latente de ligação de ferro)

VCM: volume corpuscular médio

RESUMO

Neste estudo foi avaliado o efeito de frutanos do tipo inulina (FTI) na biodisponibilidade de minerais em ratos, com particular enfoque para o Ca e o Fe. Foram realizados dois ensaios: no primeiro utilizou-se um modelo fatorial $2 \times 2 \times 2$, com dois níveis de Fe (0 e 35 mg/kg), Ca (0 e 5 g/kg) e FTI (0 e 100 g/kg) nas rações; no segundo, utilizou-se um modelo de repleção de Hb em ratos anêmicos. As fontes de FTI foram a Raftilose P95 (ensaios 1 e 2), fonte purificada, e a farinha de yacón (FY; ensaio 2); os sais de Fe utilizados foram o $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$ (ensaios 1 e 2) e o FeSO_4 microencapsulado com alginato (ensaio 2). No primeiro ensaio foram avaliados parâmetros bioquímicos de Fe, concentração de minerais nos ossos, fígado e baço, e parâmetros de resistência e histomorfometria óssea. Após 33 d, não foram observados efeitos na retenção óssea de Ca, porém observou-se maior volume trabecular ósseo e parâmetros histomorfométricos de formação óssea nos animais deficientes em Fe alimentados com os FTI. No segundo ensaio foram determinados parâmetros hematológicos, de biodisponibilidade de Fe, e parâmetros intestinais (balanço mineral; pH, ácidos graxos de cadeia curta e espécies de Fe no conteúdo intestinal). A FY recuperou os animais da deficiência de Fe mais rapidamente do que a Raftilose. Esse efeito ocorreu em função de alterações intestinais provocadas pelo aumento da fermentação desses carboidratos, que afetou a solubilidade do Fe da dieta. Concluiu-se que os FTI aumentaram a biodisponibilidade de minerais, possivelmente por influência da concentração do mineral e pelas interações entre os minerais presentes na ração, pelo tempo de ensaio, pela matriz alimentar, e pelo modelo experimental utilizado.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of inulin-type fructans (ITF) on mineral bioavailability in rats, focusing mainly on Ca and Fe. Two experiments were carried out: the first one considered a 2×2×2 factorial model using two levels of Fe (0 and 35 mg/kg), Ca (0 and 5 g/kg) and ITF (0 and 100 g/kg) in the diets; the second experiment considered a Hb repletion model in anemic rats. Raftilose P95 (experiments 1 and 2; purified source) and yacon flour (YF; experiment 2) were used as ITF sources; the Fe salts used were $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$ (experiments 1 and 2) and microencapsulated FeSO_4 with alginate (experiment 2). In the first experiment, Fe biochemical parameters, mineral concentration in the bones, liver and spleen, bone strength and histomorphometrical parameters were evaluated. After 33 d, no effects on bone retention were observed, but a larger bone volume and larger bone-formation parameters were observed on Fe-deficient animals fed with ITF. In the second experiment, hematological, Fe bioavailability and intestinal parameters (mineral balance, pH, short-chain fatty acids and Fe species in the intestinal content) were determined. Fe-deficient animals fed with YF recovered more rapidly than those fed with Raftilose. This effect took place as a function of intestinal alterations caused by the increased fermentation of these carbohydrates, which affected dietary Fe solubility. It can be concluded that ITF increased the bioavailability of minerals, possibly due to the influence of mineral concentration and interactions between minerals in the diet, experiment duration, food matrix and experimental model used.

INTRODUÇÃO

A partir da década de 1950, estudos epidemiológicos passaram a demonstrar a existência de forte relação entre o aumento da incidência de doenças crônicas não-transmissíveis com o consumo de alimentos processados e refinados, o que levou ao estabelecimento de uma relação causal entre o surgimento dessas doenças e a quantidade de fibra alimentar (FA) presente na dieta (BURKITT, 1973). Desde então, as pesquisas revelaram inúmeros benefícios das fibras na redução do risco de doenças e na manutenção da saúde, enfatizando a importância do consumo de alimentos que contenham teor elevado destes componentes.

A FA foi originalmente definida como “polissacarídeos e lignina encontrados na parede celular dos vegetais que não sofrem hidrólise pelas enzimas do trato digestório em humanos e animais” (TROWELL, 1972; TROWELL *et al.*, 1976). Entretanto, essa definição tornou-se inadequada, uma vez que excluía componentes que não fazem parte da parede celular e que também não sofrem ação das enzimas digestivas no intestino delgado, tais como frutanos, oligossacarídeos e amidos resistentes, entre outros. Neste aspecto, vários trabalhos foram publicados com o objetivo de estabelecer uma classificação para os diferentes tipos de carboidratos, levando-se em consideração critérios químicos e fisiológicos (ASP, 1995; CUMMINGS & ENGLYST, 1995; ASP, 1996; CUMMINGS & MacFARLANE, 2002).

Em 2001, a Associação Americana de Químicos de Cereais (*American Association of Cereal Chemists*; AACC) definiu FA como: “a parte comestível de vegetais ou carboidratos análogos que resistem à digestão e absorção no intestino delgado do ser humano, sendo fermentada completa ou parcialmente no intestino grosso. Incluem polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina e substâncias associadas aos vegetais, promovendo efeitos fisiológicos benéficos, incluindo

laxação, e/ou atenuação do colesterol sanguíneo e/ou atenuação da glicose sanguínea” (AACC, 2001). A diversidade dos efeitos fisiológicos da FA passou então a ser baseada na caracterização química dos seus constituintes; a combinação entre características químicas e fisiológicas permitiria que o conhecimento do papel das FA na nutrição e na saúde fosse mais bem delineado.

Nos últimos anos, estudos têm ressaltado o potencial de determinados componentes da FA em modular a composição e a atividade metabólica da microbiota intestinal, favorecendo a produção de bactérias bifidogênicas em detrimento de espécies consideradas nocivas para o hospedeiro (ROBERFROID, 2007). Dentre esses componentes, os frutanos do tipo inulina (FTI; frutooligossacarídeos [FOS] e inulina) vêm sendo os mais estudados. Os FTI são constituídos por uma ou mais unidades de frutose ligadas (GF_n) ou não (Fn) a uma molécula terminal de sacarose e se diferenciam pelo seu grau de polimerização (GP): a inulina é caracterizada por moléculas com um GP acima de 10 unidades monossacarídicas, enquanto que o GP dos FOS varia de 2 a 10 unidades. Podem apresentar estrutura linear ou ramificada com moléculas unidas por ligações do tipo $\beta(2\rightarrow1)$, as quais interferem na sua digestibilidade no trato digestório (FILISSETTI & LOBO, 2006).

Os FTI são encontrados em quase todas as espécies da família *Asteraceae*, muitas das quais apresentam importância econômica, como o almeirão (*Chicorium intybus*) (15-20 g/100 g), o tupinambo (*Helianthus tuberosus*) (17-20 g/100 g) e o yacón (*Smallanthus sonchifolius*) (20-55 g/100 g) (CARVALHO & FIGUEIREDO-RIBEIRO, 2001). São encontrados também em outros alimentos, como trigo (*Triticum aestivum*) (1-4 g/100 g), cebola (*Allium cepa*) (1-7 g/100 g), banana (*Musa cavendishii*) (até 1 g/100 g), alho (*Allium sativum*) (até 16 g/100 g) e alho-poró (*Allium ampeloprasum*) (3-10 g/100 g) (VAN LOO *et al.*, 1995; MOSHFEGH *et al.*, 1999; DER AGOPIAN *et al.*, 2008).

Essas fibras vêm sendo estudadas e comercializadas no Japão, nos EUA e na Europa como produtos para a indústria de alimentos com teor calórico reduzido (LOBO & LEMOS SILVA, 2003). Estima-se que seu consumo diário nos EUA esteja em torno de 1 a 4 g, chegando a 11 g/d na Europa (VAN LOO *et al.*, 1995; MOSHFEGH *et al.*, 1999). No Brasil, ainda não há dados de consumo diário desse carboidrato; contudo, estima-se que o consumo diário de FA total pela população brasileira tenha sofrido redução ao longo dos anos: na década de 1970 era de 19 g/d, caindo para 16 g/d, na década de 1980, e chegando a 12 g/d na década de 1990 (LAJOLO & MENEZES, 2001). As recomendações nutricionais propostas para a população brasileira sugerem que uma dieta deva conter, no mínimo, 20 g de FA/d para adolescentes e adultos (LAJOLO & MENEZES, 2001).

Por outro lado, também a caracterização dos componentes das matrizes alimentares e o conhecimento de sua influência na absorção e biodisponibilidade de nutrientes têm sido alvo de muitos estudos ao longo dos anos. Em particular, a biodisponibilidade dos minerais de uma dieta depende do estado nutricional do organismo em relação ao mineral, da forma química do mineral, além da presença de componentes presentes na matriz do alimento que podem influenciar a absorção intestinal e a utilização do mineral pelo organismo (PINTO *et al.*, 1997; POLTRONIERI *et al.*, 2000; COLLI, 2006; LOBO *et al.*, 2008).

O efeito da FA na biodisponibilidade de minerais é ainda controverso. Embora componentes da fração fibra, como pectina ou celulose, não sejam hidrolisados pelas enzimas do trato digestório, da mesma forma que FTI ou outros oligossacarídeos resistentes, determinadas propriedades físico-químicas, como dispersibilidade, viscosidade, capacidade de adsorção de água e potencial fermentativo, podem explicar a variação nos efeitos fisiológicos apresentados por esses carboidratos (SCHNEEMAN, 1999).

Estudos realizados em animais e humanos têm ressaltado o potencial prebiótico dos FTI porque favorecem a multiplicação de bactérias bifidogênicas em

detrimento de bactérias patogênicas para o hospedeiro (ROBERFROID, 2007). O processo fermentativo favorece a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), importantes para a manutenção da integridade da mucosa intestinal e para a função imunológica, de um lado, e para o metabolismo de carboidratos e lipídeos e biodisponibilidade de minerais, do outro (SEIFERT & WATZL, 2007; DELZENNE *et al.*, 2007; SCHOLZ-AHRENS & SCHREZENMEIR, 2007).

Com a fermentação bacteriana, a absorção de alguns minerais é afetada, uma vez que ocorre diminuição do pH do lúmen intestinal e aumento da solubilidade desses minerais (LOBO *et al.*, 2006; SCHOLZ-AHRENS *et al.*, 2007). Esse efeito é acompanhado por modificações na arquitetura da mucosa intestinal, reflexos de aumento na celularidade e no número de criptas, que podem contribuir para um aumento na superfície absorptiva para os minerais (RÉMÉSY *et al.*, 1993; KLEESSEN *et al.*, 2003; LOBO *et al.*, 2007; LOBO *et al.*, 2008). A fermentação bacteriana ainda é acompanhada por aumento no fluxo sangüíneo, vasodilatação das artérias do intestino grosso e aumento da permeabilidade das junções oclusivas (YOUNES *et al.*, 2001; MINEO *et al.*, 2002). Outros estudos demonstraram que o consumo de FTI pode influenciar a expressão de genes relacionados com a síntese de proteínas envolvidas com o processo absorptivo, tais como a calbindina-D_{9k} (para o Ca), o DMT-1 e a ferroportina (para o Fe), e o ZnT1 (para o Zn) (RASCHKA & DANIEL, 2005; NZEUSSEU *et al.*, 2006; TAKO *et al.*, 2006, 2008). Todos esses mecanismos reforçam a influência da fermentação bacteriana dos FTI na absorção intestinal pelas vias paracelular e transcelular. Além disso, esses efeitos resultam em aumento na biodisponibilidade, que é demonstrado pela maior retenção dos minerais em seus tecidos-alvo (LOBO *et al.*, 2006; NZEUSSEU *et al.*, 2006; LOBO *et al.*, 2007; SCHOLZ-AHRENS & SCHREZENMEIR, 2007).

É importante também considerar que as interações entre os minerais de uma dieta podem ocorrer de maneira direta ou indireta. As interações diretas são

geralmente fenômenos competitivos que ocorrem durante a absorção intestinal ou utilização tecidual, enquanto que as indiretas ocorrem quando um mineral está envolvido no metabolismo do outro, de modo que a deficiência de um acarreta no prejuízo da função do outro (LOBO & TRAMONTE, 2004). Deste modo, a avaliação e a intervenção no estado nutricional em minerais não podem ser consideradas de forma isolada, e fatores de ordem fisiológica e nutricional podem interferir na sua absorção, transporte e armazenamento. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar, em ratos, as consequências do consumo dos FTI na biodisponibilidade de minerais, considerando a interação entre os minerais e o estado nutricional, utilizando modelos experimentais de deficiência mineral, com particular enfoque para o Ca e o Fe.

OBJETIVOS

Geral

Estudar o efeito da suplementação com FTI na biodisponibilidade de minerais em ratos.

Específicos

- 1) Avaliar, em ratos deficientes em Fe e/ou Ca, a influência do consumo de FTI, provenientes de uma fonte purificada (Raftilose® P95), na biodisponibilidade de Ca e Fe, por análises bioquímicas, físicas e histológicas, com o intuito de investigar possíveis alterações na composição em minerais nos tecidos, bem como na resistência e na arquitetura do osso.
- 2) Comparar o efeito de FTI de duas diferentes fontes de FTI (farinha de yacón e Raftilose® P95) na biodisponibilidade de Fe pela eficiência da recuperação da Hb em ratos anêmicos, bem como sua influência na fisiologia intestinal (pH luminal, produção de AGCC e absorção de minerais).

CAPÍTULO 1

Efeitos da suplementação com frutooligossacarídeos no conteúdo mineral, na microarquitetura óssea e na biodisponibilidade de ferro em ratos deficientes em cálcio e/ou ferro

Título em inglês: “Effects of fructooligosaccharides on bone mineral content and microarchitecture and on iron bioavailability in calcium and iron-deficient rats”

Título abreviado: Frutooligossacarídeos e biodisponibilidade de minerais

Número de figuras: 3

Número de tabelas: 6

Introdução

É bem estabelecido que a biodisponibilidade de minerais é influenciada por vários componentes da dieta, muitos dos quais estão associados aos polissacarídeos de parede celular (fibra alimentar, FA) (FILISSETTI & LOBO, 2006). Neste contexto, os fitatos foram bem estudados em função dos seus efeitos inibidores na absorção de macrominerais e microminerais, atribuídos à formação de complexos insolúveis durante o trânsito intestinal (HALLBERG *et al.*, 1987; HURRELL, 2002). Por outro lado, os oligossacarídeos resistentes à digestão no intestino delgado são componentes funcionais que têm recebido considerável atenção em função de seus efeitos positivos na biodisponibilidade de minerais. Entre estes carboidratos, os frutanos do tipo inulina (FTI; frutooligossacarídeos [FOS] e inulina) têm sido os mais estudados, por serem seletivamente fermentados no intestino grosso e proporcionarem um meio adequado para a absorção de minerais (RÉMÉSY *et al.*, 1993; RASCHKA & DANIEL, 2005; LOBO *et al.*, 2006; LOBO *et al.*, 2007; ABRAMS *et al.*, 2007; SCHOLZ-AHRENS & SCHREZENMEIR, 2007).

Até o momento, a maioria dos estudos, em animais e humanos, avaliou a influência do consumo de FTI na composição mineral do osso, especialmente em Ca e Mg. O tecido ósseo é uma combinação de componentes de matriz mineralizada e não mineralizada. Os principais componentes da matriz mineralizada são o Ca e o P, que participam da composição da hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), desempenhando, desta forma, um importante papel na manutenção da resistência e da integridade mecânica do esqueleto. Entretanto, outros minerais e vitaminas são importantes em reações e processos metabólicos que ocorrem no osso (NIEVES, 2005). Por exemplo, o Cu e o Fe atuam, respectivamente, como cofatores para a atividade de enzimas como a lisil oxidase e a lisil hidroxilase, que participam do processo de síntese do colágeno

(MEDEIROS *et al.*, 1997). O Zn é um cofator para a fosfatase alcalina, que tem sido implicada com formação e mineralização ósseas (YAMAGUSHI & YAMAGUSHI, 1986).

Assim, quando a saúde óssea é considerada, faz-se necessário também avaliar a interação com outros minerais da dieta importantes no processo de remodelamento ósseo, bem como a magnitude desses efeitos na microestrutura trabecular do osso, região mais rapidamente responsiva a modificações na homeostase de minerais. Nesse aspecto, os poucos trabalhos que abordaram a interação dos FTI com microminerais como o Fe, o Cu e o Zn apresentaram resultados controversos (SCHOLZ-AHRENS & SCHREZENMEIR, 2007). Desta forma, considerando que os estoques corporais influenciam a capacidade absorviva e, provavelmente, os níveis desses micronutrientes em seus tecidos-alvo, no presente estudo, os efeitos da suplementação com FTI foram avaliados na concentração mineral dos tecidos (ossos, fígado e baço), como medida de sua biodisponibilidade. A qualidade do osso foi ainda estudada por análises biomecânicas e histomorfométricas, para avaliação da resistência e da estrutura óssea, respectivamente, em um modelo de deficiência de Fe e/ou Ca em ratos em crescimento.

Material e métodos

Animais e rações experimentais

Quarenta e oito ratos machos da linhagem Wistar, com 4 semanas de idade, inicialmente pesando 54-56 g, foram obtidos a partir de colônias do Biotério de Produção e Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP (CEEAA 88/2005

FCF-USP), de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os animais foram mantidos em gaiolas semimetabólicas individuais, com temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55 \pm 10\%$) controladas, e ciclo claro-escuro de 12 h (período claro entre 8-20 h).

As rações experimentais foram suplementadas com Raftilose® P95 (RAF; *Orafti-Active Food International*, Tienen, Bélgica), doada pela Clariant S/A (São Paulo, Brasil). De acordo com o certificado de análise, este produto contém 93% de FTI consistindo de moléculas (GF_n) com grau de polimerização (GP) médio de 4. Os FTI foram adquiridos pela hidrólise enzimática parcial da inulina, que foi extraída de raízes de almeirão (*Chicorium intybus*). O pirofosfato férrico (PF; $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$), um sal de Fe de baixa biodisponibilidade, foi obtido da Fermavi Eletroquímica Ltda (São Paulo, Brasil). A formulação das rações experimentais foi modificada da formulação preconizada pela AIN (*American Institute of Nutrition*) (AIN-93G; REEVES *et al.*, 1993) (Tabela 1.1). Os teores de FTI na RAF foram subtraídos dos teores de sacarose e de amido adicionados às rações. O Fe, na forma de PF e o Ca, na forma de carbonato de cálcio (CaCO_3) foram substituídos pela sacarose na mistura mineral das rações deficientes em Fe e Ca, respectivamente. Os seguintes fatores foram utilizados para o cálculo da energia: 4 para carboidratos e proteínas, 9 para os lipídeos e 1 para os FTI (ROBERFROID *et al.*, 1993).

Tabela 1.1. Formulação das rações experimentais

Ingredientes (%)	CON	FOS
Caseína ¹	23,2	23,2
Fibras	5,0	5,0
Óleo de soja ²	7,0	7,0
L-cistina	0,3	0,3
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Mistura vitamínica ³	1,0	1,0
Mistura mineral modificada ⁴	3,5	3,5
Sacarose	10,0	-
Amido de milho	49,93	49,0
Raftilose P95 ⁵	-	10,75

¹ 78,2% proteína;

² Cargill Agrícola S/A;

³ Mistura vitamínica AIN-93-VX (REEVES *et al.*, 1993);

⁴ Modificado da mistura mineral (AIN-93G-MX, REEVES *et al.*, 1993), fornecendo (g/kg mix): CaCO₃, 538,18; KH₂PO₄, 196; NaCl, 74; K₂SO₄, 46,6; K₃C₆H₅O₇.H₂O, 70,78; MgO, 24; Fe₄(P₂O₇)₃, 4,12; ZnCO₃, 1,65; MnCO₃, 0,63; CuCO₃, 0,3; KIO₃, 0,01; Na₂SeO₄, 0,01025; paramolibdato de amônio, tetraidratado, 0,00795; Na₂SiO₃, 1,45; KCr(SO₄)₂.12H₂O, 0,275; H₃BO₃, 0,0815; NaF, 0,0635; NiCO₃, 0,0318; LiCl, 0,0174; NH₄VO₃, 0,0066; sacarose, 39,846;

⁵ Orafti Active Food International (Clariant, São Paulo, Brasil), 93% de FTI.

Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos em oito grupos, seguindo-se um delineamento fatorial 2x2x2 com 2 níveis de Fe (0 e 35 mg/kg), Ca (0 e 5 g/kg) e FTI (0 e 100g/kg) adicionados às rações. Os animais foram submetidos a 5 d de adaptação antes do início do período experimental. O consumo de ração foi determinado diariamente e o peso corporal a cada 2 d. Ração e água desmineralizada foram oferecidas *ad libitum*. O coeficiente de eficácia alimentar foi determinado como o ganho de peso corporal/ração consumida (g) ao final do experimento. Fezes foram coletadas durante 5 d (com início no 23º d de

experimento), e armazenadas a -20° C até o momento das análises. A umidade nas fezes foi determinada pela perda de peso das amostras aquecidas em estufa a 105°C.

Após 33 d, os animais foram anestesiados com uma mistura (1:1:0,4:1,6; v/v/v/v) de quetamina (10 mg/kg de peso corporal; Vetaset, Fort Dodge, Iowa, EUA), xilazina (25 mg/kg de peso corporal; Virbaxil 2%, Virbac, São Paulo, Brasil), acepromazina (2 mg/mL; Acepran 0,2%, Univet S/A Indústria Veterinária, São Paulo, Brasil) e H₂O desmineralizada. Após a anestesia ter causado inconsciência, o sangue foi coletado pela aorta abdominal para análise dos parâmetros bioquímicos de Fe. Após o sacrifício dos animais, o ceco (com o conteúdo) foi removido, pesado, colocado em uma placa de *petri* com gelo (LU *et al.*, 2000) e seccionado ao longo da curvatura menor. O pH do conteúdo do ceco foi determinado *in situ* inserindo-se um eletrodo (UP-25; Denver Instrument, Denver, Colorado, EUA) pela junção ileocecal. Alíquotas do conteúdo foram pesadas e armazenadas a -20° C até o momento das análises. O fígado foi perfundido pela veia subepática com solução de NaCl (9 g/L) para retirada do sangue do órgão. Os órgãos (fígado, baço e ossos) foram retirados, pesados e armazenados a -20° C. Fragmentos do fígado e baço foram removidos para análises histopatológicas.

Composição química das rações experimentais

Os seguintes componentes foram determinados: umidade, cinzas, extrato etéreo (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1995) e proteínas (micro-Kjeldahl; fator de conversão de 6,25; AOAC, 1995). As concentrações de Ca, Mg, Fe, Cu e Zn foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica (EAA; AAnalyst 100, Perkin Elmer, EUA), empregando-se lâmpadas de catodo oco, comprimento de onda de 422,7, 202,6, 283,4, 324,8 e 213,9 nm, e fendas de 0,7, 1,3, 0,2, 1,3 e 1,3 nm, respectivamente, após digestão por via úmida (HNO₃:H₂O₂, 5:1 v/v) e adição

de 0,1% (p/v) de lantânio, como La_2O_3 (para análises de Ca e Mg). As soluções padrão foram preparadas pela diluição dos padrões CaCl_2 , MgCl_2 , FeCl_3 , CuCl_2 e ZnCl_2 (Titrisol, Merck, Darmstadt, Alemanha). Para o controle de qualidade de cada ensaio, amostras do padrão de referência secundário (ração à base de caseína AIN-93G [REEVES *et al.*, 1993]) foram submetidas, em duplicata, ao mesmo procedimento de digestão e diluição. Os resultados da composição e da relação molar entre os minerais (Ca:Mg, Ca:Fe, Ca:Zn, Fe:Cu, Zn:Fe) nas rações experimentais encontram-se na Tabela 1.2.

Biodisponibilidade de Fe e conteúdo de minerais no fígado e baço

Amostras de sangue foram coletadas sem anticoagulante para a determinação da concentração de Fe sérico e da capacidade latente de ligação de Fe (UIBC; *Unsaturated Iron Binding Capacity*) (Labtest Diagnóstica S/A, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). A capacidade total de ligação de Fe (TIBC; *Total Iron Binding Capacity*) e a saturação da transferrina foram calculadas a partir dos valores de Fe sérico e UIBC. A concentração de Hb foi determinada pelo método da cianometa-Hb (DRABKIN & AUSTIN, 1935). A concentração de Hb e o consumo de Fe foram utilizados para estimar o *pool* de Fe de Hb, assumindo o volume total de sangue de 6,7% do peso corporal do rato e o conteúdo médio de Fe na Hb de 0,335%, de acordo com a equação (MAHONEY *et al.*, 1974):

$$\text{Pool Fe Hb (mg)} = [\text{peso corporal (g)} \times \text{Hb (g/L)} \times 6,7 \times 0,335] / 10.000$$

A concentração de minerais (Fe, Cu e Zn) no fígado e baço foi determinada por EAA, conforme descrito para as análises das rações experimentais.

Propriedades mecânicas e conteúdo de minerais nos ossos

As propriedades mecânicas foram avaliadas na região média da diáfise das tíbias direitas utilizando-se um teste de flexão em 3 pontos (LOBO *et al.*, 2006), onde os ossos foram comprimidos perpendicularmente por uma lâmina até a fratura, utilizando-se um analisador de textura TA-TX2 acoplado ao programa *Texture Expert*, versão 1.2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Inglaterra). Para o ensaio, os ossos foram descongelados à temperatura ambiente e reidratados em solução salina. O comprimento e o diâmetro (medido na região média da diáfise) foram determinados por um paquímetro digital (Mitutoyo Sul América Ltda, Suzano, São Paulo, Brasil). Os ossos foram fraturados sob as seguintes condições: 16 mm de espaço entre os suportes, 0,2 mm/s de velocidade da lâmina e 25 kg de carga.

As concentrações de Ca, Mg e Zn nas tíbias e fêmures esquerdos previamente dessecados (105°C, 12 h) foram determinadas por EAA, conforme descrito anteriormente. A concentração de P foi determinada por análise colorimétrica a 660 nm (FISKE & SUBBAROW, 1925).

Histomorfometria óssea

Ao final do período experimental, o fêmur distal direito foi cuidadosamente dissecado e fixado em etanol a 70%, desidratado e imerso em metilmetacrilato; em seguida, cortes longitudinais de 5 µm de espessura foram obtidos com um micrótomo Polycut S (Leika, Alemanha). Os cortes foram corados com azul de toluidina a 0,1%, pH 6,4. Pelo menos 2 cortes não consecutivos foram analisados por cada amostra. Parâmetros estruturais do osso trabecular foram medidos na metáfise distal (aumento de $\times 250$), a 195 µm da cartilagem epifisial, no total de 20 campos microscópicos, utilizando-se um sistema de análise de imagem semi-

automático e um microscópio equipado com uma câmera escura e uma mesa digital ligada a um computador com o programa *OsteoMeasure* (Osteometrics Inc., Atlanta, GA, EUA). Os parâmetros estáticos avaliados foram: volume trabecular ósseo, expresso como porcentagem do volume do tecido (BV/TV, %); superfície osteóide (OS/BS, %), expressa como porcentagem da superfície óssea (Ob.S/BS, %) e o número de osteoblastos por área de tecido (N.Ob/T.Ar, /mm²), como parâmetros de formação óssea; e a superfície erodida (ES/BS, %), expressa como porcentagem da superfície óssea, e o número de osteoclastos por área (N.Oc/T.Ar, /mm²), como parâmetros de reabsorção óssea. Todos os parâmetros histomorfométricos foram utilizados de acordo com a nomenclatura recomendada pela *American Society of Bone and Mineral Research* (PARFITT *et al.*, 1987).

Análises estatísticas

A análise dos dados foi realizada com o pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*, Chicago, Illinois, EUA) para o *Windows*, versão 11.5 (2002). Todos os testes foram realizados assumindo-se hipóteses bilaterais e nível de significância de 5%. Inicialmente foi utilizada a estatística descritiva para avaliar a média e o desvio padrão (DP) das variáveis de interesse. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. As comparações das médias das variáveis entre os grupos foram realizadas pela ANOVA (MONTGOMERY, 2001). Para as diferenças significativas, o *post-hoc* de *Tukey* foi aplicado para identificar onde ocorreram essas diferenças. A normalidade das observações foi verificada pelo teste não-paramétrico de *Komogorov-Smirnov* (CONOVER, 1999) e, em caso de rejeição da suposição de normalidade, os testes *t* não-pareado e ANOVA foram substituídos, respectivamente, pelos testes não-paramétricos de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* (CONOVER, 1999).

Resultados

Ganho de peso corporal, consumo de ração e peso dos órgãos

A suplementação com FTI afetou negativamente o consumo total de ração (33 d) em todas as condições experimentais avaliadas; entretanto, tal efeito foi estatisticamente significativo somente quando da presença da deficiência de Fe nas rações (grupo Fe[-]FTI; -20%; grupo Ca[-]Fe[-]FTI; -25%; $P = 0,002$; Tabela 1.3). Além disso, todos os grupos deficientes suplementados com os FTI tiveram um menor ganho de peso corporal em relação ao grupo controle, sendo o grupo deficiente em ambos os minerais o mais afetado (grupo [Ca[-]Fe[-]FTI; -41%; $P < 0,001$). Os animais do grupo Fe[-] apresentaram menor peso relativo do fígado ($P = 0,011$) em relação ao grupo controle. Por outro lado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no peso relativo médio do baço entre os grupos experimentais ($P = 0,093$).

Avaliação dos parâmetros intestinais

Com relação aos parâmetros intestinais avaliados (excreção e umidade das fezes, peso do ceco e pH do conteúdo do ceco), de um modo geral, a excreção fecal de 5 d (com início no 23º d de experimento), expressa em base seca, foi similar entre os grupos experimentais, considerando que a suplementação com os FTI resultou em maior teor de umidade nas fezes em relação aos grupos não suplementados (principalmente nos grupos deficientes em Ca; $P < 0,001$). O consumo dos FTI também resultou em considerável aumento no peso relativo do tecido e do conteúdo do ceco (g/100 g de peso corporal) em relação aos grupos não suplementados (FTI vs. CON, +200% e +290%; Ca[-]FTI vs. Ca[-], +140% e +315%; Fe[-]FTI vs. Fe[-], +266% e +358%; e Ca[-]Fe[-]FTI vs. Ca[-]Fe[-], +157% e +394%, respectivamente; $P < 0,001$; Tabela 1.3). Além disso, observou-se uma

redução nos valores de pH no conteúdo do ceco dos animais que consumiram os FTI ($P < 0,001$; Tabela 1.3).

Biodisponibilidade de Fe e conteúdo de minerais no fígado e baço

Alterações nos parâmetros bioquímicos de Fe e nas concentrações de Fe no fígado e baço foram observadas nos animais deficientes em Fe (Tabela 1.4). Além disso, esses mesmos parâmetros não foram afetados pelo consumo dos FTI, com exceção do grupo Ca[-]FTI, que apresentou, em relação ao grupo controle, maior concentração hepática de Fe e Zn ($P < 0,001$).

Avaliação dos parâmetros ósseos

A deficiência de Ca afetou negativamente o peso seco da tíbia, independentemente da suplementação com FTI ($P < 0,001$; Tabela 1.5). Além disso, a suplementação com FTI afetou negativamente ($P < 0,001$) o comprimento da tíbia nos animais deficientes em Ca e Fe (grupo Ca[-]Fe[-]FTI). Como esperado, os animais deficientes em Ca (grupos Ca[-], Ca[-]FTI, Ca[-]Fe[-] e Ca[-]Fe[-]FTI) apresentaram alterações em todos os parâmetros de resistência óssea (resiliência, carga elástica, rigidez e carga máxima) ($P < 0,001$; Tabela 1.5) estudados. Por outro lado, o consumo dos FTI afetou de maneira positiva a resiliência, ou seja, a capacidade do osso de absorver energia na região de comportamento elástico nos animais não-deficientes (grupo FTI). Não foram observadas diferenças significativas na energia absorvida total (regiões plástica e elástica) da tíbia entre os grupos experimentais.

Como esperado, os animais deficientes em Ca apresentaram uma diminuição significativa na massa óssea, ilustrada pela menor concentração de Ca em ambos os ossos (fêmur e tíbia; Tabela 1.6) e no BV/TV no fêmur ($P < 0,001$; Fig. 1.1). Esses resultados foram associados com diminuição no número de

osteoblastos (Fig. 1.2) e maior atividade osteoclástica, demonstrada pelo aumento nos parâmetros de reabsorção óssea (ES/BS e N.Oc/T.Ar) no fêmur dos animais deficientes em Ca em relação aos do grupo controle (Fig. 1.3).

O nível de Fe nas rações teve influência negativa na concentração de Mg nos ossos, sendo esse efeito observado de maneira significativa na tíbia ($P < 0,001$). Observou-se aumento no BV/TV (Fig. 1.1) e no N.Ob/T.Ar (Fig. 1.2) nos animais do grupo Fe[-]FTI em relação aos do grupo Fe[-]. Por outro lado, o consumo de FTI não influenciou as concentrações de Ca, P, Mg e Zn no fêmur nos animais não-deficientes; no entanto, a tíbia apresentou maior concentração de Mg nos animais do grupo FTI em relação aos do grupo controle ($P < 0,001$). Além disso, a concentração de Zn (em ambos os ossos) foi consideravelmente aumentada nos animais do grupo Ca[-]FTI em relação ao grupo controle ($P < 0,001$). O consumo de FTI resultou ainda em redução de 37% e 36% na ES/BS e no N.Oc/T.Ar, respectivamente, em relação ao controle (Fig. 1.3).

Tabela 1.2 - Composição química e relação molar entre minerais nas rações experimentais

Composição (%)	CON	FTI	Ca[-]	Ca[-]FTI	Fe[-]	Fe[-]FTI	Ca[-]Fe[-]	Ca[-]Fe[-]FTI	P
Umidade	8,54 ± 0,11 ^a	8,65 ± 0,18 ^a	8,65 ± 0,07 ^a	8,58 ± 0,28 ^a	8,74 ± 0,34 ^{ac}	8,77 ± 0,31 ^{ac}	7,61 ± 0,07 ^b	9,35 ± 0,37 ^c	0,000
Proteína (N × 6,25)	18,62 ± 0,35 ^{abc}	18,42 ± 0,15 ^{ab}	18,72 ± 0,04 ^{bd}	18,18 ± 0,17 ^a	18,40 ± 0,09 ^{ab}	18,42 ± 0,20 ^{ab}	19,06 ± 0,18 ^{cde}	19,16 ± 0,05 ^{cde}	0,000
Extrato etéreo	7,33 ± 0,20 ^{ac}	7,25 ± 0,21 ^{ac}	8,03 ± 0,39 ^b	7,29 ± 0,18 ^{ac}	7,23 ± 0,29 ^{ac}	6,80 ± 0,16 ^c	7,47 ± 0,06 ^{ab}	7,77 ± 0,06 ^{ab}	0,000
Cinzas	2,97 ± 0,18 ^a	2,68 ± 0,13 ^a	1,79 ± 0,04 ^{bd}	1,76 ± 0,08 ^{bd}	2,70 ± 0,08 ^a	2,75 ± 0,17 ^a	1,93 ± 0,13 ^{bc}	1,57 ± 0,10 ^d	0,000
Ca (mg/kg)	5.506,3 ± 49,5 ^a	5.432,9 ± 110,0 ^{ac}	1.570,9 ± 28,0 ^b	1.655,5 ± 16,2 ^b	5.140,9 ± 34,0 ^d	5.357,2 ± 77,8 ^a	1.648,6 ± 29,6 ^b	1.558,4 ± 53,7 ^b	0,000
Mg (mg/kg)	413,98 ± 12,65 ^a	424,11 ± 10,42 ^{ab}	446,68 ± 9,26 ^b	408,51 ± 2,56 ^a	324,77 ± 14,67 ^{ac}	354,44 ± 10,5 ^c	451,44 ± 4,73 ^b	408,38 ± 1,91 ^a	0,000
Fe (mg/kg)	68,0 ± 3,0 ^a	64,6 ± 2,2 ^a	47,9 ± 1,5 ^b	41,1 ± 0,8 ^c	12,6 ± 0,5 ^d	12,3 ± 0,4 ^d	14,7 ± 0,8 ^d	15,5 ± 0,7 ^d	0,000
Cu (mg/kg)	12,2 ± 0,2 ^a	7,8 ± 0,2 ^{bd}	12,1 ± 0,1 ^a	9,3 ± 0,3 ^c	12,0 ± 0,3 ^a	7,3 ± 0,2 ^d	12,1 ± 0,4 ^a	9,4 ± 0,1 ^c	0,000
Zn (mg/kg)	48,1 ± 2,3 ^{ac}	45,3 ± 1,6 ^{abc}	41,2 ± 1,8 ^{abc}	43,9 ± 3,9 ^{abc}	38,2 ± 3,2 ^b	39,8 ± 0,8 ^b	41,2 ± 3,1 ^{abc}	45,4 ± 2,0 ^c	0,003
Rel. molar Ca:Mg	4,0	3,9	1,1	1,2	4,5	4,6	1,1	1,2	-
Rel. molar Ca:Fe	112,9	117,2	45,7	58,3	572,1	608,7	157,0	140,1	-
Rel. molar Ca:Zn	187,3	196,1	62,4	61,9	220,7	220,3	65,6	56,1	-
Rel. molar Fe:Cu	6,3	9,4	4,5	4,9	1,2	1,9	1,4	1,9	-
Rel. molar Zn:Fe	0,6	0,6	0,7	0,9	2,6	2,8	2,4	2,5	-

FTI = frutanos do tipo inulina; ¹ Resultados expressos como média ± DP (*n* = 3). Todos os testes foram realizados assumindo-se hipóteses bilaterais e nível de significância de 5%. As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey; ^{a,b,c,d,e} Valores com sobrescritos diferentes são significativamente diferentes (*P* < 0,05).

Tabela 1.3 - Ganho de peso corporal, consumo de ração, excreção fecal, peso relativo dos órgãos e parâmetros intestinais em ratos deficientes em Ca e Fe alimentados com rações controle e suplementadas com 10% de FTI por 33 d ¹

Variáveis	CON	FTI	Ca[-]	Ca[-]FTI	Fe[-]	Fe[-]FTI	Ca[-]Fe[-]	Ca[-]Fe[-]FTI	P
Ganho de peso corporal (g)	185,0 ± 22,7 ^a	155,0 ± 25,1 ^{ab}	155,7 ± 16,6 ^{ab}	140,0 ± 11,1 ^{bc}	162,5 ± 27,8 ^{ab}	143,4 ± 25,8 ^{bc}	135,7 ± 27,6 ^{abc}	109,2 ± 25,1 ^c	0,000
Consumo de ração (g/33 d)	481,9 ± 39,3 ^a	432,5 ± 73,2 ^{abc}	444,3 ± 34,7 ^{abc}	425,2 ± 33,2 ^{abc}	454,0 ± 41,4 ^b	386,0 ± 47,7 ^{bc}	442,3 ± 52,4 ^{abc}	361,8 ± 40,3 ^c	0,002
Eficácia alimentar	0,38 ± 0,02 ^a	0,36 ± 0,02 ^a	0,35 ± 0,02 ^{ab}	0,33 ± 0,01 ^{ab}	0,36 ± 0,04 ^{ab}	0,35 ± 0,04 ^{ab}	0,32 ± 0,03 ^{ab}	0,30 ± 0,04 ^b	0,003
Excreção fecal (g/5 d, seco)	6,9 ± 1,3 ^a	6,0 ± 1,3 ^{ab}	4,4 ± 1,3 ^b	5,3 ± 1,4 ^{ab}	6,2 ± 1,0 ^{ab}	6,7 ± 1,8 ^{ab}	5,6 ± 0,8 ^{ab}	4,3 ± 1,5 ^b	0,009
Umidade fezes (%)	17,7 ± 4,3 ^a	25,5 ± 3,6 ^a	24,0 ± 8,6 ^a	37,9 ± 9,4 ^b	20,5 ± 2,0 ^a	27,1 ± 5,3 ^{ab}	19,9 ± 5,5 ^a	31,7 ± 7,2 ^b	0,000
Peso do fígado (g/100 g)	3,9 ± 0,3 ^a	3,5 ± 0,2 ^{ab}	3,9 ± 0,5 ^{ab}	3,9 ± 0,2 ^{ab}	3,3 ± 0,2 ^b	3,3 ± 0,2 ^{ab}	3,6 ± 0,4 ^{ab}	3,5 ± 0,4 ^{ab}	0,011
Peso do baço (g/100 g)	0,2 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,0 ^a	0,093
Peso do tecido cecal (g/100g)	0,3 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,2 ^b	0,5 ± 0,1 ^{ac}	1,2 ± 0,3 ^d	0,3 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,2 ^{bd}	0,7 ± 0,1 ^{ce}	1,8 ± 0,2 ^f	0,000
Peso do conteúdo cecal (g/100g)	1,1 ± 0,2 ^a	4,3 ± 0,7 ^b	1,3 ± 0,2 ^a	5,4 ± 2,1 ^b	1,2 ± 0,2 ^a	5,5 ± 0,1 ^b	1,7 ± 0,5 ^c	8,4 ± 1,8 ^c	0,000
pH conteúdo cecal	7,4 ± 0,4 ^a	5,9 ± 0,6 ^b	6,7 ± 0,2 ^c	5,3 ± 0,2 ^b	7,2 ± 0,2 ^{ac}	6,7 ± 0,4 ^c	6,9 ± 0,3 ^{ac}	5,4 ± 0,3 ^b	0,000

FTI = frutanos do tipo inulina; ¹ Resultados expressos como média ± DP (*n* = 6). Todos os testes foram realizados assumindo-se hipóteses bilaterais e nível de significância de 5%. As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey, ^{a,b,c,d,e,f} Valores com sobrescritos diferentes são significativamente diferentes (*P* < 0,05).

Tabela 1.4 - Biodisponibilidade de Fe e concentração de minerais no fígado e baço em ratos deficientes em Ca e Fe alimentados com rações controle e suplementadas com 10% de FTI por 33 d ¹

Variáveis	CON	FTI	Ca[-]	Ca[-]FTI	Fe[-]	Fe[-]FTI	Ca[-]Fe[-]	Ca[-]Fe[-]FTI	P
Hemoglobina (g/L)	132,2 ± 11,2 ^a	134,0 ± 16,4 ^a	134,3 ± 10,2 ^a	128,2 ± 9,5 ^{ab}	82,8 ± 23,7 ^c	99,1 ± 22,9 ^{bc}	93,7 ± 10,1 ^d	128,2 ± 5,5 ^{ab}	0,000
Pool Fe Hb (mg)	7,1 ± 0,9 ^a	6,4 ± 0,9 ^{ab}	6,3 ± 0,9 ^{ab}	5,6 ± 0,4 ^{ab}	4,1 ± 1,4 ^c	4,2 ± 0,5 ^c	4,2 ± 0,4 ^c	4,8 ± 0,7 ^{bc}	0,000
Fe sérico (µmol/dL)	5,4 ± 0,9 ^a	5,4 ± 0,7 ^a	5,8 ± 1,2 ^a	6,1 ± 1,3 ^a	0,5 ± 0,0 ^b	0,6 ± 0,2 ^b	1,1 ± 0,3 ^b	1,5 ± 0,2 ^b	0,000
TIBC (µmol/dL)	10,5 ± 0,7 ^a	10,5 ± 1,2 ^a	10,2 ± 1,1 ^a	12,0 ± 1,7 ^a	11,3 ± 1,6 ^a	11,3 ± 1,1 ^a	9,1 ± 1,4 ^a	10,2 ± 0,1 ^a	0,125
Saturação transferrina (%)	47,1 ± 2,5 ^a	51,0 ± 5,3 ^{ab}	59,4 ± 9,1 ^b	53,2 ± 3,5 ^{ab}	4,6 ± 0,6 ^c	4,9 ± 1,0 ^c	12,9 ± 4,4 ^d	13,8 ± 2,0 ^d	0,000
Fe fígado (µmol/g seco)	2,4 ± 0,5 ^a	2,9 ± 0,6 ^{ab}	2,6 ± 0,8 ^a	4,1 ± 1,3 ^b	0,6 ± 0,1 ^c	0,6 ± 0,1 ^c	0,5 ± 0,05 ^c	0,6 ± 0,1 ^c	0,000
Cu fígado (µmol/g seco)	0,15 ± 0,05 ^{ab}	0,22 ± 0,09 ^{ab}	0,11 ± 0,04 ^a	0,13 ± 0,05 ^{ab}	0,22 ± 0,05 ^{ab}	0,24 ± 0,09 ^b	0,12 ± 0,03 ^a	0,14 ± 0,03 ^{ab}	0,001
Zn fígado (µmol/g seco)	0,78 ± 0,27 ^a	1,00 ± 0,31 ^b	0,95 ± 0,11 ^a	2,79 ± 0,82 ^c	0,72 ± 0,07 ^a	0,97 ± 0,31 ^a	1,15 ± 0,38 ^a	1,38 ± 0,26 ^a	0,000
Fe baço (µmol/g seco)	4,5 ± 1,5 ^{ab}	3,8 ± 1,1 ^a	4,5 ± 0,9 ^{ab}	6,2 ± 1,7 ^b	2,8 ± 0,6 ^a	3,0 ± 1,1 ^a	3,1 ± 0,9 ^a	3,3 ± 0,4 ^a	0,000
Cu baço (µmol/g seco)	0,14 ± 0,03 ^{ab}	0,14 ± 0,05 ^{ab}	0,09 ± 0,03 ^a	0,22 ± 0,06 ^b	0,14 ± 0,05 ^{ab}	0,13 ± 0,04 ^a	0,09 ± 0,03 ^a	0,12 ± 0,02 ^a	0,001
Zn baço (µmol/g seco)	1,24 ± 0,13 ^a	1,28 ± 0,23 ^a	1,06 ± 0,14 ^a	1,42 ± 0,50 ^a	1,09 ± 0,13 ^a	1,21 ± 0,29 ^a	1,09 ± 0,07 ^a	1,33 ± 0,28 ^a	0,207

FTI = frutanos do tipo inulina; TIBC = Capacidade total de ligação de Fe;¹ Resultados expressos como média ± DP ($n = 6$). Todos os testes foram realizados assumindo-se hipóteses bilaterais e nível de significância de 5%. As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey; ^{a,b,c,d} Valores com sobrescritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Tabela 1.5 - Propriedades biomecânicas da tíbia direita em ratos deficientes em Ca e Fe alimentados com rações controle e suplementadas com 10% de FTI por 33 d¹

Variáveis	CON	FTI	Ca[-]	Ca[-]FTI	Fe[-]	Fe[-]FTI	Ca[-]Fe[-]	Ca[-]Fe[-]FTI	P
Peso seco (g)	0,29 ± 0,01 ^a	0,27 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,01 ^b	0,14 ± 0,01 ^b	0,27 ± 0,02 ^a	0,27 ± 0,04 ^a	0,15 ± 0,02 ^b	0,12 ± 0,02 ^b	0,000
Comprimento (mm)	36,6 ± 1,1 ^a	35,9 ± 0,7 ^{ab}	36,3 ± 0,5 ^{ab}	35,1 ± 0,6 ^b	36,3 ± 1,1 ^{ab}	35,5 ± 0,5 ^{ab}	35,9 ± 0,5 ^{ab}	33,6 ± 0,6 ^c	0,000
Diâmetro (mm)	2,43 ± 0,21 ^{ab}	2,43 ± 0,13 ^{ab}	2,33 ± 0,21 ^{ab}	2,23 ± 0,17 ^{ab}	2,56 ± 0,18 ^a	2,4 ± 0,26 ^{ab}	2,34 ± 0,19 ^{ab}	2,10 ± 0,23 ^b	0,025
Carga máxima (N)	49,5 ± 5,2 ^{ac}	52,8 ± 4,2 ^a	15,5 ± 1,6 ^b	13,4 ± 3,5 ^b	49,6 ± 2,5 ^{ac}	46,1 ± 4,2 ^c	13,1 ± 1,7 ^b	11,2 ± 3,5 ^b	0,000
Carga elástica (N)	39,1 ± 4,8 ^a	42,7 ± 5,2 ^a	14,1 ± 1,0 ^b	10,0 ± 1,1 ^b	38,6 ± 4,4 ^a	40,0 ± 3,2 ^a	8,5 ± 0,9 ^b	7,8 ± 3,0 ^b	0,000
Rigidez (N/mm)	66,4 ± 7,7 ^a	61,4 ± 6,5 ^a	21,8 ± 7,5 ^b	22,0 ± 2,7 ^b	66,6 ± 9,3 ^a	58,6 ± 12,5 ^a	24,5 ± 6,3 ^b	13,6 ± 3,9 ^b	0,000
Resiliência (Nmm)	11,5 ± 2,3 ^a	17,4 ± 4,4 ^b	5,1 ± 1,4 ^c	2,4 ± 0,7 ^c	11,1 ± 2,1 ^a	13,7 ± 2,0 ^{ab}	1,5 ± 0,5 ^c	2,2 ± 1,2 ^c	0,000
Energia absorvida (Nmm)	74,1 ± 14,9 ^a	69,3 ± 22,6 ^a	73,2 ± 20,5 ^a	57,9 ± 21,5 ^a	81,5 ± 8,2 ^a	74,0 ± 21,5 ^a	61,2 ± 9,5 ^a	57,5 ± 11,7 ^a	0,219

FTI = frutanos do tipo inulina; ¹ Resultados expressos como média ± DP ($n = 6$). Todos os testes foram realizados assumindo-se hipóteses bilaterais e nível de significância de 5%. As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de *Tukey*, ^{a,b,c} Valores com sobrescritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Table 1.6 - Concentração de Ca, P, Mg e Zn e relação Ca/P do fêmur e da tíbia direitos de ratos deficientes em Ca e Fe alimentados com rações controle e suplementadas com 10% de FTI por 33 d ¹

Variáveis	CON	FTI	Ca[-]	Ca[-]FTI	Fe[-]	Fe[-]FTI	Ca[-]Fe[-]	Ca[-]Fe[-]FTI	P
Fêmur									
Ca (mmol/g seco)	12,3 ± 0,4 ^a	12,6 ± 0,2 ^a	9,7 ± 0,6 ^{bc}	10,2 ± 1,6 ^b	12,7 ± 0,9 ^a	12,8 ± 0,5 ^a	10,1 ± 0,5 ^b	8,5 ± 0,3 ^c	0,000
P (mmol/g seco)	6,4 ± 1,3 ^{ac}	9,0 ± 1,2 ^{ab}	11,9 ± 0,8 ^b	6,9 ± 1,4 ^{ac}	5,5 ± 0,7 ^c	9,0 ± 2,5 ^{ab}	9,7 ± 2,5 ^b	11,8 ± 1,2 ^b	0,000
Mg (μmol/g seco)	150,5 ± 20,5 ^{abc}	142,8 ± 21,0 ^{abc}	153,6 ± 8,7 ^{abc}	171,4 ± 22,6 ^a	138,8 ± 18,8 ^{abc}	122,4 ± 19,1 ^c	151,4 ± 24,5 ^{abc}	165,3 ± 11,5 ^b	0,003
Zn (μmol/g seco)	6,4 ± 1,4 ^a	6,3 ± 1,7 ^a	9,9 ± 2,4 ^{ab}	16,5 ± 2,6 ^{cd}	6,2 ± 1,0 ^a	9,1 ± 2,0 ^{ad}	12,2 ± 4,8 ^{bde}	16,9 ± 4,2 ^e	0,000
Tíbia									
Ca (mmol/g seco)	12,4 ± 0,4 ^a	12,9 ± 0,4 ^a	9,5 ± 0,9 ^b	8,9 ± 0,7 ^b	13,2 ± 0,6 ^a	13,5 ± 1,7 ^a	10,0 ± 0,6 ^b	8,8 ± 0,3 ^b	0,000
P (mmol/g seco)	11,0 ± 0,8 ^{ab}	9,8 ± 1,6 ^{ab}	14,2 ± 4,7 ^a	7,4 ± 2,0 ^b	8,3 ± 2,4 ^b	8,9 ± 1,1 ^b	10,1 ± 1,5 ^{ab}	13,9 ± 3,7 ^a	0,000
Mg (μmol/g seco)	124,3 ± 3,5 ^{ade}	156,0 ± 12,6 ^{bd}	173,4 ± 13,8 ^b	118,8 ± 9,3 ^{ad}	83,5 ± 5,4 ^c	79,3 ± 15,9 ^c	133,1 ± 20,1 ^{de}	150,8 ± 21,4 ^{be}	0,000
Zn (μmol/g seco)	5,2 ± 0,5 ^a	5,9 ± 0,6 ^{ac}	6,8 ± 0,8 ^{ac}	14,4 ± 5,7 ^{bc}	5,9 ± 0,4 ^{ac}	6,4 ± 2,1 ^{ac}	11,8 ± 4,4 ^{bc}	17,2 ± 6,1 ^{bc}	0,000

FTI = frutanos do tipo inulina;¹ Resultados expressos como média ± DP ($n = 6$). Todos os testes foram realizados assumindo-se hipóteses bilaterais e nível de significância de 5%. As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey, ^{a,b,c,d,e} Valores com sobrescritos diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Figura 1.1.

Cortes histológicos da região distal do fêmur mostrando o osso trabecular (A: grupo CON; B: grupo Ca[-]; C: grupo Fe[-]FTI; aumento de 40x). D: Volume trabecular ósseo (BV/TV) no fêmur distal de ratos deficientes em Ca e Fe alimentados com rações controle e suplementadas com 10% de FTI por 33 d. Resultados expressos como média $\pm$ DP ($n = 6$). As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey; ^{a,b,c} Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Figura 1.2.

Parâmetros histomorfométricos de formação óssea trabecular (superfície osteóide [OS/BS], **A**; e número de osteoblastos [N.OB/T.Ar], **B**) no fêmur distal de ratos deficientes em Ca e Fe alimentados com rações controle e suplementadas com 10% de FTI por 33 d. Resultados expressos como média $\pm$ DP ($n = 6$). As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey, ^{a,b,c} Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Figura 1.3.

Parâmetros histomorfométricos de reabsorção óssea trabecular (superfície erodida [ES/BS], **A**; e número de osteoclastos [N.Oc/T.Ar], **B**) no fêmur distal de ratos deficientes em Ca e Fe alimentados com rações controle e suplementadas com 10% de FOS por 33 d. Resultados expressos como média $\pm$ DP ($n = 6$). As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey; ^{a,b} Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Discussão

No presente trabalho verificou-se a influência dos FTI na composição mineral e na qualidade do osso, avaliada por análises biomecânicas e histomorfométricas, em ratos saudáveis e deficientes em Ca e Fe em crescimento. Após 33 d, não foram observados efeitos na retenção de minerais no fêmur. Por outro lado, o consumo dos FTI afetou a concentração de Mg e a capacidade em absorver energia na região de comportamento elástico (resiliência) na tíbia dos animais saudáveis, confirmando nossos resultados anteriores (LOBO *et al.*, 2006; LOBO *et al.*, 2007; LOBO *et al.*, 2008). Além disso, ocorreu aumento significativo no volume ósseo e em parâmetros de formação óssea nos animais deficientes em Fe alimentados por esses carboidratos. Esses resultados reforçam a influência da relação entre a quantidade de FTI e a de minerais nas rações e/ou o tempo do consumo desses carboidratos como fatores preponderantes para a efetividade do efeito dos FTI na biodisponibilidade de Ca. Sugerem também que as alterações no metabolismo ósseo que ocorrem em condições de deficiência de minerais podem ser afetadas pela influência desses carboidratos na absorção de outros minerais importantes para a fisiologia do osso.

Os animais alimentados com os FTI apresentaram menor ganho de peso corporal em relação ao grupo controle, embora esse efeito tenha sido significativo somente nos animais deficientes (Tabela 1.3). Além disso, esses animais consumiram menos ração do que os animais do grupo controle; essa condição foi observada em estudos anteriores com animais saudáveis consumindo diferentes teores de FTI nas rações (LEVRAT *et al.*, 1991; KRUGER *et al.*, 2003; LOBO *et al.*, 2008) e foi inicialmente atribuída ao acúmulo de fluidos no intestino. O consumo de FTI provoca aumento no peso do conteúdo intestinal, mas especificamente do teor de umidade (Tabela 1.3), uma vez que esses carboidratos permanecem em

solução no quimo e contribuem para o aumento da pressão osmótica, resultando em aumento do fluxo de água para o lúmen intestinal (CHERBUT, 2002). Mais recentemente, um possível efeito dos FTI na saciedade tem sido atribuído à maior produção do hormônio anorexígeno GLP-1 no cólon (CANI *et al.*, 2004, 2005a). Esse efeito foi confirmado pelo aumento na expressão do seu precursor (proglucagon) no cólon em nível de mRNA (CANI *et al.*, 2005b).

Embora o intestino delgado seja o principal local para absorção de minerais, o intestino grosso contribui com o *pool* de minerais absorvidos a partir do momento em que algumas FA (incluindo os FTI) são metabolizadas por determinadas bactérias no cólon. Da fermentação dessas fibras são produzidos AGCC e ácido láctico que afetam o pH do conteúdo intestinal (RÉMÉSY *et al.*, 1993; LIN *et al.*, 2002; LE BLAY *et al.*, 1999; RASCHKA & DANIEL, 2005). No presente estudo, observou-se redução no pH luminal na região do ceco pelo consumo dos FTI em relação ao grupo controle, sugerindo aumento na atividade metabólica bacteriana. Além disso, esse efeito foi mais acentuado nos grupos deficientes em Ca (grupos Ca[-] e Ca[-]Fe[-]; Tabela 1.3). O teor de Ca na dieta tem forte influência no pH luminal, uma vez que o Ca atua como tampão para a acidez provocada pela fermentação bacteriana no intestino grosso. Recentes estudos demonstraram alteração na barreira da mucosa intestinal e aumento na permeabilidade intestinal após a suplementação com FTI em rações restritas em Ca (TEN BRUGGENCATE *et al.*, 2004; TEN BRUGGENCATE *et al.*, 2005). Além disso, tem sido observado aumento no número relativo de células caliciformes e na secreção de mucinas como resultado destas alterações, provavelmente refletindo irritação na barreira da mucosa intestinal (LOBO, 2004; TEN BRUGGENCATE *et al.*, 2004). Estudo recente (RODENBURG *et al.*, 2008) sugere que a influência dos FTI na integridade da barreira da mucosa pode estar relacionada com alterações na expressão de genes envolvidos com o metabolismo energético mitocondrial nos colonócitos. Os

autores propõem que a acidificação intracelular resultante da fermentação bacteriana desses carboidratos induz à depleção de ATP, que provoca desacoplamento mitocondrial e que, por sua vez, induz ao aumento da permeabilidade celular (RODENBURG *et al.*, 2008). Além disso, como resultado da fermentação, ocorre considerável aumento no peso do tecido cecal e na extensão das criptas intestinais, provavelmente como resposta ao aumento da proliferação celular (RÉMÉSY *et al.*, 1993, KLEESSEN *et al.*, 2003, LOBO *et al.*, 2007). Em estudo anterior, observou-se aumento no número de criptas em bifurcação após o consumo de 7,5% de FTI provenientes de uma farinha de yacón (LOBO *et al.*, 2007). A fissão das criptas intestinais, isto é, a síntese de novas criptas, é resultado do aumento na proliferação de células-tronco na base das criptas intestinais (BJERKNES & CHENG, 2005; DEKANEY *et al.*, 2007), sendo aumentada após o nascimento e durante a recuperação de injúrias intestinais, da mesma forma que ocorre em situações de inflamação intestinal (MASKENS, 1978; CHENG *et al.*, 2000).

Como esperado, os animais desenvolveram anemia por deficiência de Fe, após 33 d de consumo de rações deficientes neste mineral (12-15 mg/kg), como demonstrado pelas alterações dos parâmetros bioquímicos de Fe (Tabela 1.4). Por outro lado, a suplementação com FTI não afetou nenhum desses parâmetros nos animais não-deficientes; no entanto, quando suplementados na ração deficiente em Ca (grupo Ca[-]FTI), o consumo dos FTI levou a aumento nas concentrações hepáticas de Fe e Zn. É bem conhecido o efeito inibidor do Ca da dieta na absorção intestinal de Fe (HALLBERG *et al.*, 1991; WIENK *et al.*, 1996). Esta interação negativa é dependente da dose e estaria relacionada com uma possível interferência do Ca com ligantes do Fe no lúmen intestinal, com alterações no tempo de trânsito intestinal ou com interações no local de absorção durante a entrada ou transferência do Fe pelo enterócito (HALLBERG *et al.*, 1991). Assim,

numa situação de restrição de Ca nas rações, a presença dos FTI pode ter potencializado a retenção do Fe no fígado (Tabela 1.4).

A deficiência de Ca afetou negativamente sua concentração no osso (Tabela 1.6), o que levou à diminuição no volume ósseo (BV/TV; Fig. 1.1-A) e na resistência óssea à fratura (Tabela 1.5). Estes efeitos ocorreram devido à intensa reabsorção óssea (Fig. 1.1-B e C), demonstrada pelo maior número de osteoclastos (Fig. 1.3). A homeostase de Ca é fortemente controlada pela sua disponibilidade da dieta: em situações de reduzida ingestão, o mineral é mobilizado do osso via ação de hormônios calcitropicos (paratormônio, 1,25-diidroxicolecalciferol) para manutenção dos níveis séricos de Ca. Esses hormônios se ligam a receptores presentes em células precursoras de osteoblastos, ativando a osteoclastogênese (PURROY & SPURR, 2002).

No presente estudo foi observada redução de 37% e 36% na ES/BS e no N.Oc/T.Ar nos animais sadios alimentados com FTI, sugerindo um papel protetor desses carboidratos no osso (Fig. 1.3). Esses resultados estão de acordo com aqueles observados por Kruger *et al.* (2003) e Nzeusseu *et al.* (2006), que demonstraram (em ratos) diminuição na excreção de fragmentos do colágeno tipo I, sugerindo reduzida reabsorção óssea após o consumo de FTI. No presente estudo avaliou-se também a concentração óssea de outros minerais, importantes para o processo de remodelamento ósseo. Não foi observada qualquer influência dos FTI na retenção de P, Mg e Zn no fêmur dos animais sadios (grupo FTI). No entanto, verificou-se maior concentração de Mg na tíbia desses animais em relação ao grupo controle. Embora o osso seja o maior reservatório de Mg, grande parte encontra-se dentro da cápsula de hidratação ou na superfície dos cristais de hidroxiapatita (SCHWARTZ, 1990; SOJKA, 1995). Como o Mg neste compartimento encontra-se prontamente intercambiável e como as suas concentrações no osso encontram-se reduzidas em situações de deficiência

(RUDE, 1998; CREEDON *et al.*, 1999), sugere-se que o osso sirva como reservatório para a manutenção do Mg extracelular. Considerando que o osso trabecular apresenta maior remodelamento ósseo do que o osso cortical, diferenças na distribuição do osso trabecular e cortical no fêmur e na tíbia podem ter contribuído para o diferente padrão de deposição de Mg em resposta ao consumo dos FTI nesses ossos.

O consumo de FTI, quando associado com a deficiência de Fe (grupo Fe[-]FTI) ou de Ca (grupo Ca[-]FTI), influenciou de maneira positiva a concentração de Zn no fêmur e na tíbia (Tabela 1.6). Cerca de 30% do Zn no organismo está presente nos ossos. O Zn possui importante papel nos processos de formação e mineralização ósseas, uma vez que participa da ativação da fosfatase alcalina e estimulação da síntese do colágeno, processos envolvidos na calcificação do osso (YAMAGUSHI, 1998; PERETZ *et al.*, 2001). Assim, uma vez que o remodelamento ósseo, que é caracterizado pelo balanço entre formação e reabsorção ósseas, encontra-se aumentado em situações de deficiência de Ca, pode-se inferir que a demanda de Zn poderia estar aumentada e que os FTI poderiam ter auxiliado no processo de deposição de Zn nos ossos.

Por outro lado, neste estudo foi observado aumento no BV/TV e no número de osteoblastos por área trabecular (N.Ob/T.Ar; +27%) no grupo Fe[-]FIT em comparação ao grupo Fe[-] (Fig. 1.2-D). Estudos em ratos têm demonstrado uma diminuição na densidade e resistência ósseas em situações de deficiência de Fe (MEDEIROS *et al.*, 2002, 2004). Além disso, Katsumata *et al.* (2006) observaram redução na concentração de osteocalcina, um marcador bioquímico de formação óssea, em ratos deficientes em Fe. No presente estudo, embora os animais do grupo Fe[-] não tenham apresentado diferenças no BV/TV em relação ao controle (Fig. 1.2) e a concentração de Fe nos ossos não tenha sido avaliada, a suplementação com FTI nas rações deficientes em Fe (grupo Fe[-]FTI) resultou em

aumento do BV/TV (~57%) e do número de osteoblastos (~27%) em relação ao grupo Fe[-] (Fig. 1.3).

Como conclusão, o presente estudo mostrou que o consumo de FTI não afetou a retenção de Ca no fêmur, porém aumentou a retenção de Mg e a resiliência na região média da diáfise da tíbia dos animais sadios. Além disso, nos animais deficientes em Fe, os FTI proporcionaram maior BV/TV e número de osteoblastos. Os resultados observados nos parâmetros de reabsorção óssea nos animais sadios apontam para o possível efeito inibidor da reabsorção óssea pelos FTI que merece ser investigado, utilizando maior quantidade de unidades amostrais ou maior tempo de experimento.

CAPÍTULO 2

Biodisponibilidade de ferro do pirofosfato férrico em ratos alimentados com frutanos da farinha de yacón (*Smallanthus sonchifolius*)

Título em inglês: “Iron bioavailability from ferric pyrophosphate in rats fed fructan-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius*) flour”

Título abreviado: Biodisponibilidade de Fe e frutanos da farinha de yacón

Número de figuras: 5

Número de tabelas: 6

Introdução

A anemia por deficiência de Fe é ainda hoje o problema nutricional mais comum e difundido no mundo inteiro (WHO, 2006). Essa condição acarreta o custo anual de 605 milhões de dólares em tratamentos, com perdas de produtividade e de dias de trabalho. Sua prevalência é de cerca de 20% em adolescentes, de 40% em gestantes e até 50% em crianças de 6 a 60 meses. No Brasil, a anemia representa, em termos de magnitude, o principal problema de carência nutricional, aparentemente sem grandes diferenciações geográficas, afetando em proporções semelhantes todas as regiões (SANTOS, 2002).

Embora a eficiência da absorção de Fe aumente à medida que os estoques se tornam depletados, a quantidade absorvida dos alimentos, especialmente onde dietas são deficientes em carnes, peixes, frutas e hortaliças, não é suficiente para prevenir a deficiência de Fe em muitas mulheres e crianças, especialmente em países em desenvolvimento (ZIMMERMANN & HURRELL, 2007). No Brasil, o padrão de consumo de alimentos-fonte de Fe vem diminuindo ao longo dos anos (SZARFARC, 2006), desta forma a caracterização das matrizes alimentares e a avaliação de sua influência na biodisponibilidade de Fe passa a ser uma importante abordagem em situações de deficiência do mineral.

Vários fatores da dieta podem influenciar a biodisponibilidade de Fe. A magnitude desta influência depende da constituição da matriz alimentar, ou seja, da presença de inibidores e promotores em uma refeição (GIBSON, 2007; ZIMMERMANN & HURRELL, 2007). Recentemente, frutanos do tipo inulina (FTI; inulina e frutooligossacarídeos [FOS]) têm sido estudados como carboidratos prebióticos da dieta, uma vez que estimulam a composição e a atividade metabólica da microbiota intestinal, favorecendo o crescimento de bactérias bifidogênicas em detrimento de outras espécies consideradas patogênicas para o hospedeiro (ROBERFROID, 2007). O processo

fermentativo favorece a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) para a manutenção da integridade da mucosa intestinal e do funcionamento do sistema imunológico, bem como do metabolismo de lipídeos e carboidratos e a biodisponibilidade de minerais (SEIFERT & WATZL, 2007; DELZENNE *et al.*, 2007; SCHOLZ-AHRENS & SCHREZENMEIR, 2007). Como consequência da fermentação bacteriana, ocorre diminuição do pH e aumento na solubilidade de minerais (LOBO *et al.*, 2006; SCHOLZ-AHRENS *et al.*, 2007). Este efeito é acompanhado por modificações na arquitetura da mucosa intestinal, resultante do aumento na celularidade e no número de criptas, mecanismos que podem contribuir para um aumento na superfície absorptiva para os minerais (RÉMÉSY *et al.*, 1993; KLEESSEN *et al.*, 2003; LOBO *et al.*, 2007).

Os FTI são comumente encontrados em quase todas as espécies da família *Asteraceae*, muitas das quais de importância econômica, como *Chicorium intybus* e *Helianthus tuberosus* (CARVALHO & FIGUEIREDO-RIBEIRO, 2001). O yacón (*Smallanthus sonchifolius* [Poepp & Endl.] H. Robinson, *Asteraceae*) é uma raiz tuberosa andina que acumula altas quantidades de FTI com baixo grau de polimerização (GP < 10, FOS) (ITAYA *et al.*, 2002). Tem sido cultivada no sudoeste do Brasil desde 1991, de agosto a setembro, rendendo cerca de 100 t/ha (VILHENA *et al.*, 2000).

Estudo prévio demonstrou que o consumo de farinha de yacón (FY) contendo FTI aumentou o balanço de Ca e de Mg, levando à maior retenção mineral e resistência óssea (LOBO *et al.*, 2007). Além disso, foi observado maior peso do tecido do ceco, demonstrado por aumento no número e na profundidade de criptas no ceco, bem como no número de criptas bifurcadas, sugerindo um aumento na superfície absorptiva e, provavelmente, podendo contribuir para a absorção e biodisponibilidade de minerais. No presente estudo, foi avaliado os efeitos do consumo de FY contendo FTI na biodisponibilidade de Fe proveniente do pirofosfato férrico (PF; $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$; um sal de Fe

de baixa biodisponibilidade) em um modelo experimental de anemia por deficiência de Fe. Além disso, as alterações no estado nutricional relativo ao Fe induzidas pelo consumo da FY foram comparadas com aquelas obtidas pelo consumo de uma fonte purificada de FTI (Raftilose P95®; RAF; *Orafti-Active Food International*, Tienen, Bélgica). Considerando a potencial interação entre o Fe e os outros microminerais (principalmente Cu e Zn) em níveis intestinal e sistêmico, a absorção intestinal e as concentrações hepáticas desses minerais também foram avaliadas na presença de frutanos nas rações.

Material e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEEAA 88/2005 FCF/USP), de acordo com recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Delineamento experimental

O experimento teve início logo após o nascimento dos animais, quando 12 ratos do sexo feminino, da linhagem Wistar, obtidos a partir de colônias do Biotério de Criação e Experimentação Animal da FCF/USP, foram ajustados para conter 6-8 filhotes machos por matriz, em gaiolas plásticas forradas com maravalha, e alimentados com ração em pó deficiente em Fe (12 mg Fe/kg; $n = 10$ matrizes; AOAC, 2000) ou com ração AIN-93M (REEVES *et al.*, 1993; $n = 2$ matrizes) por 21 d.

Como ilustrado no delineamento experimental (Fig. 2.1), no dia do desmame, o total de 92 ratos machos, inicialmente pesando 54-58 g foi transferido para gaiolas metabólicas individuais sob condições de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa (55

$\pm 10 \%$) controladas com um ciclo claro-escuro de 12 h (claro entre 08.00 h - 20.00 h). Eles receberam água desmineralizada *ad libitum* e foram alimentados com a ração em pó deficiente em Fe (grupo FeD; $n = 80$) ou com uma ração AIN-93G (grupo CON; REEVES *et al.*, 1993; $n = 12$) por 15 d (período de depleção). Um grupo de 10 ratos FeD foi selecionado e monitorado ao longo do período de depleção para determinação do peso corporal e da concentração de Hb. Quando a concentração de Hb deste grupo alcançou aproximadamente 60 g/L (14º dia), ela foi determinada em todos os animais. Neste momento, 6 ratos do grupo FeD e 6 do grupo CON foram sacrificados, para determinação dos índices do estado nutricional e da concentração hepática de Fe – para se verificar a efetividade do protocolo de depleção de Fe. Dos animais deficientes remanescentes ($n = 74$), 44 foram selecionados para o período de repleção. Estes animais foram então distribuídos em 4 grupos, considerando-se o produto entre o peso corporal (g) e a concentração de Hb (g/L), e alimentados com rações AIN-93G contendo 35 mg Fe/kg na forma de FeSO_4 microencapsulado (SF; $n = 8$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Fermavi Eletroquímica Ltda, São Paulo, Brasil; COCATO *et al.*, 2007) ou de PF na mistura salina (PF; Fermavi Eletroquímica Ltda, São Paulo, Brasil), suplementadas com a FY ou com a RAF, na concentração final de 7,5% de FOS (75 g/kg ração) (período de repleção, Tabela 2.1). Os animais consumiram essas rações por 14 d até o fim do experimento. Os 6 animais sadios remanescentes permaneceram com a ração AIN-93G ao longo do período de repleção e, ao final desse período, a concentração média de Hb neste grupo foi de 132 ± 17 g/L.

Figura 2.1.
Delineamento experimental.

SF = Sulfato ferroso; PF = Pirofosfato férrico; FY + PF = Farinha de yacón + PF;
RAF = Raftilose + PF

Tabela 2.1 - Formulação das rações experimentais

Ingrediente (%)	SF	PF	FY	RAF
Caseína ¹	20,00	20,00	20,00	20,00
Fibras	5,00	5,00	0,80	5,00
Óleo de soja ²	7,00	7,00	7,00	7,00
L-cistina	0,30	0,30	0,30	0,30
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Mistura vitamínica ³	1,00	1,00	1,00	1,00
Mistura mineral ⁴	3,50	3,50	3,50	3,50
Sacarose	10,00	10,00	-	2,50
Amido de milho	52,95	52,95	25,45	52,39
Farinha de yacón ⁵	-	-	41,70	-
Raftilose P95 ⁶	-	-	-	8,06

SF = Sulfato ferroso; PF = Pirofosfato férrico; FY = Farinha de yacón; RAF = Raftilose.

¹ 92,9% proteína.

² Cargill Agrícola S/A.

³ Mistura vitamínica AIN-93-VX (REEVES *et al.*, 1993).

⁴ Modificada da mistura mineral (AIN-93G-MX, REEVES *et al.*, 1993) contendo (g/kg mistura): CaCO₃, 538,18; KH₂PO₄, 196; NaCl, 74; K₂SO₄, 46,6; K₃C₆H₅O₇.H₂O, 70,78; MgO, 24; Fe₄(P₂O₇)₃, 4,12 (ou FeSO₄.H₂O, 2,71); ZnCO₃, 1,65; MnCO₃, 0,63; CuCO₃, 0,3; KIO₃, 0,01; Na₂SeO₄, 0,01025; paramolibdato de amônio, tetraidratado, 0,00795; Na₂SiO₃, 1,45; KCr(SO₄)₂.12H₂O, 0,275; H₃BO₃, 0,0815; NaF, 0,0635; NiCO₃, 0,0318; LiCl, 0,0174; NH₄VO₃, 0,0066; sacarose, 39,846.

⁵ Sítio São Sebastião (Ibiúna, São Paulo, Brasil); 18% frutanos totais, 28,3% sacarose, 15,7% frutose, 6% FAI, 4% FAS, 4 µg Fe/g, 19 µg Cu/g and 16 µg Zn/g.

⁶ Orafiti Active Food International (Clariant, São Paulo, Brasil), 93% de ITF.

Ao final do período de repleção, os ratos foram anestesiados com uma mistura (1:1:0,4:1,6; v/v/v/v) de quetamina (10 mg/kg de peso corporal; Vetaset, Fort Dodge, Iowa, EUA), xilazina (25 mg/kg de peso corporal; Virbaxil 2%, Virbac, São Paulo, Brasil), acepromazina (2 mg/mL; Acepran 0,2%, Univet S/A Indústria Veterinária, São Paulo, Brasil) e H₂O desmineralizada. Após a anestesia ter causado inconsciência, o sangue foi coletado pela aorta abdominal para análise dos parâmetros bioquímicos de Fe. Uma injeção intraperitoneal de 1 mg/kg de sulfato de vincristina (Tecnocris®, Zodiac Produtos Farmacêuticos S/A, São Paulo, Brasil) foi administrada a cada 30 min ao longo de 2 h antes do sacrifício para bloquear células epiteliais do ceco em divisão celular. O fígado foi perfundido pela veia subhepática com uma solução de NaCl (9 g/L) para retirada do sangue do órgão. O fígado foi então removido, lavado com solução salina, pesado e armazenado a -20° C até o momento das análises. O ceco (com o seu conteúdo) foi removido, pesado, colocado em uma placa de *petri* com gelo (LU *et al.*, 2000) e seccionado ao longo da curvatura menor. O pH do conteúdo do ceco foi determinado *in situ* inserindo-se um eletrodo (UP-25; Denver Instrument, Denver, Colorado, EUA) pela junção ileocecal. Alíquotas do conteúdo do ceco foram congeladas ou a -20° C, para análises de umidade e das espécies de Fe, ou a -80° C, para determinação dos AGCC. O tecido foi fixado em solução de formaldeído e armazenado em 70% de etanol. O intestino delgado foi seccionado no piloro e na junção ileocecal e liberado do mesentério; seu comprimento foi medido, suspendendo-se o intestino por 1 min com uma carga constante e aferindo-se o comprimento. Fezes foram coletadas durante os últimos 5 d do período de repleção, agrupadas e armazenadas a -20° C até o momento das análises.

Formulação e análise da composição química das rações experimentais

A ração oferecida para o grupo CON seguiu a formulação das rações da AIN (AIN-93G; REEVES *et al.*, 1993). Quando a ração AIN-93G foi suplementada com a FY e a RAF (Tabela 2.1), amido de milho, sacarose e fibras foram quantitativamente substituídos, considerando-se o teor de carboidratos nas fontes de frutanos.

As raízes tuberosas de yacón, provenientes do Sítio São Sebastião (Ibiúna, São Paulo, Brasil) e obtidas por doação, foram apropriadamente processadas, conforme descrito em estudo anterior (LOBO *et al.*, 2007). Elas foram autoclavadas (121°C, 20 min), liofilizadas (Liotécnica Ind. Com. Ltda, Embu, São Paulo, Brasil) e moídas para a obtenção da farinha. A RAF usada neste estudo foi doada pela Clariant S/A (São Paulo, Brasil). De acordo com o certificado de análise, este produto contém aproximadamente 93% de FTI, consistindo de moléculas (GF_n) com GP médio de 4. O FTI na RAF foi obtido pela hidrólise parcial da inulina, que foi extraída de raízes de almeirão (*Chicorium intybus*).

Frutanos totais, glicose, frutose e sacarose na FY foram analisados pelo método espectrofotométrico (STEEGMANS *et al.*, 2004). Fibras solúveis (FAS) e insolúveis (FAI) foram determinadas pelo método enzimático-gravimétrico (PROSKY *et al.*, 1988). Minerais nas rações e na FY (Fe, Cu e Zn) foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica (EAA; AAnalyst 100, Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA), empregando-se lâmpadas de catodo oco a 283,4, 324,8 e 213,9 nm, respectivamente, e fendas de 0,2, 1,3 e 1,3 nm, respectivamente, após digestão por via úmida (HNO₃:H₂O₂, 5:1; v/v). As soluções padrão foram preparadas pela diluição dos padrões FeCl₃, CuCl₂ e ZnCl₂ (Tritisol, Merck, Darmstadt, Alemanha). As análises da FY demonstraram 18% de frutanos totais, 28,3% de sacarose, 15,7% de frutose, 6% de FAI, 4% de FAS, 4 µg de

Fe/g, 19 µg de Cu/g e 16 µg de Zn/g. Os resultados da composição das rações experimentais encontram-se na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Composição química das rações experimentais

Composição (%)	SF	PF	FY + PF	RAF + PF	P
Umidade	8,36 ± 0,29 ^a	9,58 ± 0,04 ^b	10,35 ± 0,17 ^c	9,93 ± 0,19 ^{bc}	0,000
Proteína (N × 6,25)	22,66 ± 0,11 ^a	21,74 ± 0,78 ^a	25,70 ± 0,46 ^b	22,64 ± 0,37 ^a	0,000
Extrato etéreo	7,04 ± 0,29 ^a	7,33 ± 0,16 ^a	9,00 ± 0,46 ^b	7,53 ± 0,25 ^a	0,001
Cinzas	3,14 ± 0,25 ^a	3,00 ± 0,23 ^a	4,69 ± 0,12 ^b	3,22 ± 0,12 ^a	0,000
Minerais (mg/kg)					
Ferro	47,14 ± 2,58 ^a	49,40 ± 0,89 ^{ab}	60,52 ± 1,24 ^b	55,26 ± 2,98 ^b	0,000
Cobre	8,65 ± 0,08 ^a	7,27 ± 0,11 ^b	9,46 ± 0,25 ^c	7,26 ± 0,14 ^{bd}	0,000
Zinco	47,83 ± 3,94 ^a	46,56 ± 2,94 ^a	50,79 ± 0,66 ^a	42,67 ± 0,45 ^b	0,017

SF = Sulfato ferroso; PF = Pirofosfato férrico; FY + PF = Farinha de yacón + PF; RAF = Raftilose + PF.

¹ Resultados expressos como média ± DP (n = 3).

As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey.

^{a,b,c,d} Valores seguidos da mesma letra sobrescrita não são significativamente diferentes (P < 0,05).

Biodisponibilidade de Fe, parâmetros hematológicos e conteúdo mineral dos órgãos

O consumo de ração foi determinado a cada 2 d, e a concentração de Hb a cada 7 d (dias 0, 7 e 14; período de repleção), pelo método da cianometa-Hb (DRABKIN & AUSTIN, 1935) no sangue obtido por punção da cauda dos animais. Os resultados da concentração de Hb e do consumo de Fe foram utilizados para estimar os seguintes parâmetros (MAHONEY *et al.*, 1974; DUTRA-de-OLIVEIRA *et al.*, 1995; POLTRONIERI *et al.*, 2000; HERNÁNDEZ *et al.*, 2003):

1) *Pool* de Fe Hb (mg), assumindo o volume total de sangue de 6,7% do peso corporal do rato e o conteúdo de Fe na Hb de 0,335%:

$$\text{Pool Fe Hb} = [\text{peso corporal (g)} \times \text{Hb (g/L)} \times 6,7 \times 0,335]/10.000$$

2) Eficiência da regeneração da Hb (HRE):

$$\% \text{HRE} = [\text{mg Fe Hb (final)} - \text{mg Fe Hb (initial)} \times 100]/\text{mg Fe ingerido}$$

3) Valor biológico relativo (RBV):

$$\text{RBV} = 100 \times (\% \text{HRE do grupo teste} / \% \text{HRE do grupo SF})$$

No momento do sacrifício dos animais, o sangue foi obtido da artéria aorta abdominal. Amostras de sangue com anticoagulante (EDTA; 1 mg/mL) foram obtidas para a contagem total e diferencial de células (DACIE & LEWIS, 1995). O baço foi assepticamente removido, pesado e colocado em uma placa de *petri* de 60 mm (Corning Acton, MA, EUA), contendo solução tampão livre de Ca e de Mg com EDTA (1 mg/mL; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), e cuidadosamente dissociado. O número total de células foi quantificado em um hemocitômetro (câmara de Neubauer; Herka, Berlin, Alemanha). Células da medula óssea foram obtidas por lavagem da cavidade medular com meio McCoy's 5A (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e quantificadas em um hemocitômetro.

Amostras de sangue sem anticoagulante foram coletadas para análises da concentração de Fe sérico e da capacidade latente de ligação de Fe (UIBC) (Labtest Diagnóstica S/A, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). A capacidade total de ligação de Fe (TIBC) e a saturação da transferrina foram calculadas a partir dos resultados do Fe sérico e da UIBC. A concentração de minerais (Fe, Cu e Zn) no fígado e baço foi determinada por EAA, conforme descrito para as análises de minerais nas rações.

Absorção aparente de minerais

O teor de umidade nas fezes foi determinado pela perda de peso das amostras em estufa aquecida a 105°C. As fezes dessecadas foram moídas e as amostras foram utilizadas para análise de minerais. A absorção intestinal aparente (Fe, Cu e Zn) foi calculada pelas seguintes equações:

1) Absorção aparente ($\mu\text{g/d}$) = ingestão – excreção fecal;

2) Absorção aparente (%) = (ingestão – excreção fecal) $\times$ ingestão⁻¹ $\times$ 100

Determinação das espécies de Fe no conteúdo intestinal

No momento do sacrifício dos animais, o ceco foi removido e pesado e seu conteúdo foi retirado para a determinação das espécies de Fe pela técnica de extração seqüencial (SIMPSON *et al.*, 1992). Cada fração obtida foi analisada por EAA, sendo elas: fração intercambiável (FI), na qual se encontram complexos solúveis de Fe não-heme; fração carbonato (FC), na qual se encontram complexos de Fe não-heme insolúveis com pK de 5 ou mais; fração óxido (FOx), na qual se encontram complexos de Fe não-heme susceptíveis à redução ou ligados a compostos com pK de 2 ou mais, ou ambos; fração orgânica (FOr), na qual se encontra o Fe heme como também outros ligantes não degradados pela oxidação, e fração residual (FR), na qual se encontra o Fe com ligantes não degradados nas etapas anteriores.

Determinação dos ácidos graxos de cadeia curta

A extração dos AGCC foi realizada seguindo-se a metodologia proposta por Zhao *et al.* (2006), utilizando-se cromatógrafo a gás (Shimadzu Scientific Instruments Inc., Japão; modelo GC-2010) equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar de sílica Nukol (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). A identificação dos ácidos graxos

nas amostras foi realizada pela comparação com os tempos dos picos de retenção dos padrões de AGCC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

Análises estatísticas

A análise dos dados foi realizada com o pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*, Chicago, Illinois, EUA) para o *Windows*, versão 11.5 (2002). Todos os testes foram realizados assumindo-se hipóteses bilaterais e nível de significância de 5%. Inicialmente foi utilizada a estatística descritiva para avaliar a média e o desvio padrão (DP) das variáveis de interesse. Os dados são apresentados na forma de média $\pm$ DP. No período de depleção, as comparações das médias entre os grupos sadio e deficiente em Fe foram realizadas pelo teste *t* não-pareado (BUSSAB & MORETIN, 2003). No período de repleção, as comparações das médias das variáveis entre os quatro grupos (SF, PF, FY + PF e RAF + PF) foram realizadas pela ANOVA (MONTGOMERY, 2001). Para as diferenças significativas, o *post-hoc* de *Tukey* foi aplicado para identificar onde ocorreram essas diferenças. A normalidade das observações foi verificada pelo teste não-paramétrico de *Komogorov-Smirnov* (CONOVER, 1999) e, em caso de rejeição da suposição de normalidade, os testes *t* não-pareado e ANOVA foram substituídos, respectivamente, pelos testes não-paramétricos de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* (CONOVER, 1999).

Resultados

Protocolo de deficiência de Fe

Os animais foram alimentados com as rações deficientes em Fe (FeD) e rações AIN-93G (CON). Dez ratos, representando cada grupo, foram monitorados pela

avaliação do peso corporal e concentração de Hb. Quando a concentração de Hb dos animais deficientes em Fe alcançou o valor médio de $68 \pm 0,7$ g/L (Dia 14; média de 63 a 79 g/L), 6 ratos, representando cada grupo, foram sacrificados, sendo analisados os parâmetros bioquímicos de Fe e os parâmetros hematológicos. Observaram-se de discreta a moderada microcitose e acentuada hipocromia nos animais do grupo FeD (VCM de $64 \pm 9,7$ e $40,3 \pm 6,3$ fL; HCM de $19,2 \pm 3,2$ e $11,8 \pm 0,7$ pg para os grupos CON e FeD, respectivamente; $P = 0,001$). Essas alterações foram reflexo de acentuada redução nos níveis de Fe sérico e na saturação da transferrina ($P < 0,001$), bem como nos estoques de Fe no fígado ($P < 0,001$). Além disso, o consumo das rações deficientes em Fe resultou em significativo aumento da contagem de reticulócitos ($P < 0,001$), porém associado com discreta diminuição no número de células da medula óssea ($P = 0,076$) em relação ao grupo CON (Tabela 2.3).

Ganho de peso corporal, consumo de ração e parâmetros intestinais

Após 14 d de consumo dos FTI (período de repleção), apenas o grupo RAF apresentou menor ganho de peso ($P = 0,003$) em relação ao grupo SF (Tabela 2.4). No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P = 0,624$) no consumo de ração entre os grupos experimentais nesse período. Na Tabela 2.4 são encontrados os resultados de excreção e umidade de fezes coletadas nos últimos 5 d do período de repleção. Também não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P = 0,135$) no peso das fezes entre os grupos experimentais. Por outro lado, o teor de umidade das fezes foi maior nos animais alimentados com os FTI, considerando que esse resultado foi mais expressivo naqueles que consumiram a FY (+108% em relação ao grupo PF; $P < 0,001$). A suplementação com FTI aumentou o peso relativo do ceco (tecido e conteúdo) em relação aos grupos SF e PF ($P < 0,001$). Os animais alimentados

com a FY apresentaram maior comprimento do intestino delgado em relação aos outros grupos experimentais. Além disso, verificou-se redução significativa no pH do conteúdo do ceco ($P < 0,001$) nos animais alimentados com os FTI em comparação aos grupos SF e PF (Tabela 2.4).

Parâmetros hematológicos e biodisponibilidade de Fe

Em geral, não foi observada diferença estatisticamente significativa nos parâmetros hematológicos entre os grupos experimentais ao fim do período de repleção. No entanto, os animais do grupo PF apresentaram maior contagem de reticulócitos do que os demais grupos ($P = 0,010$). Além disso, considerando que os grupos tiveram concentrações de Hb similares no dia 0 do período de repleção ($P = 0,347$), nos dias 7 e 14 a concentração média de Hb no grupo FY foi, respectivamente, 18% ($P < 0,001$) e 7% maior do que a do grupo RAF, e 40% e 24% maior do que a grupo PF ($P < 0,001$; Tabela 2.5). Os resultados de HRE refletem a eficiência da conversão do Fe da dieta em Hb em relação à quantidade do Fe consumido durante o período de repleção. No presente estudo, o aumento na absorção de Fe nos animais alimentados com os FTI refletiu-se em maior HRE do que os do grupo PF. Além disso, o consumo da FY resultou em mais rápida HRE em comparação à RAF (Tabela 2.5). A concentração de Hb obtida no fim do período de repleção nos animais do grupo SF é considerada a referência. Assim, a biodisponibilidade de Fe proveniente do PF nos grupos suplementados com os FTI foi comparada com a do grupo SF (RBV). Neste estudo, o RBV dos grupos FY e RAF foi 46% e 33% maior do que o RBV do grupo PF (Fig. 2.2; $P < 0,001$).

Parâmetros intestinais

Como esperado, o grupo PF apresentou menor absorção aparente de Fe em relação do grupo SF ($P < 0,001$). Além disso, embora não se tenha atingido valores estatisticamente significativos, a absorção aparente de Fe foi positivamente afetada pelo consumo dos FTI (Fig. 2.3-A). Por outro lado, não foi observado efeito do consumo dos FTI na absorção de Cu, nem tampouco do tipo de sal de Fe utilizado nas rações (Fig. 2.3-B). A absorção de Zn foi reduzida no grupo PF em relação ao SF; o consumo de FTI, por sua vez, estimulou a absorção de Zn na presença de uma fonte de baixa biodisponibilidade de Fe (Fig. 2.3-C).

A Fig. 2.4 apresenta os resultados da extração seqüencial das espécies de Fe presentes no intestino grosso proximal (ceco) do rato. Houve aumento significativo ($P < 0,001$) do Fe na FI, representando a fração que contém espécies de Fe biodisponíveis (solúveis), no grupo suplementado com a FY em relação aos demais grupos. Essa porção do Fe na FI pode ter sido mobilizada da FOx, uma vez que foi observada diminuição significativa ($P < 0,001$) dessa fração nos animais do grupo FY em relação aos demais grupos que receberam o PF como sal de Fe.

Como esperado, o consumo de FTI proporcionou elevação significativa na produção de AGCC no conteúdo do ceco, sendo esse aumento mais expressivo ($P < 0,001$) no grupo suplementado com a FY em relação ao suplementado com a RAF (Tabela 2.6). Essa tendência foi observada tanto com os AGCC quantitativamente mais importantes (acético, propiônico, butírico) quanto com os produzidos em menor quantidade (isobutírico, valérico, isovalérico).

Concentração de minerais no fígado

A Fig. 2.5 apresenta os resultados da concentração de Fe, Cu e Zn no fígado. Os resultados mostram que o consumo do PF resultou em menor retenção de Fe no fígado e que o consumo da FY levou a recuperação dos valores ao nível do grupo SF (Fig. 2.5-A; $P < 0,001$). Além disso, o consumo da RAF resultou em maior concentração hepática de Fe em relação à do grupo PF, porém os valores permaneceram menores do que os do grupo SF ($P < 0,001$). A concentração hepática de Cu foi maior no grupo PF do que no grupo SF. O consumo dos FTI, por sua vez, resultou em aumento na mobilização hepática de Cu (Fig. 2.5-B). Não foi observada diferença estatisticamente significativa nos teores de Zn no fígado entre os grupos experimentais (Fig. 2.5-C; $P = 0,454$).

Tabela 2.3 - Peso corporal e dos órgãos, parâmetros bioquímicos de Fe, concentração de minerais no fígado e parâmetros hematológicos de ratos alimentados com rações controle (CON) e deficientes em Fe (FeD) por 14 d¹

Variável	CON	FeD	<i>P</i>
Peso corporal (g)	124,98 ± 8,84	116,30 ± 3,32	0,063
Peso úmido do coração (g/100 g)	0,45 ± 0,05	0,62 ± 0,10	0,007
Peso úmido do fígado (g/100 g)	7,22 ± 0,90	4,40 ± 0,58	0,000
Peso úmido do baço (g/100 g)	0,27 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,240*
Fe fígado (µmol/g seco)	57,00 ± 13,43	10,27 ± 1,71	0,000
Cu fígado (µmol/g seco)	5,45 ± 0,83	8,33 ± 2,00	0,009
Zn fígado (µmol/g seco)	20,66 ± 6,22	30,12 ± 7,59	0,053
Hemoglobina (g/L)	135,56 ± 6,75	68,11 ± 6,52	0,000
Pool Fe Hb (mg)	3,35 ± 0,36	1,67 ± 0,30	0,000
Fe sérico (µg/dL)	249,50 ± 34,76	16,88 ± 3,52	0,000
TIBC (µg/dL)	299,18 ± 44,85	469,90 ± 113,38	0,014
Saturação da transferrina (%)	83,46 ± 1,00	3,78 ± 1,28	0,000
Reticulócitos (%)	3,17 ± 1,84	23,56 ± 1,79	0,000
Total céls. medula óssea (× 10 ⁷ /mL)	2,73 ± 1,04	1,78 ± 0,18	0,076
Total céls. baço (× 10 ⁷ /mL)	14,83 ± 2,42	10,09 ± 3,29	0,017

TIBC = Capacidade total de ligação do Fe

¹ Resultados expressos como média ± DP (*n* = 6 por grupo);

Valores considerados significativamente diferentes quando *P* < 0,05.

* Teste de *Mann-Whitney*

Tabela 2.4 - Ganho de peso corporal, consumo de ração e parâmetros intestinais em ratos deficientes em Fe alimentados com rações contendo sulfato ferroso (SF) ou pirofosfato férrico (PF) suplementada com 7,5% de FTI como farinha de yacón (FY) ou Raftilose P95 (RAF)¹

Variável	SF	PF	FY	RAF	P
Ganho de peso corporal (g)	75,67 ± 6,53 ^a	63,95 ± 9,19 ^a	71,42 ± 13,67 ^a	57,93 ± 11,07 ^b	0,003
Consumo de ração (g/14 d)	243,3 ± 17,2 ^a	229,1 ± 15,2 ^a	235,1 ± 21,4 ^a	232,2 ± 35,0 ^a	0,624
Eficácia alimentar	0,31 ± 0,02 ^a	0,28 ± 0,03 ^a	0,30 ± 0,04 ^a	0,25 ± 0,02 ^b	0,001
Excreção fecal (g/5 d, base seca)	5,9 ± 1,1 ^a	5,3 ± 1,3 ^a	6,7 ± 2,5 ^a	5,0 ± 1,0 ^a	0,135
Umidade das fezes (%)	57,3 ± 4,3 ^a	33,4 ± 5,7 ^b	69,6 ± 7,1 ^c	45,3 ± 3,2 ^d	0,000
Peso do tecido do ceco (g/100g rato)	0,26 ± 0,02 ^a	0,33 ± 0,03 ^a	0,88 ± 0,09 ^b	0,68 ± 0,07 ^c	0,000
Peso do conteúdo do ceco (g/100g rato)	1,0 ± 0,2 ^a	1,5 ± 0,2 ^a	4,7 ± 1,4 ^b	3,5 ± 0,7 ^c	0,000
pH do conteúdo do ceco	7,0 ± 0,2 ^a	7,1 ± 0,2 ^a	6,2 ± 0,3 ^b	6,4 ± 0,3 ^c	0,000
Comprimento do intestino delgado (cm)	105,2 ± 6,8 ^a	99,1 ± 10,6 ^a	118,6 ± 8,5 ^b	107,2 ± 6,7 ^a	0,000

FTI = Frutanos do tipo inulina; SF = Sulfato ferroso; PF = Pirofosfato férrico; FY = Farinha de yacón; RAF = Raftilose. ¹ Resultados expressos como média ± DP ($n = 8$ para o grupo SF e $n = 12$ para os grupos PF, FY e RAF). As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey. ^{a,b,c} Valores seguidos da mesma letra sobrescrita não são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Tabela 2.5 - Concentração de hemoglobina (Hb), peso corporal, *pool* de Fe na Hb (*pool* Fe Hb), consumo de Fe e eficiência da regeneração da Hb (HRE) em ratos deficientes em Fe alimentados com rações contendo sulfato ferroso (SF) ou pirofosfato férrico (PF) suplementada com 7,5% de FTI como farinha de yacón (FY) ou Raftilose P95 (RAF)¹

Variável	SF	PF	FY	RAF	P
Hb (g/L)					
Dia 0	68,3 ± 5,5 ^a	75,3 ± 13,5 ^a	77,0 ± 10,1 ^a	74,3 ± 10,2 ^a	0,347
Dia 7	94,4 ± 13,8 ^a	73,1 ± 13,0 ^b	102,4 ± 5,2 ^c	87,0 ± 13,3 ^d	0,000
Dia 14	116,2 ± 7,6 ^a	100,1 ± 14,2 ^b	123,9 ± 11,1 ^c	115,5 ± 12,3 ^c	0,000
Peso corporal (g)					
Dia 0	111,7 ± 13,4 ^a	112,1 ± 6,0 ^a	109,4 ± 10,5 ^a	113,3 ± 7,4 ^a	0,772
Dia 7	148,0 ± 13,1 ^a	144,2 ± 8,5 ^a	145,1 ± 13,2 ^a	138,3 ± 12,6 ^a	0,307
Dia 14	187,4 ± 15,7 ^a	176,1 ± 12,5 ^a	180,8 ± 18,5 ^a	171,3 ± 15,7 ^a	0,152
<i>Pool</i> Fe Hb (mg)					
Dia 0	1,7 ± 0,2 ^a	1,9 ± 0,3 ^a	1,9 ± 0,3 ^a	1,9 ± 0,3 ^a	0,411
Dia 7	3,1 ± 0,6 ^a	2,4 ± 0,5 ^b	3,3 ± 0,3 ^c	2,7 ± 0,3 ^d	0,000
Dia 14	4,9 ± 0,4 ^a	4,0 ± 0,8 ^b	5,0 ± 0,7 ^a	4,4 ± 0,4 ^{abc}	0,000
Consumo de Fe (mg)					
Dia 7	5,9 ± 0,6 ^a	6,4 ± 0,7 ^a	7,1 ± 1,2 ^b	5,6 ± 0,9 ^{ac}	0,002
Dia 14	12,5 ± 0,9 ^a	12,4 ± 1,2 ^a	12,8 ± 1,1 ^a	11,6 ± 1,8 ^a	0,054
HRE (%)					
Dia 7	24,4 ± 9,7 ^a	10,1 ± 5,9 ^b	20,7 ± 3,9 ^{ac}	14,1 ± 6,4 ^c	0,000
Dia 14	25,4 ± 2,8 ^a	16,7 ± 5,4 ^b	24,5 ± 4,6 ^{ac}	22,3 ± 4,7 ^{acd}	0,000

FTI = Frutanos do tipo inulina; SF = Sulfato ferroso; PF = Pirofosfato férrico; FY = Farinha de yacón; RAF = Raftilose.¹ Resultados expressos como média ± DP ($n = 8$ para o grupo SF e $n = 12$ para os grupos PF, FY e RAF). As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey. ^{a,b,c,d} Valores seguidos da mesma letra sobrescrita não são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Figura 2.2.

Valor biológico relativo (RBV) em ratos deficientes em Fe alimentados com rações contendo sulfato ferroso (SF) ou pirofosfato férrico (PF) suplementada com 7,5% de FTI como farinha de yacón (FY) ou Raftilose P95 (RAF). FTI = Frutanos do tipo inulina; SF = Sulfato ferroso; PF = Pirofosfato férrico; FY = Farinha de yacón; RAF = Raftilose. Resultados expressos como média $\pm$ DP ($n = 8$ para o grupo SF e $n = 12$ para os demais grupos). As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey. ^{a,b} Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Figura 2.3.

Absorção aparente de Fe (A), Cu (B) e Zn (C) em ratos deficientes em Fe alimentados com rações contendo sulfato ferroso (SF) ou pirofosfato férrico (PF) suplementadas com 7,5% de FTI como farinha de yacón (FY) ou Raftilose P95 (RAF). FTI = Frutanos do tipo inulina; SF = Sulfato ferroso; PF = Pirofosfato férrico; FY = Farinha de yacón; RAF = Raftilose. Resultados expressos como média $\pm$ DP ($n = 8$ para o grupo SF e $n = 12$ para os demais grupos). As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey.

^{a,b,c} Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Figura 2.4.

Especiação de Fe no conteúdo do ceco em ratos deficientes em Fe alimentados com rações contendo sulfato ferroso (SF) ou pirofosfato férrico (PF) suplementadas com 7,5% de FTI como farinha de yacón (FY) ou Raftilose P95 (RAF). FTI = Frutanos do tipo inulina; SF = Sulfato ferroso; PF = Pirofosfato férrico; FY = Farinha de yacón; RAF = Raftilose. FI = Fração intercambiável; FC = Fração carbonato; FOx = Fração óxido; FOr = Fração orgânica; FR = Fração residual. Resultados expressos como média $\pm$ DP ($n = 8$ para o grupo SF e $n = 12$ para os demais grupos). As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey. ^{a,b,c} Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Tabela 2.6 - Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no conteúdo do ceco em ratos deficientes em Fe alimentados com rações contendo sulfato ferroso (SF) ou pirofosfato férrico (PF) suplementada com 7,5% de FTI como farinha de yacón (FY) ou Raftilose P95 (RAF)¹

Variável	SF	PF	FY	RAF	P
AGCC (μmol/g úmido)					
Acético	30,53 ± 4,61 ^a	29,11 ± 6,32 ^a	31,96 ± 8,76 ^a	28,53 ± 5,07 ^a	0,815
Propiônico	7,02 ± 1,22 ^a	6,40 ± 1,80 ^a	8,12 ± 2,40 ^a	6,26 ± 1,71 ^a	0,349
Butírico	4,84 ± 0,76 ^a	4,24 ± 0,84 ^a	8,85 ± 2,32 ^b	5,93 ± 1,47 ^a	0,000
Isobutírico	0,65 ± 0,14 ^a	0,62 ± 0,13 ^b	0,26 ± 0,10 ^a	0,28 ± 0,07 ^b	0,000
Isovalérico	3,70 ± 0,56 ^a	3,15 ± 0,99 ^a	4,70 ± 1,24 ^a	3,35 ± 0,92 ^a	0,062
Valérico	0,60 ± 0,11 ^a	0,59 ± 0,22 ^a	0,32 ± 0,06 ^b	0,30 ± 0,04 ^b	0,001
Capróico	ND	ND	ND	ND	-
Isocapróico	ND	ND	ND	ND	-
Heptaenóico	ND	ND	ND	ND	-
Total	47,33 ± 6,35 ^a	44,12 ± 8,64 ^a	54,20 ± 11,20 ^a	44,66 ± 4,24 ^a	0,185
AGCC (μmol/ceco)					
Acético	79,71 ± 23,28 ^a	94,82 ± 13,65 ^a	356,33 ± 131,89 ^b	229,36 ± 61,05 ^c	0,000
Propiônico	18,38 ± 6,13 ^a	21,08 ± 5,88 ^a	94,61 ± 49,01 ^b	50,73 ± 19,47 ^{ac}	0,000
Butírico	12,51 ± 3,29 ^a	13,88 ± 2,19 ^a	101,54 ± 45,61 ^b	48,75 ± 17,81 ^{ac}	0,000
Isobutírico	1,70 ± 0,64 ^a	2,09 ± 0,60 ^a	2,90 ± 1,26 ^a	2,31 ± 0,76 ^a	0,127
Isovalérico	9,63 ± 2,63 ^a	10,30 ± 2,86 ^a	53,35 ± 23,41 ^b	27,72 ± 12,39 ^{ac}	0,000
Valérico	1,57 ± 0,53 ^a	1,94 ± 0,68 ^a	3,49 ± 0,83 ^b	2,48 ± 0,75 ^{ab}	0,000
Capróico	ND	ND	ND	ND	-
Isocapróico	ND	ND	ND	ND	-
Heptaenóico	ND	ND	ND	ND	-
Total	123,50 ± 35,25 ^a	144,10 ± 18,92 ^a	612,22 ± 228,05 ^b	361,35 ± 88,58 ^c	0,000

FTI = Frutanos do tipo inulina; SF = Sulfato ferroso; PF = Pirofosfato férrico; FY = Farinha de yacón; RAF = Raftilose;

¹ Resultados expressos como média ± DP ($n = 8$ para o grupo SF e $n = 12$ para os grupos PF, FY e RAF); As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey; ^{a,b,c,d} Valores seguidos da mesma letra sobrescrita não são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Figura 2.5.

Concentração hepática de Fe (A), Cu (B) e Zn (C) em ratos deficientes em Fe alimentados com rações contendo sulfato ferroso (SF) ou pirofosfato férrico (PF) suplementada com 7,5% de FTI como farinha de yacón (FY) ou Raftilose P95 (RAF). FTI = Frutanos do tipo inulina; SF = Sulfato ferroso; PF = Pirofosfato férrico; FY = Farinha de yacón; RAF = Raftilose. Resultados expressos como média $\pm$ DP ($n = 8$ para o grupo SF e $n = 12$ para os demais grupos). As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey.

^{a,b,c} Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Discussão

Os efeitos positivos do consumo de FTI (FOS e inulina) provenientes de fontes purificadas na absorção de minerais no intestino grosso têm sido amplamente estudados usando diferentes protocolos experimentais (OHTA *et al.*, 1994a,b, 1995; KRUGER *et al.*, 2003; ZAFAR *et al.*, 2004; RASCHKA & DANIEL, 2005). Entretanto, por ora, este é o primeiro estudo sobre os efeitos de uma fonte de frutanos não purificada (FY) na biodisponibilidade de Fe. Esses efeitos foram comparados com aqueles produzidos pelo consumo de uma fonte purificada de FTI (Raftilose P95®).

O efeito dos FTI na absorção de minerais parece ser mediado pela produção bacteriana de AGCC no intestino grosso, que reduz o pH do conteúdo intestinal e aumenta a solubilidade dos minerais (SCHOLZ-AHRENS & SCHREZENMEIR, 2007). O consumo dos FTI (na forma de FY) resultou em significativa mobilização do Fe da FOx (susceptível a sofrer redução) para a FI, considerada uma fração no intestino na qual o Fe encontra-se mais solúvel e, portanto, mais biodisponível (Fig. 2.4). Além disso, a associação entre produção de AGCC e a resultante diminuição no pH do conteúdo intestinal favorece a hipertrofia do tecido intestinal, que pode levar ao aumento na superfície para a absorção dos minerais (RÉMÉSY *et al.*, 1993; LOBO *et al.*, 2007). No presente estudo, o aumento no tamanho do ceco e do intestino delgado nos animais alimentados com os FTI (principalmente na forma de FY; Tabela 2.4) pode ter contribuído para a maior absorção de Fe e Zn em relação ao grupo PF (Fig. 2.3). Esses efeitos tróficos têm sido atribuídos ao aumento na proliferação celular proporcionada pelo butirato, que é utilizado como fonte energética pelo epitélio do intestino grosso. Nesse aspecto, no presente estudo o consumo da FTI resultou em aumento significativo na produção de AGCC, sendo esse efeito mais pronunciado no grupo

suplementado com a FY em relação à RAF (~70%, FY vs. RAF; Tabela 2.6). Além disso, o conteúdo de butirato ($\mu\text{mol}/\text{ceco}$) aumentou em 108% no grupo que recebeu a FY em relação à RAF. Neste aspecto, estudo anterior demonstrou, em ratos, aumento na bifurcação de criptas em resposta ao consumo de 7,5% de FTI da FY após 27 d de estudo (LOBO *et al.*, 2007). Considerando que o processo de bifurcação de criptas ocorre em função do aumento na proliferação de células-tronco na base da cripta intestinal (BJERKNES & CHENG, 2005), é interessante inferir que o consumo desses carboidratos poderia afetar a população de células-tronco no intestino.

Além disso, a presença da FY no intestino grosso pode ter resultado em mais substratos não digeridos sendo fermentados, considerando a composição da FY em FA (6% de FAI e 4% de FAS). Neste aspecto, determinadas propriedades físico-químicas das FA podem também influenciar o crescimento da mucosa (HARA *et al.*, 1996). Além disso, a proliferação celular no epitélio pode ainda ser afetada por peptídeos secretados pelas células enteroendócrinas na mucosa intestinal (GOODLAD & WRIGHT, 1987). Recente estudo demonstrou que o butirato produzido pela fermentação de FTI pode contribuir para a diferenciação de células L e expressão de proglucagon no cólon (CANI *et al.*, 2007). Outros fatores de crescimento intestinais podem também estar envolvidos na modulação do trofismo intestinal por componentes da dieta (GOODLAD & WRIGHT, 1987; GHATEI *et al.*, 2001). Por exemplo, a chegada do bolo alimentar no lúmen distal estimula as células enteroendócrinas a secretar o peptídeo semelhante ao glucagon-2 (GLP-2) que, por sua vez, atua na manutenção da integridade do epitélio do intestino delgado (GHATEI *et al.*, 2001). Isto poderia explicar o mais longo intestino delgado dos animais alimentados com a FY no presente estudo (Table 2.4).

O consumo dos FTI resultou em aumento da HRE dos animais anêmicos alimentados com uma fonte de baixa biodisponibilidade (PF; cerca de 30-50% da biodisponibilidade do SF; Tabela 2.5). O RBV do grupo PF foi equivalente ao do SF, que é considerado a referência em estudos de biodisponibilidade de Fe (MAHONEY *et al.*, 1974; DUTRA-de-OLIVEIRA *et al.*, 1995; POLTRONIERI *et al.*, 2000; HERNÁNDEZ *et al.*, 2003), quando na presença dos FTI nas rações (Fig. 2.2). Esse efeito foi ainda mais significativo quando os animais consumiram a FY como fonte de FTI, uma vez que os animais recuperaram a Hb já com 7 d de período de repleção, em relação aos alimentados com a RAF. Um inconveniente do presente estudo poderia ser a maior concentração de Fe nas rações contendo a FY (Tabela 2.2). No entanto, a quantidade de Fe na ração, bem como o ganho de peso e a ingestão de Fe não parecem afetar a HRE se a ingestão de Fe metabolizável não excede as necessidades de Fe (MAHONEY *et al.*, 1974).

Em ratos, o consumo de FTI pode afetar a absorção intestinal de Ca pela alteração da expressão de proteínas envolvidas com o processo absorptivo tais como calbindina-D_{9k}, claudina e aquaporina-8 (RASCHKA & DANIEL, 2005; NZEUSSEU *et al.*, 2006). Com relação aos microminerais, Tako *et al.* (2006) recentemente observaram aumento na expressão de transportadores de Fe (DMT1 e ferroportina) e de Zn (ZnT1) em amostras de duodeno de leitões alimentados com 4% de inulina por 7 semanas. Yasuda *et al.* (2006) observaram aumento na eficiência da recuperação da Hb em leitões alimentados com rações contendo 4% de FTI purificados (inulina), efeito que se correlacionou com a concentração de Fe solúvel no conteúdo do intestino grosso dos animais. O mesmo grupo, em estudo posterior, aplicando a técnica de RT-PCR semiquantitativo, observou aumento na expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas com o transporte e armazenamento de Fe, tais como o DMT-1, a ferritina e o receptor de transferrina,

no cólon de leitões anêmicos alimentados com 4% de inulina, após 5 semanas (TAKO *et al.*, 2008).

O Fe, como micronutriente, tem a homeostase regulada pela sua absorção intestinal – que é cerca de 10% do total ingerido. Fatores que afetam o pH luminal ou a habilidade quelante de determinados componentes da dieta podem afetar também o seu potencial de óxido-redução e interferir em sua solubilidade (COLLI, 2006). Por outro lado, quando os estoques de Fe se encontram reduzidos ou quando existe aumento na eritropoiese, a absorção intestinal de Fe é aumentada, basicamente como consequência de alterações na expressão de transportadores de Fe pela membrana apical e basolateral da célula intestinal (FRAZER & ANDERSON, 2005). O processo de absorção pode ocorrer em toda a extensão do intestino, embora seja mais eficiente no duodeno e no jejuno superior (FRAZER *et al.*, 2007). À medida que a célula migra para o eixo cripta-vilosidade (ou para a superfície da cripta, no intestino grosso) e se diferencia em células absorptivas ocorre aumento da expressão de proteínas envolvidas no transporte de Fe pelas membranas apical e basolateral da célula intestinal (OATES, 2007).

Pode-se considerar que a absorção de Fe envolva várias etapas. Em geral, íons Fe^{3+} chegam à membrana apical e são reduzidos a Fe^{2+} , pela ação de uma redutase (Dcytb; citocromo b duodenal). Em seguida, o Fe entra na célula intestinal através de uma proteína transportadora de metais divalentes (DMT-1) localizada na membrana apical da célula (FRAZER & ANDERSON, 2005). No meio intracelular, o Fe pode ser armazenado como ferritina ou transferido para a membrana basolateral, onde é exportado pela ação coordenada da ferroportina, outro transportador, e a hefaestina, uma ferroxidase que o converte para a valência Fe^{3+} . O Fe então é transportado pela circulação sangüínea, ligado à transferrina, e distribuído para os tecidos-alvo (GRAHAM *et al.*, 2007). Em nível

sistêmico, essas alterações são reguladas pela hepcidina, um hormônio produzido pelo fígado que atua bloqueando a saída de Fe da célula intestinal para a circulação (DARSHAN & ANDERSON, 2007). Sua produção é aumentada em algumas situações, como sobrecarga de Fe e inflamação (NEMETH & GANZ, 2006). Assim, a hepcidina indiretamente modula a absorção de Fe e afeta, como consequência, o *pool* de Fe lábil (LIP; *labile Fe pool*) da célula intestinal (OATES, 2007). No presente estudo, a fermentação bacteriana dos FTI resultou em aumento de 80% (para a FY) e 34% (para a RAF) na absorção aparente de Fe em relação ao grupo PF (Fig. 2.3), devido ao aumento da sua solubilidade no conteúdo do ceco, como consequência da redução no pH causada pela maior produção de AGCC (Tabela 2.6). Essas alterações físico-químicas no lúmen intestinal influenciaram a especiação química do Fe (Fig. 2.4) de modo a facilitar sua absorção pelas vias transcelular e paracelular, uma vez que a produção de AGCC pode influenciar a permeabilidade das junções oclusivas (MINEO *et al.*, 2002; OHATA *et al.*, 2005). Por outro lado, considerando que o DMT1 e a ferroportina são expressos no cólon do rato (JOHNSTON *et al.*, 2006), nossa hipótese foi que se as proteínas envolvidas com o processo de absorção do Fe são expressas à medida que as células intestinais se diferenciam, a expansão no compartimento proliferativo proporcionada pela fermentação bacteriana dos FTI poderia contribuir com mais células se diferenciando em células absorptivas.

O aumento na HRE foi acompanhado pela maior concentração hepática de Fe nos animais dos grupos suplementados com os FTI em relação ao grupo PF e, mais uma vez, os animais alimentados com a FY apresentaram valores similares aos alimentados com o SF como fonte de Fe (Fig. 2.5-A). Além disso, o consumo de Fe como PF resultou em aumento na concentração de Cu no fígado e o consumo dos FTI pareceu aumentar a mobilização hepática desse mineral (Fig.

2.5-B). Os efeitos da interação entre o Fe e o Cu têm sido demonstrados em ratos. O Cu afeta a absorção intestinal de Fe, uma vez que é cofator da ferroxidase hefaestina, que oxida o Fe após sua saída da célula intestinal via ferroportina (CHEN *et al.*, 2006). Além disso, outra ferroxidase, a ceruloplasmina, também necessita do Cu para auxiliar na mobilização de Fe do estoque hepático. Considerando que o fígado é o principal órgão responsável pelo armazenamento de Cu no organismo (ROBERTS & SARKAR, 2008), o aumento na absorção de Fe em consequência do consumo dos FTI pode ter aumentado a mobilização do Cu para exercer o seu papel catalítico.

Além disso, o LIP afeta a atividade da proteína regulada pelo Fe 1 (IRP1; *iron-regulatory protein 1*) que, por sua vez, regula o RNA-m do receptor de transferrina (TfR) em nível pós-transcricional, pela sua ligação com elementos responsivos ao Fe (IRE) no RNA, quando as células estão deficientes em Fe (WALLANDER *et al.*, 2006). Deste modo, é possível especular se os FTI poderiam influenciar indiretamente os estoques de Fe modulando seus mecanismos de regulação intracelular (via IRE/IRP) uma vez que a absorção intestinal e a concentração hepática de Fe foram aumentadas após o consumo desses carboidratos (Figs.2.3 e 2.5-A).

Em conclusão, a biodisponibilidade de Fe foi aumentada pelo consumo dos FTI, sendo esse efeito mais pronunciado quando a fonte de frutanos foi a FY. A maior produção de AGCC resultou em diminuição do pH, que afetou a concentração de Fe solúvel no lúmen intestinal. Além disso, a maior produção de butirato pode ter contribuído para esses efeitos, uma vez que esse AGCC está relacionado com aumento na celularidade no compartimento proliferativo da cripta intestinal, o que modificaria a arquitetura da mucosa intestinal e favoreceria a absorção de Fe pelo aumento na superfície intestinal. No entanto, outros fatores

devem ser levados em consideração, como o grau de deficiência do mineral e a matriz alimentar na qual o Fe está inserido, que podem afetar as propriedades físico-químicas do bolo alimentar presente no lúmen intestinal. Esses efeitos, se confirmados em seres humanos, poderiam contribuir para a formulação de dietas específicas para indivíduos com anemia por deficiência de Fe.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- 1- O efeito do consumo de FTI (Raftilose, fonte purificada de FTI) na biodisponibilidade de Ca parece depender da quantidade de Ca presente nas rações.
- 2- Em situações de deficiência de Ca e Fe, o efeito dos FTI na absorção de outros minerais (tais como Mg e Zn) parece exercer importância na sua retenção tecidual, possivelmente para a manutenção de funções específicas.
- 3- Com relação à deficiência de Fe, o modelo que melhor demonstrou os efeitos dos FTI na sua biodisponibilidade foi o da repleção de Hb.
- 4- O consumo da FY (fonte não-purificada de FTI) resultou em mais rápida recuperação da anemia e, portanto, em maior biodisponibilidade de Fe, proveniente do PF, do que o consumo da Raftilose (fonte purificada de FTI).
- 5- Esses resultados ocorreram em função da maior acidificação do pH e maior solubilização do Fe no conteúdo intestinal, e da maior produção de AGCC (em particular, o butirato) que podem ter afetado a proliferação celular e a arquitetura da mucosa do intestino, aumentando assim a superfície absorptiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, S.A.; HAWTHORNE, K.M.; ALIU, O.; HICKS, P.D.; CHEN, Z. An inulin-type fructan enhances calcium absorption primarily via an effect on colonic absorption in humans. *Journal of Nutrition*, v.137, p.2208-12, 2007.
- AACC. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. The definition of dietary fiber, Report of the dietary fiber definition committee to the board of directors of the American Association of Cereal Chemists. *Cereal Foods World*, v.46, n.3, p.112-26, 2001.
- ASP, N.G. Classification and methodology of food carbohydrates as related to nutritional effects. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.61 (suppl.), p.930S-7S, 1995.
- ASP, N.G. Dietary carbohydrates: classification by chemistry and physiology. *Food Chemistry*, v.57, p.9-14, 1996.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 16^a ed., Washington, v.1, cap.12, p.7, 1995.
- BJERKNES, M.; CHENG, H. Gastrointestinal stem cells II. Intestinal stem cells. *American Journal of Physiology*, v.289, p.G381-387, 2005.
- BURKITT, D.P. Some disease characteristic of modern civilization. *British Medical Journal*, v.1, p.274-6, 1973.
- CARVALHO, M.A.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, C.L. Frutanos: ocorrência, estrutura e utilização, com ênfase em plantas do cerrado brasileiro. In: LAJOLO, F.M.; SAURACALIXTO, F.; PENNA, E.W.; MENEZES, E.W. *Fibra Dietética en Iberoamérica: Tecnología y Salud – Obtención, Caracterización, Efecto Fisiológico y Aplicación en Alimentos*, Projeto CYTED XI.6, São Paulo: Varela, 2001, p.77-89.
- CANI, P.D.; DEWEVER, C.; DELZENNE, N.M. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide and ghrelin) in rats. *British Journal of Nutrition*, v.92, p.521-6, 2004.

CANI, P.D.; NEYRINCK, A.M.; MATON, N.; DELZENNE, N.M. Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: Involvement of glucagon-like peptide. *Obesity Research*, v.13, p.1000-7, 2005a.

CANI, P.D.; DAUBIOUL, C.A.; REUSENS, B.; REMACLE, C.; CATILLON, C.; DELZENNE, N.M. Involvement of endogenous glucagons-like peptide-1 (7-36) amide on glycaemia-lowering effect of oligofructose in streptozotocin-treated rats. *Journal of Endocrinology*, v.185, p.457-65, 2005b.

CANI, P.D.; HOSTE, S.; GUIOT, Y.; DELZENNE, N.M. Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. *British Journal of Nutrition*, v.98, p.32-7, 2007.

CHEN, H.; HUANG, G.; SU, T.; GAO, H.; ATTIEH, Z.K.; McKIE, A.T.; ANDERSON, G.J.; VULPE, C.D. Decreased hephaestin activity in the intestine of copper-deficient mice causes systemic iron deficiency. *Journal of Nutrition*, v.136, p.1236-41, 2006.

CHENG, L.; ARAKI, K.; FURUYA, Y.; MATSUOKA, T.; MASHIMA, K.; KOBAYASHI, M.; MATSUURA, K. Morphological study of the regeneration mechanism of acetic acid-injured colon crypts in the rat. *Medical Electron Microscopy*, v.33, p.165-171, 2000.

CHERBUT, C. Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. *British Journal of Nutrition*, v.87, p.S159-S162, 2002.

COCATO, M.L.; RÉ, M.I.; TRINDADE NETO, M.A.; CHIEBAO, H.P.; COLLI, C.; Avaliação por métodos *in vitro* e *in vivo* da biodisponibilidade de sulfato ferroso microencapsulado. *Revista de Nutrição*, v.20, p.239-47, 2007.

COLLI, C. Biodisponibilidade de ferro. In: BRAGA, J.A.P.; AMÂNCIO, O.M.S.; VITALLE, M.S.S. *O ferro e a saúde das populações*, 1ª. ed, São Paulo: Roca, 2006. p.45-65.

CONOVER, W.J. *Practical Nonparametric Statistics*. 3rd ed. New York: John Wiley; 1999.

- CREEDON, A.; FLYNN, A.; CASHMAN, K. The effect of moderately and severely restricted dietary magnesium intakes on bone composition and bone metabolism in the rat. *British Journal of Nutrition*, v.82, p.63-71, 1999.
- CUMMINGS, J.H.; ENGLYST, H. Gastrointestinal effects of food carbohydrate. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.61 (suppl.), p.938S-45S, 1995.
- CUMMINGS, J.H.; MacFARLANE, G.T. Gastrointestinal effects of prebiotics. *British Journal of Nutrition*, v.87, p.S145-S51, 2002.
- DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. *Practical hematology*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1995.
- DARSHAN, D.; ANDERSON, G.J. Liver-gut axis in the regulation of iron homeostasis. *World Journal of Gastroenterology*, v.13, p.4737-45, 2007.
- DEKANEY, C.M.; FONG, J.J.; RIGBY, R.J.; LUND, P.K.; HENNING, S.J.; HELMRATH, M.A. Expansion of intestinal stem cells associated with long-term adaptation following ileocecal resection in mice. *American Journal of Physiology*, v.293, p.G1013-22, 2007.
- DELZENNE, N.M.; CANI, P.D.; NEYRINCK, A.M. Modulation of glucagons like-peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. *Journal of Nutrition*, v.137, p.2547S-51S, 2007.
- DER AGOPIAN, R.G.; SOARES, C.A.; PURGATTO, E.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Identification of fructooligosaccharides in different banana cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, p.3305-10, 2008.
- DRABKIN, D.L.; AUSTIN, J.H. Spectrophotometric studies II. Preparations from washed blood cells: nitric oxide hemoglobin and sulphemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, v.112, p.51-65, 1935.
- DUTRA-de-OLIVEIRA, J.E.; FREITAS, M.L.S.; FERREIRA, J.F.; GONÇALVES, A.L.; MARCHINI, J.S. Iron from complex salts and its bioavailability to rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, v.65, p.272-5, 1995.
- FILISSETTI, T.M.C.C.; LOBO, A.R. Fibra alimentar e seu efeito na biodisponibilidade de

minerais. In: COZZOLINO, S.M.F. *Biodisponibilidade de nutrientes*, 2^a. ed., Barueri: Manole, 2006, p. 175-215.

FISKE, C.H.; SUBBAROW, V. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, v. 66, p. 375-400, 1925.

FRAZER, D.M.; ANDERSON, G.J. Iron imports I. Intestinal iron absorption and its regulation. *American Journal of Physiology*, v.289, p.G631-5, 2005.

FRAZER, D.M.; WILKINS, S.J.; ANDERSON, G.J. Elevated iron absorption in the neonatal rat reflects high expression of iron transport genes in the distal alimentary tract. *American Journal of Physiology*, v.293, p.G525-31, 2007.

GATHEI, M.A.; GOODLAD, R.A.; TAHERI, S.; MANDIR, N.; BRYNES, A.E.; JORDINSON, M.; BLOOM, S.R. Proglucagon-derived peptides in intestinal epithelial proliferation, Glucagon-like peptide-2 is a major mediator of intestinal epithelial proliferation in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, v.46, p.1255-63, 2001.

GIBSON, R.S. The role of diet- and host-related factors in nutrient bioavailability and thus in nutrient-based dietary requirement estimates. *Food and Nutrition Bulletin*, n.28 (Suppl.1), p.S77-S100, 2007.

GOODLAD, R.A.; WRIGHT, N.A. Peptides and epithelial growth regulation. *Experientia*, v.43, p.780-4, 1987.

GRAHAM, R.M.; CHUA, A.C.G.; HERBISON, C.E.; OLYNK, J.K.; TRINDER, D. Liver iron transport. *World Journal of Gastroenterology*, v.13, p.4725-36, 2007.

HALLBERG, L.; ROSSANDER, L.; SKANBERG, L. Phytates and inhibitory effects of bran on iron absorption in man. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.53, p.112-19, 1991.

HALLBERG, L.; BRUNE, M.; ERLANDSSON, M.; SANDBERG, A-N.; ROSSANDER-HULTÉN, L. Calcium: effect of different amounts on nonheme and heme-iron absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.45, p.988-96, 1987.

HARA, H.; SUZUKI, K.; KOBAYASHI, S.; KASAI, T. Fermentable property of dietary fiber may not determine cecal and colonic mucosal growth in fiber-fed rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.7, p.549-54, 1996.

HERNÁNDEZ, M.; SOUSA, V.; MORENO, A.; VILLAPANDO, S.; LÓPEZ-ALARCÓN, M. Iron bioavailability and utilization in rats are lower from lime-treated corn flour than from wheat flour when they are fortified with different sources of iron. *Journal of Nutrition*, v.133, p.154-9, 2003.

HURRELL, R. Bioavailability – a time for reflection. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, v.72, p.5-6, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3ª. ed., São Paulo: IAL, 1985, v.1, p.21-44.

ITAYA, N.M.; CARVALHO, M.A.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, C.L. Fructosyl transferase and hydrolase activities in rizophores and tuberous roots upon growth of *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). *Physiologia Plantarum*, v.116, 451-9, 2002.

JOHNSTON, K.L.; JOHNSON, D.M.; MARKS, J.; SRAI, S.K.; DEBNAM, E.S.; SHARP, P.A. Non-haem iron transport in the rat proximal colon. *European Journal of Clinical Investigation*, v.36, p.35-40, 2006.

KATSUMATA, S.; TSUBOI, R.; UEHARA, M.; SUZUKI, K. Dietary iron deficiency decreases serum osteocalcin concentration and bone mineral density in rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.70, p.2547-50, 2006.

KLEESSEN, B.; HARTMANN, L.; BLAUT, M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *British Journal of Nutrition*, v.89, p.597-606, 2003.

KRUGER, M.C.; BROWN, K.E.; COLLETT, G.; LAYTON, L.; SCHOLLUM, L.M. The effect of fructooligosaccharides with various degrees of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. *Experimental Biology and Medicine*, v.228, p.683-8, 2003.

LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. Dietary fiber and resistant starch intake in Brazil: Recommendations and actual patterns. In: CHO, S.S.; DREHER, M.L. *Handbook of dietary fiber*, New York: Basel, 2001, p.845-58.

LE BLAY, G.M.; MICHEL, C.D.; BLOTTIÈRE, H.M.; CHERBUT, C.J. Prolonged intake of fructo-oligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. *Journal of Nutrition*, v.129, p.2231-35, 1999.

LEVRAT, M-A.; RÉMÉSY, C.; DEMIGNÉ, C. High propionic acid fermentations and mineral accumulation in the cecum of rats adapted to different levels of inulin. *Journal of Nutrition*, v.121, p.1730-7, 1991.

LIN, J.; NAFDAY, S.M.; CHAUVIN, S.N.; MAGID, M.S.; PABBATIREDDY, S.; HOLZMAN, I.R.; BABYATSKY, M.W. Variable effects of short-chain fatty acids and lactic acid in inducing intestinal mucosal injury in newborn rats. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v.35, p.545-50, 2002.

LOBO, A.R.; LEMOS SILVA, G.M. Aspectos tecnológicos de produtos de panificação e massas alimentícias com teor calórico reduzido. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.37, p.1-8, 2003.

LOBO, A.R. Efeito dos frutanos (frutooligossacarídeos) na biodisponibilidade de cálcio e magnésio em ratos [dissertação]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Universidade de São Paulo, 2004, 138p. Disponível em: <http://www.teses.usp.br>

LOBO, A.R.; COLLI, C.; FILISETTI, T.M.C.C. Fructooligosaccharides improve bone mass and biomechanical properties in rats. *Nutrition Research*, v.26, p.413-20, 2006.

LOBO, A.R.; COLLI, C.; ALVARES, E.P.; FILISETTI, T.M.C.C. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance and bone calcium retention in growing rats. *British Journal of Nutrition*, v.97, p.766-85, 2007.

LOBO, A.R.; MANCINI FILHO, J.; ALVARES, E.P.; COCATO, M.L.; COLLI, C.

Effect of dietary lipid and inulin-type fructans on mineral bioavailability in rats. *Nutrition*. 2008. *No prelo*.

LOBO, A.S.; TRAMONTE, V.L.C. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. *Revista de Nutrição*, v.17, p.107-13, 2004.

LU, Z.X.; GIBSON, P.R.; MUIR, J.G.; FIELDING, M.; O'DEA, K. Arabinoxylan fiber from a by-product of wheat flour processing behaves physiologically like a soluble, fermentable fiber in the large bowel of rats. *Journal of Nutrition*, v.130, p.1984-90, 2000.

MAHONEY, A.W.; VAN ORDEN, C.C.; HENDRICKS, D.G. Efficiency of converting food iron into haemoglobin by the anemic rat. *Nutrition Metabolism*, v.17, p.223-30, 1974.

MASKENS, A.P. Histogenesis of colon glands during postnatal growth. *Acta Anatomica*, v.100, p.7-26, 1978.

MEDEIROS, D.M.; ILICH, J.; IRETON, J.; MATKOVIC, V.; SHIRY, L.; WILDMAN, R. Femur from rats fed diets deficient in copper and iron have decreased mechanical strength and altered mineral composition. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, v.10, p.197-203, 1997.

MEDEIROS, D.M.; PLATTNER, A.; JENNINGS, D.; STOECKER, B. Bone morphology, strength and density are compromised in iron-deficient rats and exacerbated by calcium restriction. *Journal of Nutrition*, v.132, p.3135-41, 2002.

MEDEIROS, D.M.; STOECKER, B.; PLATTNER, A.; JENNINGS, D.; HAUB, M. Iron deficiency negatively affects vertebrae and femurs of rats independently of energy intake and body weight. *Journal of Nutrition*, v.134, p.3061-7, 2004.

MINEO, H.; HARA, H.; SHIGEMATSU, N.; OKUHARA, Y.; TOMITA, F. Melibiose, difructose anhydride III and difructose anhydride IV enhance net calcium absorption in

rat small and large intestinal epithelium by increasing the passage of tight junctions in vitro. *Journal of Nutrition*, v.132, p.3394-9, 2002.

MONTGOMERY, D.C. *Design and Analysis of Experiments*. 5th ed. New York: John Wiley; 2001.

MOSHFEH, A.J.; FRIDAY, J.E.; GOLDMAN, J.P.; AHUJA, J.K. Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans. *Journal of Nutrition*, v.129, p.1407S-11S, 1999.

NEMETH, E.; GANZ, T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annual Reviews of Nutrition*, v.26, p.323-42, 2006.

NIEVES, J.W. Osteoporosis: the role of micronutrients *American Journal of Clinical Nutrition*, v.81 (Suppl.), p.1232S-9S, 2005.

NZEUSSEU, A.; DIENST, D.; HAUFROID, V.; DEPRESSEUX, G.; DEVOGELAER, J.P.; MANICOURT, D.H. Inulin and fructo-oligosaccharides differ in their ability to enhance the density of cancellous and cortical bone in the axial and peripheral skeleton of growing rats. *Bone*, v.38, p.394-9, 2006.

OATES, P.S. The relevance of the intestinal crypt and enterocyte in regulating iron absorption. *European Journal of Physiology*, v.455, p.201-13, 2007.

OHATA, A.; USAMI, M.; MIYOSHI, M. Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cells via lipoxigenase activation. *Nutrition*, v.21, p.838-47, 2005.

OHTA, A.; OHTSUKI, M.; TAKIZAWA, T.; INABA, H.; ADACHI, T.; KIMURA, S. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of magnesium and calcium by cecectomized rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, v.64, p.316-23, 1994a.

OHTA, A.; BABA, S.; TAKIZAWA, T.; ADACHI, T. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of magnesium in the magnesium-deficient rat model. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v.40, p.171-80, 1994b.

- OHTA, A.; OHTSUKI, M.; BABA, S.; TAKIZAWA, T.; ADACHI, T.; KIMURA, S. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v.41, p.281-91, 1995.
- PARFITT, A.M.; DREZNER, M.K.; GLORIEUX, F.H.; KANIS, J.A.; MALLUCHE, H.; MEUNIER, P.J. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units, Report of ASBMR Histomorphometry Nomenclature Comitee. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 2, p. 595-610, 1987.
- PERETZ, A.; PAPADOPOULOS, T.; WILLEMS, D.; HOTIMSKY, A.; MICHIELS, N.; SIDEROVA, V.; BERGMANN, P.; NEVE, J. Zinc supplementation increases bone alkaline phosphatase in healthy men. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, v.15, p.175-8, 2001.
- PINTO, T.A.; COLLI, C.; ARÊAS, J.A.G. Effect of processing on iron bioavailability of extruded bovine lung. *Food Chemistry*, v.60, p.459-63, 1997.
- POLTRONIERI, F.; ARÊAS, J.A.G.; COLLI, C. Effect of iron bioavailability in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Chemistry*, v.70, p.175-80, 2000.
- PROSKY, L.; ASP, N.G.; SCHWEIZER, T.F.; DEVRIES, J.W.; FURDA, I. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, v.71, p.1017-23, 1988.
- PURROY, J.; SPURR, N.K. Molecular genetics of calcium sensing in bone cells. *Human Molecular Genetics*, v.11, p.2377-84, 2002.
- RASCHKA, L.; DANIEL, H. Mechanisms underlying the effects of inulin-type fructans on calcium absorption in the large intestine of rats. *Bone*, v.37, p.728-35, 2005.
- 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 reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, v.123, p.1939-51, 1993.

RÉMÉSY, C.; LEVRAT, M.A.; GAMET, L.; DEMIGNÉ, C. Cecal fermentations in rats fed oligosaccharides (inulin) are modulated by dietary calcium level. *American Journal of Physiology*, v.264, p.G855-G62, 1993.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G.R.; DELZENNE, N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. *Nutrition Reviews*, v.51, p.137-46, 1993.

ROBERFROID, M. Prebiotics: the concept revisited. *Journal of Nutrition*, v.137 (Suppl.2), p.830S-7S, 2007.

ROBERTS, E.A.; SARKAR, B. Liver as a key organ in the supply, storage, and excretion of copper. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.88 (suppl.), p.851S-4S, 2008.

RODENBURG, W.; KEIJER, J.; KRAMER, E.; VINK.; VAN DER MEER, R.; BOVEE-OUDEHOF, I.M. Impaired barrier function by dietary fructo-oligosaccharides (FOS) in rats is accompanied by increased colonic mitochondrial gene expression. *BMC Genomics*, 2008. *In the press*.

RUDE, R.K. Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.13, p.749-56, 1998.

SANDSTRÖM, B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *British Journal of Nutrition*, v.85, Suppl.2, p.S181-5, 2001.

SANTOS, L. *Bibliografia sobre Deficiência de Micronutrientes no Brasil, 1990-2000: Anemia*. v.2(a). Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde, 2002.

SCHNEEMAN, B.O. Fiber, inulin and oligofructose, similarities and differences. *Journal of Nutrition*, v.129, p.1424S-7, 1999.

SCHOLZ-AHRENS, K.E.; ADE, P.; MASTEN, B.; WEBER, P.; TIMM, W.; ASIL, T.; GLUER, C.C.; SCHREZENMEIR, J. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *Journal of Nutrition*, v.137,

p.838S-46S, 2007.

SCHOLZ-AHRENS, K.E.; SCHREZENMEIR, J. Inulin and oligofructose and mineral metabolism: The evidence from animal trials. *Journal of Nutrition*, v.137, p.2513S-23S, 2007.

SCHWARTZ, R. Magnesium metabolism. In: SIMMONS, D.J. ed. *Nutrition and bone development*. New York: Oxford University Press, 1990. pp. 148-163.

SEIFERT, S.; WATZL, B. Inulin and oligofructose: Review of experimental data on immune modulation. *Journal of Nutrition*, v.137, p.2563S-7S, 2007.

STEEGMANS, M.; ILIAENS, S.; HOEBREGS, H. Enzymatic, spectrophotometric determination of glucose, fructose, sucrose, and inulin/oligofructose in foods. *Journal of AOAC International*, v.87, p.1200-7, 2004.

SOJKA, J.E. Magnesium supplementation and osteoporosis. *Nutrition Reviews*, v.53, p.71-80, 1995.

SZARFARC, S.C. Histórico das políticas públicas para o controle da deficiência de ferro no Brasil, In: BRAGA, J.A.P.; AMÂNCIO, O.M.S.; VITALLE, M.S.S. O ferro e a saúde das populações. 1ª. ed, São Paulo: Roca, 2006, p.200-12.

TAKO, E.; YASUDA, K.; GLAHN, R.P.; WELCH, R.M.; LEI, X.; MILLER, D.D. Dietary inulin upregulates the expression of iron and zinc membrane transporters in intestinal enterocytes in the pig. *FASEB Journal*, v.20, p.lb439, 2006.

TAKO, E.; GLAHN, R.P.; WELCH, R.M.; LEI, X.; YASUDA, K.; MILLER, D.D. Dietary inulin affects the expression of the intestinal enterocyte iron transporters, receptors and storage protein and alters the microbiota in the pig intestine. *British Journal of Nutrition*, v.99, p.472-80, 2008.

TEN BRUGGENCATE, S.J.; BOVEE-ODENHOVEN, I.M.; LETTINK-WISSINK, M.L.; KATAN, M.B.; VAN DER MEER, R. Dietary fructo-oligosaccharides and inulin decrease resistance of rats to *Salmonella*: protective role of calcium. *Gut*, v.53, p.530-5, 2004.

TEN BRUGGENCATE, S.J.; BOVEE-UDENHOVEN, I.M.; LETTINK-WISSINK, M.L.; VAN DER MEER, R. Dietary fructo-oligosaccharides increase intestinal permeability in rats. *Journal of Nutrition*, v.135, p.837-42, 2005.

TROWELL, H.C. Dietary fibre and coronary heart disease. *European Journal of Clinical and Biological Research*, v.17, p.345-9, 1972.

TROWELL, H.C.; SOUTHGATE, D.A.T.; WOLEVER, T.M.S.; LEEDS, A.R.; GASSUL, M.A.; JENKINS, D.J.A. Dietary fibre redefined. *The Lancet*, p.967, 1976.

VAN LOO, J.; COUSSEMENT, P.; DE LEENHEER, L.; HOEBREGS, H.; SMITS, G. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, v.35, p.525-52, 1995.

VILHENA, S.M.C.; CÂMARA, F.L.A.; KAKIHARA, S.T. O cultivo de yacón no Brasil. *Horticultura Brasileira*, v.18, p.5-8, 2000.

WALLANDER, M.L.; LEIBOLD, E.A.; EISENSTEIN, R.S. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochimica and Biophysica Acta*, v.1763, p.668-89, 2006.

WIENK, J.H.; MARX, J.J.M.; LEMMENS, A.G.; BRINK, E.J.; VAN DER MEER, R.; BEYNEN, A.C. Mechanism underlying the inhibitory effect of high calcium carbonate intake on iron bioavailability from ferrous sulphate in anemic rats. *British Journal of Nutrition*, v.75, p.109-20, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Guidelines on food fortification with micronutrients, Geneva: World Health Organization, 2006, Available from: <http://www.who.int>

YAMAGUCHI, M.; YAMAGUCHI, R. Action of zinc on bone metabolism in rats. Increases in alkaline phosphatase activity and DNA content. *Biochemical Pharmacology*, v.35, p.773-7, 1986.

YAMAGUCHI, M. Role of zinc in bone formation and bone resorption. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, v.11, p.119-35, 1998.

YASUDA, K.; RONEKER, K.R.; MILLER, D.D.; WELCH, R.M.; LEI, X.G. Supplemental dietary inulin affects the bioavailability of iron in corn and soybean meal to young pigs. *Journal of Nutrition*, v. 136, p.3033-8, 2006.

YOUNES, H.; COUDRAY, C.; BELLANGER, J.; DEMIGNÉ, C.; RAYSSIGUIER, Y.; RÉMÉSY, C. Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *British Journal of Nutrition*, v.86, p.479-85, 2001.

ZAFAR, T.A.; WEAVER, C.M.; ZHAO, Y.; MARTIN, B.R.; WASTNEY, M.E. Nondigestible oligosaccharides increase calcium absorption and suppress bone resorption in ovariectomized rats. *Journal of Nutrition*, v.134, p.399-402, 2004.

ZHAO, G.; NYMAN, M.; JÖNSSON, J.A. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomedical Chromatography*, v.20, p.674-82, 2006.

ZIMMERMANN, M.B.; HURRELL, R.F. Nutritional iron deficiency. *The Lancet*, v.370, p.511-20, 2007.