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

**AVALIAÇÃO EM LEITÕES DA BIODISPONIBILIDADE DE
FERRO DE DIFERENTES FONTES**

(ferro microencapsulado com carboximetilcelulose sódica,
ferro microencapsulado com alginato, ferro quelado com
metionina e ferro eletrolítico)

MARIA LUCIA COCATO

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Dr.^a Célia Colli

São Paulo
2004

DEDALUS - Acervo - CQ

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Cocato, Maria Lucia

C659a Avaliação em leitões da biodisponibilidade de ferro de diferentes fontes (ferro microencapsulado com carboximetilcelulose sódica, ferro microencapsulado com alginato, ferro quelado com metionina e ferro eletrolítico) / Maria Lucia Cocato. -- São Paulo, 2004.
90p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Colli, Célia

1. Nutrição 2. Minerais : Ciência dos alimentos I. T. II.
Colli, Célia, orientador.

641.1 CDD

MARIA LUCIA COCATO

AVALIAÇÃO EM LEITÕES DA BIODISPONIBILIDADE DE FERRO DE
DIFERENTES FONTES (ferro microencapsulado com polímero de
carboximetilcelulose sódica, ferro microencapsulado com polímero de alginato,
ferro quelado com metionina e ferro eletrolítico)

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Prof^a. Dr^a. Célia Colli
Orientadora/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, de de 2004.

2004

17922

Dedico este trabalho:

À minha mãe, Lúcia ,
que, com sua coragem e força,
me ensinou a jamais desistir,
mesmo quando tudo parecia impossível!

À minha irmã, amiga, “mãezona”, Cida,
por todo carinho e compreensão,
por me proporcionar a chance de
fazer pós-graduação e por compartilhar
a Mariana e a Luísa.

Aos meus irmãos, José Carlos,
Pedro Luiz e Valdecir, por toda
a nossa luta juntos.

À memória da minha irmã Irma e
do meu pai, Pedro.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Célia Colli, por abrir meu horizonte e me mostrar que é possível ir além;

À Dr^a. Maria Inês Ré, do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), por compartilhar tão generosamente seus conhecimentos e por possibilitar minha participação neste trabalho;

Ao Prof. Dr. Messias Alves da Trindade Neto, pelo apoio intelectual e braçal durante o experimento;

Ao Sr. Fernando Fernandes da Fermavi Eletroquímica Ltda pelo suporte financeiro, sem o qual este trabalho não seria possível;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela bolsa concedida;

Ao Instituto de Zootecnia de Nova Odessa – APTA – SAA – SP pelo uso das instalações;

À minha amig**irmã** Raquel Simões Mendes Netto por todos aqueles momentos em que me fez ver que rir ainda é o melhor remédio, e, à nossa companheira de apartamento, Tânia Gonçalves, por termos virado uma família no CRUSP;

À querida Helena Pontes Chiebao, amiga de todas as horas, por me ajudar tanto, em todos os sentidos;

Às amigas do Laboratório : Aline Guimarães, Lílíana Mistura, Andréa Polo Galante, Luciana Setaro e Luciana Bueno, por todas aquelas conversas gostosas pelos corredores e antes das reuniões;

Ao técnico do Instituto de Zootecnia, Luiz Fabiano de Moraes, por tudo o que me ensinou sobre manejo de leitões, e pela amizade e companheirismo desenvolvidos entre nós;

Ao meu Tio atleta Valdomiro P. Cocato, exemplo de garra e determinação;

Ao amigo e técnico Celso B. Teixeira, por sempre ter me incentivado, no atletismo e na pós-graduação;

Ao amigo Luiz Carlos Nascimento, pela presença constante em minha vida;

À querida Walkyria Sigler, por estar sempre perto, mesmo quando está longe;

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Tullia Maria Fillisetti e Beatriz R. Cardenunsi pela amizade e análise de fibras e açúcares;

Ao amigo Eduardo Purgatto por aqueles longos papos nos corredores do Departamento;

Aos técnicos do Laboratório de Informática: Auriluce M. Oliveira, Luis A.V. Gioso e Renato Flamini, por terem me “cedido” um micro;

Às secretárias do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Mônica D. Perussi e Tânia Cacheiro e aos secretários do Curso de Pós-Graduação, Elaine Midori e Jorge A. de Lima, pela extrema paciência;

Aos técnicos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental Luiz C. Silva, Ivanir Pires, Rosa M. Barros e Renato Heidor, pela colaboração;

Às funcionárias e amigas Maria de Lourdes Pedrosa (Lurdinha) e Joana A. Santos (Jô) pela colaboração na limpeza dos materiais;

A todos os colegas do Bloco 14;

A todos aqueles que me ajudaram e que não foram aqui mencionados, muitíssimo OBRIGADA!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES	VIII
RESUMO.....	XI
SUMMARY	XII
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	03
2.1 Ferro	03
2.2 Mecanismos de absorção de ferro.....	03
2.3 Biodisponibilidade de ferro.....	06
2.4 Leitões como modelo animal para estudo da biodisponibilidade de ferro	08
2.5 Anemia ferropriva	09
2.6 Prevalência de anemia no Brasil	10
2.7 Fortificação de alimentos com ferro.....	13
2.8 Compostos de ferro utilizados na fortificação de alimentos.....	15
2.9 Microencapsulação de FeSO ₄	16
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Material	21
4.1.2 Animais	21
4.1.3 Rações.....	22
4.1.4 Material biológico.....	24
4.2 Métodos.....	25
Lavagem de materiais	25
Controle da qualidade da água desionizada.....	25
Pesagem dos animais	25
Preparação das rações.....	26
Análise química das rações.....	27
Umidade	28

Cinzas.....	28
Lipídios	28
Proteína.....	28
Amido e açúcares totais.....	29
Fibras.....	29
Aminoácidos	29
Minerais	29
Ferro	29
Ferro nas amostras de água.....	30
Zinco.....	30
Cobre, cálcio e magnésio	31
Ferro total no fígado	32
Ferro heme no fígado	32
Ferro não-heme no fígado.....	33
4.7 Repleção de hemoglobina em leitões anêmicos.....	33
Fase de depleção (obtenção de leitões anêmicos).....	34
Fase de repleção (recuperação de hemoglobina)	35
Determinação da biodisponibilidade de ferro	36
Análise estatística.....	37
5. RESULTADOS	40
6. DISCUSSÃO.....	52
7. COMENTÁRIOS.....	65
8. CONCLUSÕES.....	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
10. ANEXOS.....	80

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismo de absorção de ferro	5
Figura 2 - Esquema da causalidade da deficiência de ferro e anemia	10
Figura 3 - Coleta de sangue	24
Figura 4 - Pesagem dos leitões	26
Figura 5 - Gaiolas da unidade Digestibilidade/Metabolismo	35
Figura 6 - Representação esquemática do modelo experimental	39
Figura 7 - Absorção de ferro (%) de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ x Ingestão de ferro (mg)	45
Figura 8 - Peso do fígado (g), concentração de ferro total ($\mu\text{g/g}$), ferro heme ($\mu\text{g/g}$) e ferro não-heme ($\mu\text{g/g}$) dos leitões dos grupos-padrão de ferro e dos grupos experimentais	50

Quadro 1- Prevalência de anemia em algumas cidades e estados brasileiros	11
Quadro 2- Principais propriedades dos agentes utilizados na encapsulação de ingredientes alimentares	18
Quadro 3- Porcentagem média de ferro dialisado de ferro microencapsulado no leite (16mg/L) em digestão <i>in vitro</i>	19
Quadro 4- Composição centesimal das rações de depleção e repleção	23
Quadro 5- Relatos na literatura de porcentagem de absorção e de absorção relativa ao FeSO_4 de sulfato ferroso microencapsulado	57
Quadro 6- Relatos na literatura de porcentagem de absorção e de absorção relativa ao FeSO_4 de ferro bisglicina quelato e de ferro eletrolítico	58
Quadro 7- Relatos na literatura da concentração de ferro total ($\mu\text{g/g}$) no fígado de leitões alimentados com rações fortificadas com FeSO_4	63

Tabela 1 - Composição centesimal e mineral da ração base dos suínos	40
Tabela 2 - Concentração de ferro nas rações de repleção. Média e D.P.	41
Tabela 3 - Desempenho dos leitões no período de repleção. Média e D.P.	42
Tabela 4 - Consumo de proteína (g/dia), proteína total ingerida (kg), variação do peso (kg) e Coeficiente de Eficácia Proteica (CEP) dos leitões do grupo experimental. Média e D.P.	43
Tabela 5 - Parâmetros de recuperação de hemoglobina em leitões anêmicos dos grupos-padrão de ferro	44
Tabela 6 - Parâmetros de recuperação de hemoglobina em leitões anêmicos dos grupos experimentais	47
Tabela 7 - Peso corporal (kg), peso do fígado (g), ferro total no fígado ($\mu\text{g/g}$), ferro heme ($\mu\text{g/g}$) e ferro não heme($\mu\text{g/g}$) dos leitões dos grupos-padrão de ferro e do grupo experimental	48
Tabela 8 - Incidência de diarreia nos leitões	51

RESUMO

A biodisponibilidade de ferro de diferentes fontes foi avaliada pelo método de recuperação de hemoglobina em suínos anêmicos. O ensaio teve duração de 13 dias e os grupos foram homogeneizados de acordo com o produto do peso (kg) x hemoglobina (g/dL). As fontes de ferro estudadas foram: ferro microencapsulado com polímero de carboximetilcelulose sódica (NaCMC), ferro microencapsulado com polímero de alginato, ferro quelado com metionina e ferro reduzido eletroliticamente. Com a finalidade de corrigir respostas devidas à variação na ingestão de ferro foram acrescentados três grupos chamados de grupos-padrão, cuja fonte dietética de ferro foi $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. A porcentagem média de absorção de ferro para os grupos experimentais variou de 12,8 (4,3) % (ferro eletrolítico) a 15,1 (3,8) % (ferro alginato), não sendo significativamente diferentes ($P>0,05$). A porcentagem média de absorção relativa ao $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ variou de 89,5 (25,9)% (ferro NaCMC) a 105,9 (60,5)% (ferro quelado com metionina), sem diferenças significativas ($p>0,05$). Também não houve diferença significativa nos índices de conversão alimentar, eficiência alimentar e coeficiente de eficácia proteica (CEP). Não houve diferenças significativas ($p>0,05$) nas concentrações de ferro hepático entre as diferentes fontes estudadas. Nas condições deste ensaio, houve similaridade entre as fontes de ferro testadas quanto à biodisponibilidade. A microencapsulação proporcionou melhor distribuição do produto na mistura quando comparada ao $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

SUMMARY

The iron availability from different sources was evaluated by the hemoglobin regeneration method in anemic pigs. The assay took 13 days and the animals were selected according to the weight (kg) x hemoglobina (g/dL) product. The iron sources studied were: microencapsulated iron with sodium carboximetilcelulose polymer (NaCMC), microencapsulated iron with alginato polymer, metionin-quelated iron and electrolytically reduced iron. To correct answers due to iron ingestion variation three control groups were added, whose dietary iron source was $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The average percentage of iron absorption for the experimental groups ranged from 12,8 (4,3) % (electrolytic iron) to 15,1 (3,8) % (iron alginato), without significant differences ($p > 0,05$). The average percentage of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ relative absorption ranged from 89,5 (25,9)% (NaCMC iron) to 105,9 (60,5)% (metionin quelated-iron), without significant differences ($p > 0,05$). Also it did not have significant difference in the alimentary conversion and efficiency indexes and proteic effectiveness coefficient (CEP). No significant differences ($p > 0,05$) were found in the hepatic iron concentrations among the different studied sources. Based on this assay's conditions, there were similarities among the tested iron sources regarding to their bioavailability. Microencapsulation provided better distribution of the product in the mixture when compared to the $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

1. INTRODUÇÃO

A deficiência de ferro é o maior problema de saúde pública dos países em desenvolvimento, afetando acima de 50% das crianças e mulheres em idade fértil nas populações pobres da África, Ásia e América Latina (HURRELL *et al*, 2002).

A mais severa forma de deficiência de ferro é a anemia ferropriva, sendo importante causa de deficiência cognitiva em bebês e crianças pequenas. Tais danos podem ser irreversíveis, até mesmo após a correção da deficiência. (LOZOFF, *et al*, 1987; LOZOFF *et al*, 1991). Esses dados são preocupantes, principalmente considerando que no Brasil vários estudos com crianças têm demonstrado a alta prevalência de anemia neste grupo populacional.

Segundo COOK & REUSSER (1983) a fortificação de alimentos é a melhor estratégia para combater a anemia por deficiência de ferro por alcançar todos os segmentos da população e não requerer a cooperação do indivíduo. Há, porém, muitas dificuldades nos processos técnicos de fortificação dos alimentos com o ferro. A maior dificuldade é a identificação de uma forma de ferro que seja adequadamente absorvida e que não altere a aparência ou o sabor do alimento.

Tendo em vista a baixa biodisponibilidade de ferro ou alterações nas características sensoriais provocadas nos alimentos pelas fontes de ferro normalmente utilizadas na sua fortificação, vários países têm buscado alternativas para a resolução deste problema. No Brasil, o Instituto de Pesquisas Tecnológicas da Universidade de São Paulo (IPT), em conjunto com o Laboratório de Nutrição (Minerais) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, desenvolveu uma tecnologia nacional para a microencapsulação do ferro, com o objetivo de resolver o problema da alta reatividade deste mineral. A técnica consiste em envolver os compostos de ferro com cápsulas minúsculas, tornando-os menos reativos com o meio ao qual serão adicionados.

Estudos *in vitro* conduzidos por SANTOS (2001) demonstraram a excelente disponibilidade destes compostos quando adicionados ao leite, um meio complexo e de grande efeito inibidor da sua dialisabilidade. A proposta do presente trabalho foi avaliar a biodisponibilidade *in vivo* do Ferro microencapsulado com carboximetilcelulose e do Ferro microencapsulado com Alginato, por terem apresentado a maior dialisabilidade *in vitro* (13% e 3,7% de dialisabilidade, respectivamente), do ferro quelado com metionina e do ferro eletrolítico, utilizando como modelo animal leitões recém-desmamados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ferro

O ferro é o segundo metal mais abundante na crosta terrestre e seu estado de oxidação pode variar de Fe^{6+} a Fe^{2-} (LEE e CLYDESDALE, 1979; FAIRWEATHER-TAIT, 1995). A forma férrica Fe^{3+} e sua forma reduzida Fe^{2+} são os únicos estados estáveis em meio aquoso e, assim, os únicos estados que ocorrem naturalmente nos alimentos (LEE e CLYDESDALE, 1979). A necessidade nutricional de ferro nos organismos vivos é derivada do papel central que este mineral desempenha no metabolismo energético das células. O ferro é um metal de transição e pode participar nos processos de óxi-redução devido a reversibilidade nos seus estados de valência, tais como redução por um substrato orgânico e re-oxidação pelo oxigênio (FAIRWEATHER-TAIT, 1995).

A maior parte do ferro corporal, aproximadamente 60 a 70%, está presente na hemoglobina, 10% está presente na mioglobina e citocromos e o restante, 20 a 30%, está estocado como ferritina e hemossiderina nos hepatócitos e no reticuloendotelial (WADDELL, 1974; CONRAD *et al*, 1999). As proteínas contendo ferro têm papel essencial no transporte de oxigênio, na produção de ATP, na síntese de ácidos nucléicos e outras proteínas (CROSBY, 1979).

2.2 Mecanismos de absorção de ferro

O ferro da dieta pode existir em duas formas: ferro-heme, que é derivado da hemoglobina e mioglobina e ferro não-heme, presente principalmente nos vegetais. O intestino é o maior sítio de regulação da absorção de ferro, controlando a sua captação através da borda em escova da célula intestinal e sua liberação para a circulação através da membrana basolateral (LIEU *et al*, 2001).

A absorção intestinal de ferro-heme e de ferro não-heme ocorre por dois caminhos diferentes.

O ferro heme é absorvido como uma metaloporfirina intacta (Figura 1). Uma vez dentro da célula o ferro-heme é degradado pela enzima heme-oxigenase e ocorre a liberação de ferro inorgânico (QIAN *et al*, 1995; BENITO & MILLER, 1998; LIEU *et al*, 2001; CONRAD & UMBREIT, 2002).

No lúmen intestinal, o ferro não-heme existe nas valências Fe^{3+} ou Fe^{2+} , sendo o Fe^{2+} mais solúvel que o Fe^{3+} em pH acima de 3. Grande quantidade de Fe^{2+} permanece solúvel até mesmo em pH 7 (CONRAD *et al*, 1999). No lúmen intestinal, uma parcela significativa do Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} e transportado para dentro da célula por um transportador de ferro que existe na superfície celular, chamado Nramp2 (proteína macrofágica associada à resistência natural). Por outro lado, tanto o Fe^{3+} quanto o Fe^{2+} , também podem entrar nos enterócitos por um caminho mediado pelo complexo paraferitina, consistindo de beta-integrina, mobilferrina e flavina mono-oxigenase. Uma vez dentro do enterócito, o ferro inorgânico originado tanto do ferro-heme como do ferro não-heme da dieta, pode ser estocado como ferritina ou ser liberado para a circulação sanguínea através da transferrina (Figura 1) (LIEU *et al*, 2001).

Apesar da quantidade de ferro ligada à transferrina ser menor que 1% do estoque de ferro corporal (aproximadamente 4 mg) este é o mais significativo *pool* de ferro no organismo e tem uma elevada renovação, aproximadamente 25 mg/dia. Do ferro ligado à transferrina, 80% é transportado para a medula óssea para síntese de hemoglobina (CONRAD *et al*, 1999). Deste local, os reticulócitos são liberados para a circulação sanguínea e, dentro de um dia, se desenvolvem em enterócitos maduros que circulam no sangue por, aproximadamente, 120 dias.

Uma das principais características no metabolismo do ferro em humanos é a sua habilidade para manter adequadas as concentrações de ferro corporal, a despeito das diferenças entre as necessidades fisiológicas e o fornecimento de ferro dietético. Este mecanismo adaptativo reflete não somente a

importância do ferro no transporte de oxigênio, mas também o potencial tóxico do ferro quando a concentração corporal excede a capacidade das proteínas responsáveis por seu transporte e estoque (COOK, 1990).

Figura 1: Mecanismos de absorção do ferro (Adaptado de LIEU *et al*, 2001).

2.3 Biodisponibilidade de ferro

Não há uma definição universalmente aceita de biodisponibilidade. O conceito mais utilizado é o que define a biodisponibilidade como sendo a proporção do nutriente em um alimento ou dieta que é disponível para absorção em uma forma que pode ser fisiologicamente utilizada pelo organismo (BENITO & MILLER ,1998).

Vários fatores podem afetar a biodisponibilidade do ferro dietético. A absorção do ferro-heme é pouco influenciada pelos componentes da dieta, possivelmente em função de seu mecanismo de absorção. Entretanto, alguns fatores diminuem a sua absorção, a exemplo do teor de cálcio da dieta (HALLBERG *et al*, 1991) e do processamento do alimento (tempo e temperatura) (COOK, 1983; HALLBERG, 2001). Já, para o ferro não-heme, além do estado nutricional em ferro do indivíduo, fatores promotores como ácido ascórbico , carnes e peixes e fatores inibidores como taninos, fitatos, fosfatos, oxalato, leite e fibras, reconhecidamente, alteram a sua absorção (HALLBERG, 1981; COOK, 1983; HALLBERG, 2001).

A proporção de ferro-heme normalmente absorvida da dieta é alta em comparação com a de ferro não-heme. Um indivíduo que esteja com seus estoques depletados pode absorver, aproximadamente, 35% do ferro heme quando ingerido como carne. Se, ao contrário, seus estoques estiveram repletos, a absorção cai para 25%. O pool de ferro não-heme, por sua vez, consiste de ferro de vegetais, grãos, ovos e também de ferro não-heme presente nas carnes, aves e peixes, além de suplementos de ferro presentes nos alimentos. Desta forma, sua absorção pode variar de 5-15%, dependendo da quantidade de fatores promotores e inibidores da sua absorção presentes na dieta (MONSEN, 1978).

Numerosas técnicas têm sido desenvolvidas para determinar com precisão a quantidade de micronutrientes presente num determinado alimento e a sua disponibilidade quando este alimento é consumido em dietas mistas. As

técnicas de balanço (Balanço Químico; Balanço de Radioisótopos; Balanço de Isótopos Estáveis) têm sido frequentemente usadas. Os estudos de balanço representam a diferença entre a ingestão e a excreção de minerais (VAN CAMPEN & GLAHN, 1999).

Outras técnicas utilizam a concentração tecidual do mineral ou indicadores indiretos da concentração de minerais no organismo. Para o ferro têm sido utilizados como indicadores: ferro sérico ou plasmático; ferritina sérica; receptores de transferrina sérica (COOK *et al*, 1969; HALLBERG, 1981; VAN CAMPEN & GLAHN, 1999).

Métodos *in vitro* para avaliação da biodisponibilidade de ferro têm sido bastante utilizados. Têm como vantagem a execução simples e barata, sendo uma boa alternativa para a estimativa da fração do mineral que está disponível para absorção (NARASINGA RAO, 1994). Tais métodos são baseados em digestão enzimática simulada de um alimento, seguida da estimativa de ferro solúvel ou dialisável (LATUNDE-DADA *et al*, 1998). O método *in vitro* mais utilizado para a determinação da dialisabilidade do ferro é o proposto por MILLER *et al* (1981). Neste método, o alimento é primeiro acidificado para pH2 e submetido a uma digestão com pepsina, simulando o estágio gástrico da digestão. Em seguida, após elevação do pH, acrescenta-se pancreatina e sais biliares, simulando o estágio intestinal. Os íons do elemento que está sendo analisado se difundirão por uma membrana semi-permeável colocada no meio que está sendo submetido à digestão, e a quantidade difundida representará a dialisabilidade do elemento, ou seja, uma estimativa da quantidade do elemento disponível para absorção.

Dos métodos *in vivo*, empregando modelos animais, utilizados para a estimativa da biodisponibilidade de ferro, a técnica de repleção de hemoglobina, proposta por FRITZ *et al* (1975) tem sido muito utilizada. Nesta técnica, induz-se anemia aos animais pelo fornecimento de uma dieta pobre em ferro por um determinado período, chamado período de depleção. Em seguida são fornecidas dietas contendo ferro, cujas diferenças caracterizam-se

pela fonte de ferro, devendo ser utilizada uma fonte controle. Este período é denominado período de repleção. A repleção de hemoglobina pelo ferro da fonte teste é comparada à repleção do grupo controle e os resultados são expressos como Valor Biológico Relativo. Este procedimento é simples e de relativamente curta duração e não requer equipamentos caros ou especializados (VAN CAMPEN & GLAHN, 1999).

Embora todas as técnicas acima citadas tenham limitações, todas permitem avaliar a biodisponibilidade de micronutrientes, desde que seu alcance seja cuidadosamente interpretado.

2.4 Leitões como modelo animal para estudo da biodisponibilidade de ferro

Em função da similaridade fisiológica com os seres humanos, leitões têm sido utilizados como modelo para pesquisa em várias áreas da medicina: fisiologia cardiovascular e renal, obesidade, toxicologia, imunologia, diabetes e metabolismo de drogas, entre outras (BUSTAD and McCLELLAN, 1966; VREMEC *et al*, 1997; TASSANI *et al*, 2002; ROSS *et al*, 2003;). A utilização de leitões para estudos da biodisponibilidade de ferro é recente. Provavelmente, MILLER *et al* (1981), tenha sido o primeiro pesquisador a utilizar este modelo em ensaios de repleção de hemoglobina. O uso de leitões nestes ensaios tem algumas vantagens. Ao contrário de outros animais utilizados em estudos de biodisponibilidade, leitões nascem com baixo estoque de ferro corporal - aproximadamente 50mg - e, em função do baixo conteúdo de ferro no leite da mãe, tornam-se anêmicos em curto tempo (VENN *et al*, 1947). Leitões criados em regime de confinamento total, sem acesso ao solo e contato com as fezes, devem receber injeção de 100 a 200 mg de ferro, normalmente na forma de ferro dextrana, nos primeiros dias de vida, para prevenir anemia. Desta forma, para torná-los anêmicos, basta retirar ou diminuir a quantidade de ferro a eles ministrada (PERKS *et al*, 1996).

Suínos e humanos têm algumas características muito semelhantes. Ambos são onívoros e têm peso corporal similar (5-6 kg) quando comparados no estágio de lactação. Há, também, similaridades anatômicas e fisiológicas do trato gastrointestinal (PERKS *et al*, 1996) , a exemplo da atividade das enzimas digestivas, principalmente no primeiro estágio de vida (MILLER & ULLREY, 1987; MOUGHAN *et al*, 1992).

Além desses fatores, há vantagens logísticas na utilização de leitões em pesquisa de nutrição humana, entre elas: um número grande de descendentes; a disponibilidade de linhagens geneticamente definidas; um ciclo de vida relativamente curto; rápida razão de crescimento; fácil adaptação ao confinamento e à gaiolas de metabolismo (MOUGHAN *et al*, 1992). Outra vantagem é a facilidade na coleta de amostras de sangue, que pode ser feita com o animal consciente.

2.5 Anemia ferropriva

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO/UNICEF, 1995) a anemia é definida como a condição na qual o conteúdo de hemoglobina no sangue é menor do que o normal como resultado da deficiência de um ou mais nutrientes essenciais (usualmente ferro, menos frequentemente folato ou vitamina B12).

A anemia por deficiência de ferro (anemia ferropriva) é a forma mais comumente encontrada nas populações anêmicas e vários fatores podem ser responsáveis pela sua etiologia : aumento das perdas de ferro; aumento das necessidades conforme as diferentes fases de vida; diminuição da absorção intestinal em função da baixa biodisponibilidade da fonte de ferro; consumo alimentar inadequado (MONTEIRO *et al*, 1996). Segundo COOK (1983), a alta prevalência da deficiência de ferro em muitos países em desenvolvimento deve-se à falta de consumo de ferro heme na dieta, principalmente em função de

restrições econômicas sofridas por grande parte da população, impedindo seu acesso a um alimento mais caro, como a carne.

A Figura 2 ilustra as várias causas do desenvolvimento da anemia por deficiência de ferro.

Figura 2: Esquema da causalidade da deficiência de ferro e anemia (Adaptado de WHO/UNICEF, 1995)

2.6 Prevalência de anemia no Brasil

A prevalência de anemia nas crianças brasileiras tem mostrado índices alarmantes. Fisberg *et al* (2001) estudando a prevalência de anemia ferropriva em 2.223 crianças de 10 capitais brasileiras, observaram que 29,5 a 49% das crianças abaixo dos 5 anos de idade, apresentavam valores de hemoglobina inferiores a 11g/dl e que 19,5% apresentavam anemia grave, com valores de hemoglobina inferiores a 9,5 g/dl. A prevalência nacional foi de 54%, sendo que a região sudeste apresentou 53,7%, a região sul 52,7%, nordeste 44,5% e norte 34,35%.

O Quadro 1, abaixo, mostra a prevalência de anemia em algumas cidades e estados brasileiros.

Quadro 1: Prevalência de anemia em algumas cidades e estados brasileiros

Fonte	Local	n	Idade	Prevalência
Salzano <i>et al</i> , 1985	Recife (PE)	1306	6-60 meses	41-77% (< 2 anos)
Monteiro & Szarfarc, 1987	São Paulo (SP)	912	< 60 meses	50% (6 -24 meses)
Sichieri, 1987	São Paulo (SP)	307	< 60 meses	57% (6-24 meses) 26% (>24 meses) 31% (< 6 meses)
Cardoso <i>et al</i> , 1992	Candeias (RO)	1068	Todas as Idades	70% (6-12 meses) 38,4% (1-6 anos)
Torres <i>et al</i> , 1994	Estado de SP	2992	6-23 meses	59,1%
Stefanini <i>et al</i> , 1995	Osasco (SP)	1033	6-10 anos	49,4% (6-8 anos) 60,1% (8-10 anos)
Neuman <i>et al</i> , 2000	Criciúma (SC)	476	< 3 anos	60,4%
Monteiro <i>et al</i> , 2000	São Paulo (SP)	1280	0-59 meses	46,9%
Soares <i>et al</i> , 2000	Fortaleza (CE)	110	< 1 ano	60%
Silva <i>et al</i> , 2001	Porto Alegre (RS)	557	0-36 meses	47,8%
Oliveira <i>et al</i> , 2002	Estado da Paraíba	1287	0-60 meses	36,4%
Brunken <i>et al</i> , 2002	Cuiabá (MT)	271	< 36 meses	63%
Miranda <i>et al</i> , 2003	Viçosa (MG)	171	12-60 meses	63,2%
Alberico <i>et al</i> , 2003	Rio de Janeiro(RJ)	500	0-12 meses	43% (0-6 meses) 75% (6-12 meses)

Segundo SZARFARC & SOUZA (1997), um dos principais fatores relacionados com a alta incidência de anemia na população brasileira é o tipo de dieta consumida. Além da dieta brasileira ser pobre em ferro biodisponível, a carne e o feijão, alimentos responsáveis pela quase totalidade da ingestão de ferro na dieta brasileira, têm sido menos consumidos pelos brasileiros nas últimas décadas. Desta forma, torna-se evidente a necessidade de adoção de medidas efetivas para o tratamento e prevenção da anemia ferropriva no Brasil. A Organização Mundial de Saúde propõe algumas estratégias de intervenção no combate das anemias nutricionais: orientação nutricional, suplementação medicamentosa com sais de ferro e fortificação de alimentos (DeMAYER, 1989).

Recentemente, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2002), através da Resolução RDC nº 344 de 13 de dezembro de 2002 (D.O.U. de 18/12/2002), tornou obrigatória, no Brasil, a fortificação das farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico, nas concentrações de 4,2 mgFe/100 g de farinha e de 150 µg ácido fólico/100 g de farinha, para combater a anemia e outras deficiências. A escolha destas farinhas deu-se em função de serem largamente consumidas pela população brasileira. As fontes de ferro indicadas na Resolução para a fortificação são: FeSO_4 desidratado, fumarato ferroso, ferro reduzido, ferro eletrolítico, EDTA de ferro e sódio (NaFeEDTA) e bisglicina de ferro quelato. A Resolução orienta que outras fontes de ferro poderão ser usadas, desde que a biodisponibilidade não seja inferior à dos compostos listados. A escolha da fonte de ferro, segundo a resolução, é de responsabilidade das empresas, que devem garantir a estabilidade dos compostos nas farinhas de trigo e milho dentro do prazo de validade das mesmas.

2.7 Fortificação de alimentos com ferro

Há duas principais estratégias para combater a anemia por deficiência de ferro: a suplementação de ferro via medicamentos e a fortificação de alimentos com sais de ferro (COOK e REUSSER, 1983).

A suplementação tem a vantagem de produzir mudanças rápidas no estado nutricional em ferro e de ser direcionada aos segmentos populacionais com maior necessidade. Porém, sua efetividade é limitada em função dos efeitos colaterais produzidos no trato gastrointestinal, dificultando a efetiva participação dos indivíduos (COOK e REUSSER, 1983).

Desta forma, a fortificação é considerada a melhor forma de combater a anemia por deficiência de ferro, por alcançar todos os segmentos da população e não requerer a cooperação do indivíduo (BJÖRN-RASMUSSEN *et al*, 1976; COOK e REUSSER, 1983; YIP, 2002;). A proposta da fortificação, primariamente, não é tratar, mas sim, prevenir a anemia por deficiência de ferro. Quando grande parte da população apresenta anemia grave, deve-se fazer a suplementação paralelamente à fortificação (HALLBERG *et al*, 1995) já que, após a introdução do ferro na dieta via fortificação de um alimento, pode ser necessário um longo período de observação até que se detecte uma diminuição na prevalência de anemia na população alvo (BJÖRN-RASMUSSEN *et al*, 1976).

A fortificação com ferro é mais difícil tecnicamente do que a fortificação com outros nutrientes, porque as formas de ferro com boa solubilidade e, portanto, maior biodisponibilidade, como FeSO_4 , são quimicamente reativas e produzem alterações organolépticas indesejáveis quando adicionadas aos alimentos (COOK e REUSSER, 1983). Por outro lado, compostos de ferro inerte (ex: ferro reduzido) ou sais de ferro insolúveis (ex: fosfato ferroso), que não produzem tais alterações, têm baixa absorção e pouco efeito no estado nutricional em ferro do indivíduo (WADDELL, 1974; COOK e REUSSER, 1983; FORBES *et al*,

1989; JACKSON e LEE, 1991). Desta forma, a escolha do melhor composto de ferro a ser adicionado ao alimento é um passo essencial no programa de fortificação. Segundo ZOLLER *et al* (1980), os principais critérios a serem observados com relação à fonte de ferro escolhida são:

- não alterar a coloração do veículo após longos períodos de estoque e transporte sob condições extremas de umidade e temperatura;
- não adicionar nenhum sabor ao veículo;
- ter estabilidade, ou seja, a forma de ferro usada tem que permanecer nutricionalmente disponível após o processamento e após longos períodos de estoque;
- sua adição ao veículo deve ser economicamente viável.

Quanto à escolha do veículo a ser utilizado, algumas considerações devem ser feitas: o alimento deve ser consumido por uma elevada proporção da população, com mínima variação regional; seu consumo não deve estar relacionado à condição sócio-econômica do indivíduo; deve ter baixo potencial para ingestão excessiva; deve fazer parte de todas as refeições (ZOLLER *et al*, 1980; COOK e REUSSER, 1983).

Para quantificar a eficácia do programa de fortificação de alimentos utilizado nos Estados Unidos, BERNER *et al* (2001), avaliaram a contribuição dos alimentos fortificados na ingestão dos micronutrientes e concluíram que a fortificação aumentou, substancialmente, a ingestão de todos os nutrientes examinados em todas as faixas etárias estudadas, mas principalmente em crianças e que, em numerosos casos, foi responsável por 25% da ingestão recomendada pelas RDA's.

De acordo com MEHANSHO (2002) e YIP (2002), o sucesso no programa de fortificação de alimentos depende da integração de múltiplos elementos chave, que incluem: identificação da deficiência entre os grupos alvo; desenvolvimento de tecnologia para a fortificação; avaliação do efeito da fortificação na melhora do estado nutricional em ferro; manufatura e distribuição

dos produtos e educação dos consumidores sobre os benefícios dos produtos fortificados. Os mesmos autores propuseram o estabelecimento de uma aliança estratégica entre comunidade científica, governo, agências internacionais, organizações não-governamentais e indústria, o que não só beneficiaria todas as partes envolvidas, mas também tornaria sustentável o programa de fortificação.

2.8 Compostos de ferro utilizados na fortificação de alimentos

Segundo BOCCIO *et al* (1997), os compostos de ferro mais comumente utilizados na fortificação de alimentos podem ser classificados em três grupos, de acordo com a sua solubilidade:

- Grupo 1 – compostos fortemente solúveis em água (sulfato ferroso, gluconato ferroso, lactato ferroso). Em função da alta solubilidade podem tornar o ferro altamente biodisponível, mas têm como desvantagem a interação do ferro com os alimentos fortificados, causando alterações organolépticas indesejáveis.
- Grupo 2 – compostos fracamente solúveis em água ou solúveis em ácidos diluídos (fumarato ferroso, succinato ferroso). Têm boa solubilidade em ácidos diluídos e, assim, boa disponibilidade de ferro, porém, em função da baixa solubilidade na água, só podem ser usados em alimentos desidratados.
- Grupo 3 – compostos insolúveis em água ou fracamente solúveis em ácidos diluídos (ortofosfato férrico, pirofosfato férrico, ferro elementar). Como têm baixa solubilidade, não alteram as propriedades sensoriais ou o valor nutricional dos alimentos, mas como desvantagem possuem baixa biodisponibilidade.

Além destas fontes, o ferro quelado com aminoácidos é uma outra forma de ferro que tem sido largamente utilizada na fortificação de alimentos. Estudos conduzidos no Brasil (TORRES *et al*, 1996; FISBERG, 1996; FISBERG *et al*, 2003; TUMA *et al*, 2003) têm demonstrado a eficácia desta fonte de ferro na recuperação dos quadros de anemia nos grupos estudados.

O composto de ferro ideal para a fortificação de alimentos deve possuir alta solubilidade e, assim, alta biodisponibilidade, não diminuir, por processo de oxidação, o valor nutricional do veículo onde foi adicionado, não alterar suas propriedades sensoriais, poder ser usado tanto em alimentos líquidos como em sólidos, ser resistente aos processos tecnológicos, ser de baixo custo e acessível à toda população (LEE e CLYDESDALE, 1979; BOCCIO *et al*, 1997).

Um composto com todas estas características era desconhecido até pouco tempo atrás. Porém, com o advento do processo de microencapsulação de FeSO_4 , esta possibilidade tornou-se promissora.

2.9 Microencapsulação de FeSO_4

A microencapsulação é definida com uma tecnologia de acondicionamento em miniatura de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas seladas que podem liberar seu conteúdo a uma razão controlada sob condições específicas (SPARKS, 1981; DZIEZAK, 1988). Esta técnica começou a ser utilizada em 1954 para a fabricação de papéis de cópia sem carbono (DZIEZAK, 1988) e, a partir de então, indústrias nas áreas da produção de fármacos, pesticidas e herbicidas também passaram a utilizar a microencapsulação em muitos de seus produtos (SPARKS, 1981).

Na indústria de alimentos, a microencapsulação tem sido aplicada por inúmeras razões: para reduzir a reatividade de compostos adicionados aos alimentos (ex: acidulantes; ácido ascórbico; vitaminas e minerais); diminuir a evaporação; promover fácil manuseamento dos compostos; controlar a razão de liberação dos compostos; mascarar o sabor; diluir o material quando ele é

usado em pouquíssima quantidade e se deseja alcançar uma dispersão uniforme do mesmo no alimento onde foi adicionado (BALASSA e FANGER, 1971; SHAHIDI e HAN, 1993).

A técnica de microencapsulação mais comumente utilizada na indústria de alimentos é a técnica de *Spray Drying*. É um dos mais antigos métodos de encapsulação e envolve três passos básicos: 1) preparação da dispersão ou emulsão a ser processada; 2) homogeneização da dispersão, 3) atomização da massa dentro da câmara de secagem (BALASSA e FANGER, 1971; DZIEZAK, 1988).

O material a ser atomizado é preparado pela dispersão do composto que se deseja encapsular dentro de uma solução polimérica na qual é imiscível. A atomização se processa em meio aquecido e as partículas a serem encapsuladas permanecem no meio gasoso, assumindo uma forma esférica, com o polímero recobrindo a fase gasosa. (DZIEZAK, 1988).

Os materiais encapsulantes podem ser selecionados de uma grande variedade de polímeros naturais ou sintéticos, dependendo do material a ser encapsulado e das características finais da microcápsula que se deseja obter (SHAHIDI e HAN, 1993). Um encapsulante ideal deve ter como propriedades principais: boa propriedade reológica e fácil manipulação durante o processo de encapsulação; habilidade para dispersar ou emulsificar o material ativo e estabilizar a emulsão produzida; não reagir com o material a ser encapsulado durante o processamento ou estoque prolongado; providenciar máxima proteção ao material ativo contra condições ambientais; ter solubilidade adequada para a liberação do material ativo (SHAHIDI e HAN, 1993).

O quadro 2 ilustra os agentes mais utilizados para a encapsulação de ingredientes alimentares e suas principais propriedades:

Quadro 2: Principais propriedades dos agentes utilizados na encapsulação de ingredientes alimentares (SHAHIDI e HAN, 1993; RÉ, 2000)

Agente	Exemplos	Propriedades
Carboidrato	Amido, maltodextrina, dextrana, ciclodextrinas	Habilidade de absorver voláteis ou retê-los tenazmente durante o processo de secagem, sendo importante na encapsulação de aromas
Celulose	Carboximetilcelulose, metilcelulose, etilcelulose	Hidratação e capacidade de formação de gel na superfície das partículas
Gomas	Goma acácia, agar, alginato de sódio, carragena	Polímeros de cadeia longa que se dissolvem ou se dispersam na água, tendo um efeito espessante
Lipídio	Parafina, ácido triesteárico, mono e diglicerídios, óleos, gorduras	Resistentes à difusão da água
Proteína	Glúten, caseína, gelatina, albumina, peptídios	Formação de géis termicamente reversíveis

No Brasil, o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), é pioneiro no desenvolvimento da tecnologia nacional para a microencapsulação de FeSO_4 . Em parceria com o Laboratório de Nutrição (Minerais) do Departamento de Alimentos da Universidade de São Paulo, várias formulações foram testadas em relação ao material encapsulante e à proporção entre o agente encapsulante e o FeSO_4 . Os materiais encapsulantes utilizados foram os derivados de ácido poliacrílico (eudragite NE30D e RS100), os derivados de celulose (carboximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, metilcelulose), quitosana e alginato (RÉ, 2000).

Dentre esses, apenas carboximetilcelulose de sódio (NaCMC), eudragite RS100, quitosana e alginato puderam ser introduzidas nas soluções de FeSO_4 , em função da grande reatividade do ferro em solução. Para as demais ocorria precipitação do polímero no meio aquoso (RÉ, 2000).

Após obtenção dos melhores compostos microencapsulados, avaliou-se a sua disponibilidade *in vitro* (SANTOS, 2001), por meio do ensaio de dialisabilidade, utilizando a técnica da digestão *in vitro* completa sugerida por MILLER *et al* (1981).

Os compostos avaliados e a % de dialisabilidade estão descritos no quadro 3.

Quadro 3: Porcentagem média de ferro dialisado de ferro microencapsulado no leite (16mg/L) em digestão *in vitro* (SANTOS, 2001; RÉ, 2003).

Composto	% Fe dialisado
FeSO ₄ + NaCMC (5:1)	2,4
FeSO ₄ + NaCMC + sureteric (10:1)	3,1
FeSO ₄ + NaCMC (1:1) – 170°C*	2,6
FeSO ₄ + NaCMC (1:1) - 150 °C*	11,9
FeSO ₄ + NaCMC + ácido tartárico	3,5
FeSO ₄ + NaCMC + RS100	3,1
FeSO ₄ + etilcelulose (1:1)	3,1
FeSO ₄ + Alginato 1%	3,2
FeSO ₄ + Quitosana 0,5%	2,7
FeSO ₄ + Alginato 8%	3,7
FeSO ₄ comercial	2,2
FeSO ₄ + ácido ascórbico	2,5

*Os resultados obtidos com temperaturas diferentes na obtenção dos compostos microencapsulados mostraram que a velocidade de formação do filme polimérico está intimamente ligada à evaporação do solvente. Quanto menor a temperatura, mais lentamente é formada a membrana na superfície das micropartículas e menor a porosidade da mesma (RÉ, 2000).

No trabalho atual, com o objetivo de colher mais informações acerca dos compostos que apresentaram melhor dialisabilidade *in vitro*, avaliou-se a biodisponibilidade *in vivo*, utilizando leitões como modelo animal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Determinar em leitões anêmicos a biodisponibilidade de compostos de ferro microencapsulado comparando-a com a de ferro quelado com metionina e ferro reduzido eletroliticamente

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a porcentagem de absorção e de absorção relativa ao FeSO_4 dos compostos de ferro de diferentes fontes
- ✓ Verificar em leitões os efeitos gastrintestinais dos diferentes compostos de ferro

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

As microcápsulas de ferro foram preparadas pelo Laboratório de Caracterização de Partículas do Agrupamento de Processos Químicos, no Instituto de Pesquisas Tecnológicas da Universidade de São Paulo (IPT), pelo método *Spray drying*. O FeSO_4 foi microencapsulado com polímero de carboximetilcelulose sódica (NaCMC) e com polímero de alginato.

O ferro eletrolítico e o ferro quelado com metionina foram fornecidos pela empresa Fermavi Eletroquímica S/A.

4.1.2 Animais

Foram utilizados sessenta leitões de linhagem geneticamente definida, machos castrados e fêmeas, recém-desmamados, mestiços, com 21 dias de idade, pesando em média $6,70 \pm 1,01$ kg provenientes da Granja Kager da cidade de Holambra, estado de São Paulo, fornecedora regular de leitões para o Instituto de Zootecnia de Nova Odessa - APTA – SAA – SP, local onde foi conduzido o experimento.

4.1.3 Rações

Ração de Depleção

A ração de depleção, à base de milho e leite em pó desnatado, foi preparada segundo a National Research Council (NRC, 1998) para suínos em crescimento (QUADRO 1). Por se tratar de ração onde não foi adicionada a fonte de ferro, os ingredientes foram previamente analisados para determinação do conteúdo em ferro, evitando possíveis contaminantes.

Rações de Repleção

Foram formuladas 7 rações de repleção, tendo como base a mesma ração utilizada no período de depleção. Os grupos-padrão tiveram como fonte de ferro $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e, para os grupos experimentais, as fontes de ferro foram: microcápsulas de FeSO_4 com carboximetilcelulose e de FeSO_4 com alginato, ferro quelado com metionina e ferro eletrolítico.

Quadro 4: Composição centesimal das rações de depleção e repleção (NRC, 1998).

Ingredientes	%
Milho	58,11
Leite em pó desnatado	40,10
Cloreto de colina	0,08
Fosfato bicálcico	0,49
Carbonato de cálcio	0,42
Sal	0,20
L-triptofano	0,02
L-lisina	0,07
Pré-Mix vitamínico	0,50
MINERAIS (g/100kg ração)	
ZnO	13,7
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,4
MnSO ₄ .H ₂ O	1,2
COMPOSIÇÃO CALCULADA	
Energia metabolizável (kcal/kg)	3382
Proteína bruta (%)	18,13
Cálcio (%)	0,80
Fósforo total (%)	0,65
Fósforo disponível (%)	0,51
Lisina digestível (%)	1,19
Metionina+cistina digestível (%)	0,73
Triptofano digestível (%)	0,22
Treonina digestível (%)	0,76

* Pré-Mix vitamínico (Composição/kg do produto): Vitamina A (2.000.000 UI); Vitamina D3 (500.000 UI); Vitamina E (2.500 mg); Vitamina K3 (125 mg); Vitamina B1 (375 mg); Vitamina B2 (1250 mg); Vitamina B6 (500 mg); Vitamina B12 (5.000 mg); Niacina (6.250 mg); Pantotenato de Cálcio (4.000 mg); Ácido Fólico (200 mg); Biotina (12,5 mg); Selênio (80 mg).

4.1.4 Material Biológico

Sangue

O sangue foi coletado com punção na veia jugular, na região do pescoço do animal, em seringas de 10 ml com agulhas de 0,7x25mm e, cuidadosamente, transferido para tubos contendo K3EDTA como solução anti-coagulante. O material foi mantido sob refrigeração, sem agitação, até análise da hemoglobina.

A concentração de hemoglobina foi determinada no Laboratório Zoológica de Campinas (SP), em duplicata, no aparelho Hemoglobinômetro CELM®, equipado com colorímetro automático, pelo método da cianometa-hemoglobina (DRABKIN & AUSTIN, 1935), utilizando-se padrão de hemoglobina de 10g/dL (Labtest®).

Figura 3 : Coleta de sangue

Fígado

Ao término do ensaio, os animais, após insensibilização elétrica, foram sacrificados e tiveram seus fígados retirados, pesados , acondicionados em

sacos plásticos identificados com etiquetas e congelados a -20°C até o momento da análise.

4.2 Métodos

Lavagem de Materiais

As vidrarias utilizadas nas análises de determinação de ferro total foram desmineralizadas em banho de ácido nítrico (HNO_3) por 12 horas, enxaguadas 10 vezes com água desionizada e secas em estufa a 37°C .

Controle da qualidade da água desionizada

A condutividade da água desionizada foi determinada regularmente para assegurar-se da não-contaminação por metais, sendo que valores de condutividade iguais ou inferiores a $1,0\ \mu\text{S}$ a 25°C foram considerados adequados para uso da água. O padrão de condutividade utilizado nas medidas foi o padrão Digimed de $1,412\ \mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C .

Pesagem dos animais

Os leitões foram pesados no primeiro dia do período de depleção e nos dias 0, 3, 6, 9 e 13 do período de repleção. A pesagem foi feita em balança mecânica projetada para a pesagem destes animais (Figura 4).

Figura 4 – Pesagem dos leitões

Preparação das rações

As rações foram preparadas no Instituto de Zootecnia de Nova Odessa – SP. Todas as rações tinham como base leite em pó desnatado e milho comum. Os aminoácidos triptofano e lisina, os minerais Ca, Zn, Cu e Mn e suplemento de vitaminas foram adicionados para atender as recomendações nutricionais de leitões entre 5 e 10 kg, recém-desmamados. As fontes de ferro foram adicionadas separadamente, sendo formuladas para conter as seguintes concentrações :

Grupos-Padrão:

- PFe80 : 80 mg Fe/kg ração como $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- PFe150 : 150 mg Fe/kg ração como $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- PFe200 : 200 mg Fe/kg ração como $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Grupos Experimentais:

- NaCMC : 150 mg Fe/kg ração como microcápsula de $\text{FeSO}_4\text{:NaCMC}$ (1:1)
- Alginato : 150 mg Fe/kg ração como microcápsula de $\text{FeSO}_4\text{:Alginato}$ 8%
- Fe quelado : 150 mg Fe/kg ração como ferro quelado com metionina
- Fe eletrolítico : 150 mg Fe/kg ração como ferro eletrolítico

Grupo Controle:

- Controle : 100 mg Fe/kg ração como $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Foram preparados 1200 kg de ração-base e para garantir homogeneidade da mesma, fez-se, inicialmente, uma pré-mistura em um misturador em Y de ácido inoxidável, com capacidade para 30 kg de ração, por 10 min. Em seguida, a ração foi levada a um misturador horizontal, com capacidade para 300 kg de ração, por mais 10 min.

Separou-se 65 kg de ração para cada grupo para adição das diferentes fontes de ferro . Novamente, para garantir a homogeneidade das rações, agora com relação às fontes de ferro adicionadas, estas foram levadas ao misturador em Y por 10 min e transferidas para o misturar horizontal, também por 10 min. No final deste processo, todas as rações foram colocadas em sacos de polietileno devidamente fechados e identificados e armazenadas em câmara fria a 0°C.

Análise Química das Rações

A análise química das rações foi efetuada segundo as normas elaboradas pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985) e AOAC (1980) e HORNSEY (1956). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

Umidade

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico. Cápsulas previamente dessecadas foram pesadas com 5g da amostra e deixadas em estufa a 105°C por 12 horas. Após este período, as cápsulas com a amostra foram novamente pesadas e a porcentagem de umidade foi determinada pela diferença entre o peso inicial e o peso final da cápsula com a amostra / peso da amostra.

Cinzas

A porcentagem de cinzas foi determinada por método gravimétrico. Cadinhos calcinados na mufla a 550°C por 12 horas foram pesados e receberam 2 g de amostra, retomando para a mufla até a obtenção de cinzas. A porcentagem de cinzas foi calculada pela diferença entre o peso do cadinho calcinado com a amostra e o peso do cadinho calcinado sem a amostra / peso da amostra.

Lipídios

A fração lipídica foi determinada por gravimetria. A extração da fração lipídica foi feita com éter etílico p.a., utilizando um extrator contínuo de Soxhlet, sob aquecimento.

Proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Micro-kjeldal para nitrogênio total, após a digestão da amostra de ração com H₂SO₄ em

bloco digestor a 350°C. Utilizou-se o fator 6,25 para a conversão do teor de nitrogênio em proteína.

Amido e Açúcares totais

O amido e os açúcares totais foram determinados por HPLC após extração com etanol a 80%, realizada no Laboratório de Bioquímica dos Alimentos - FBA/USP.

Fibras

As fibras foram determinadas por método enzimático-gravimétrico no Laboratório de Bioquímica dos Alimentos – FBA/USP.

Aminoácidos

A análise de aminoácidos foi feita pela empresa Ajinomoto Biolatina Ind. e Com. Ltda. A amostra foi submetida a uma hidrólise ácida a quente e a determinação foi feita por HPLC com ninhidrina pós-coluna, em duplicata.

Minerais

Ferro

A concentração de ferro nas amostras foi determinada pelo método de Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA), segundo as normas da AOAC (1980). Pesou-se, aproximadamente, 1 g de cada amostra e 0,5 g do padrão de referência secundário (AIN-93G) em tubos de Micro-Kjeldahl e, após adição de 10 mL de HNO₃ concentrado p.a. Merck®, estas foram levadas a um bloco digestor (Pyrotec®) com aquecimento gradual até 200°C. Após clareamento e

resfriamento à temperatura ambiente, 2 mL H_2O_2 p.a. Merck® foram acrescentados e novamente as amostras foram submetidas à digestão, com temperatura de 150°C até clareamento total. Ao término deste processo e após as amostras alcançarem a temperatura ambiente, fez-se a diluição das mesmas com água desionizada em balões de 50ml. Para controle do reagente (branco) fez-se triplicata de tubos contendo apenas HNO_3 e H_2O_2 . Uma curva padrão de ferro foi preparada com padrão de Cloreto Férrico 9972 Titrisol - Merck® contendo 1000 mg de Fe/L diluído em água desionizada, nas seguintes concentrações: 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 $\mu\text{g Fe/mL}$. A absorbância das soluções foi determinada em EAA Hitachi Z5000, com lâmpada de catodo oco, calibrado nas seguintes condições: região ultra-violeta, comprimento de onda 248,3 nm, fenda 0,2 nm e chama oxidante de ar/acetileno.

Ferro nas amostras de água

A determinação de ferro na amostra de água foi feita através do método de padrão adicionado no qual, alíquotas de padrão de ferro de concentração conhecida, são adicionadas às amostras já digeridas (HASWELL, 1991). As alíquotas adicionadas foram nas seguintes concentrações: 0,00; 0,25; 0,5 e 0,75 $\mu\text{g Fe/mL}$. A absorbância das soluções foi determinada em EAA Hitachi Z5000, com lâmpada de catodo oco, calibrado nas seguintes condições: região ultra-violeta, comprimento de onda 248,3 nm, fenda 0,2 nm e chama oxidante de ar/acetileno.

Zinco

A digestão da amostra para a determinação de zinco seguiu o mesmo procedimento descrito para a determinação de ferro, com exceção da massa pesada que foi de aproximadamente 2g para as amostras e 1 g para o

padrão de referência secundário (AIN 93G). A curva-padrão foi preparada com uma solução de Cloreto de Zinco 9953 Titrisol - Merck® contendo 1000 mg de Zn/L diluído em água desionizada, nas seguintes concentrações: 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g Zn/mL}$. A leitura foi feita em EAA Hitachi Z5000, com lâmpada de catodo oco, calibrado nas seguintes condições: região ultra-violeta, comprimento de onda 213,9 nm, fenda 0,7 nm e chama oxidante de ar/acetileno.

Cobre, Cálcio e Magnésio

A amostra digerida para a determinação de zinco, também foi utilizada para as determinações de cobre, cálcio e magnésio.

Para o cobre, a curva-padrão foi preparada com uma solução padrão de cobre 9987 Titrisol - Merck® contendo 1000 mg Cu/L, diluído em água desionizada, nas seguintes concentrações: 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g Cu/mL}$. A leitura foi feita em EAA Hitachi Z5000, com lâmpada de catodo oco, calibrado nas seguintes condições: região ultra-violeta, comprimento de onda 324,8 nm, fenda 1,3 nm e chama oxidante de ar acetileno.

Para a determinação do cálcio, as amostras foram submetidas a uma segunda diluição devido ao alto teor de cálcio nas rações e acrescidas de uma solução de óxido de lantânio a 1% para minimizar as interferências causadas por outros minerais presentes nas amostras. A curva-padrão foi preparada com solução de Cálcio 9943 Titrisol - Merck® contendo 1000 mg Ca/L, diluído em água desionizada, com as seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 $\mu\text{g Ca/mL}$. A leitura foi realizada em EAA Hitachi modelo Z5000, com lâmpada de catodo oco, nas seguintes condições: região ultra-violeta, comprimento de onda 422,7 nm, fenda 0,7 e chama oxidante de ar/acetileno.

As amostras para a determinação de magnésio, assim como para o cálcio, foram submetidas a uma segunda diluição e também acrescidas de uma solução de óxido de lantânio a 1%. A curva-padrão foi preparada utilizando-se como padrão o Nitrato de Magnésio 9949 Titrisol - Merck® contendo 100 mg Mg/L, diluído em água desionizada, com as seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,5 e 10,0 µg Mg/mL. A leitura foi realizada em EAA Hitachi modelo Z5000, com lâmpada de catodo oco, nas seguintes condições: região ultra-violeta, comprimento de onda 202,6 nm, fenda 1,3 nm e chama oxidante de ar/acetileno.

Ferro total no fígado

Os fígados foram descongelados à temperatura ambiente para a determinação do ferro total. Aproximadamente, 1 g de cada fígado, retirado do 4º quadrante do lobo direito, foram digeridos com HNO₃ p.a. Merck®. A concentração de ferro nas amostras foi determinado pelo método de Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA), segundo as normas da AOAC (1980).

Ferro heme no fígado

Após descongelamento das amostras à temperatura ambiente, seguiu-se o procedimento descrito por HORNSEY (1956), para análise de pigmentos totais. Utilizou-se hemoglobina bovina liofilizada H-2500 - Sigma®, como padrão de referência secundário.

A extração de pigmentos totais foi realizada adicionando-se às amostras 40 mL de acetona P.A. Merck®, 1 mL de solução de L-cisteína 1%, 1 mL de

ácido clorídrico concentrado P.A. Merck® e água suficiente para atingir um volume de 50 mL, considerando-se a umidade da amostra.

O extrato foi filtrado e a leitura foi feita em espectrofotômetro HITACHI® (Mod. U-34410), em comprimento de onda de 640 nm. A absorbância encontrada foi multiplicada pelo fator 6800, obtido pelo coeficiente de extinção molar, e dividida pelo peso da amostra, obtendo-se a concentração de hematina em µg/g de amostra. A concentração de ferro heme foi calculada considerando-se que a hematina possui 8,82% de ferro (MERCK, 1989).

Ferro não-heme no fígado

O ferro não-heme do fígado foi calculado subtraindo-se o ferro heme do ferro total.

4.7 Repleção de Hemoglobina em Leitões Anêmicos

A avaliação da biodisponibilidade de ferro foi realizada pelo teste de repleção de hemoglobina em leitões anêmicos, proposto por SOUTH *et al* (2000). As dietas foram formuladas para conter 150 mg Fe/kg ração, valor mais alto do que o preconizado pelo NRC (1998), que é de 100 mg Fe/kg ração, para diminuir o período de recuperação e minimizar os efeitos causados pela deficiência de ferro do animal (MILLER, 2002).

O ensaio consistiu de duas fases. Na chamada fase de depleção, induziu-se anemia nos leitões pela diminuição na dose de ferro-dextrano aplicada nos animais entre o segundo e o terceiro dia de vida (30 mg ao invés dos 200 mg normalmente aplicados) e pelo fornecimento de uma ração deficiente em ferro.

Na segunda, chamada fase de repleção, os leitões passaram a receber as rações com as diferentes fontes de ferro e o grau de repleção de hemoglobina foi avaliado em função da fonte de ferro ofertada aos animais.

Com a finalidade de monitorar as condições experimentais, foi formado um grupo controle não-anêmico (n=7) que, ao contrário dos demais grupos, recebeu a dose usual de ferro (30 mg ao nascimento e 170 mg no início do experimento) e ração com 100 mg Fe/kg, na forma de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, durante todo o período do ensaio.

Fase de depleção (obtenção de leitões anêmicos)

Sessenta leitões de linhagem geneticamente definida, sendo 7 não-anêmicos e 53 anêmicos, divididos em 3 ensaios, com 21 dias de idade, mestiços, machos e fêmeas, recém-desmamados, pesando 6,70 (1,01) kg, foram alimentados durante 7 dias com ração à base de leite em pó desnatado e milho comum, sem adição de fonte de ferro (< 15 mg Fe/kg ração) (com exceção do grupo não-anêmico que recebeu ração com 100 mg Fe/kg ração na forma de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Nessa fase, os animais foram alojados três a três em uma unidade do Instituto de Zootecnia denominada Creche, em gaiolas de aço inoxidável, adaptadas com lâmpadas para aquecimento e adaptadas com bebedouros do tipo chupeta (*nipple*) para leitões. Ração e água foram fornecidas *ad libitum*.

No sétimo dia todos os leitões foram pesados e efetuou-se a coleta de sangue para a determinação da hemoglobina. A partir de então, estando comprovada a anemia, os animais foram agrupados aleatoriamente, tendo sido previamente homogenizados com base no produto do **peso (kg) x Hemoglobina (g/L)**, dando início à fase de repleção.

Fase de repleção (recuperação da hemoglobina)

Nesta fase, os leitões foram alojados individualmente na unidade denominada Digestibilidade/Metabolismo (Figura 5) do Instituto de Zootecnia. As gaiolas de estudo de metabolismo, semelhantes ao modelo descrito por PEKAS (1968), eram de aço inoxidável, com cocho removível, adaptadas com lâmpadas para aquecimento e adaptadas com bebedouros do tipo chupeta (*nipple*). A sala possuía um sistema de ar-condicionado, permitindo a manutenção da temperatura ao redor de 25°C.

Figura 4: Gaiolas da unidade Digestibilidade/Metabolismo

Os animais foram agrupados com base no *pool* de ferro heme dos animais, obtido pelo produto:

peso (kg) x **Hb** (g/L) x volume de sangue do animal x % de ferro na hemoglobina.

Foram constituídos 7 grupos, sendo que 3 deles receberam como fonte de ferro $\text{FESO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

O consumo de ração foi medido diariamente. A pesagem e a coleta de sangue dos animais para a determinação da hemoglobina foram efetuadas nos dias 0, 3, 6, 9 e 13 do início do período de repleção. Rações e água foram oferecidas *ad libitum*. Para evitar o desperdício das rações, pequenas porções foram colocadas no cocho, no máximo, a cada 2 horas, de forma que o cocho nunca ficasse vazio. No horário noturno, colocava-se a última porção por volta das 23:30h, em quantidade maior que as oferecidas durante o dia, para que houvesse ração suficiente até a manhã do próximo dia.

Determinação da Biodisponibilidade de Ferro

O cálculo da biodisponibilidade de ferro foi feito a partir da variação do *pool* de ferro (*pool* final – *pool* inicial) e do ferro ingerido pelos animais, para cada fonte de ferro testada. O cálculo do *pool* de ferro para leitões foi feito de acordo com SOUTH *et al* (2000), segundo a relação:

$$\text{Pool de Fe (mg)} = \text{P (kg)} \times \text{Hb (g/L)} \times 0,06 \times 3,35$$

Onde: P = peso do leitão (kg)

Hb = Hemoglobina (g/L)

0,06 = Volume de sangue igual a 6% do peso corporal (L/kg peso)

3,35 = Concentração de ferro na hemoglobina (mgFe/gHb)

Os grupos denominados Grupos-padrão, foram acrescentados ao ensaio com a finalidade de se corrigir respostas devidas à variação na ingestão de

ferro e não à diferença na fonte de ferro (POLTRONIERI *et al*, 2000). Nestes grupos a fonte dietética de ferro foi $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ com concentrações de 80, 150 e 200 mg Fe/kg ração. Os valores médios de biodisponibilidade de ferro de cada um destes grupos foram utilizados para se construir uma curva de: **% de Absorção de Ferro na ordenada e mg de Fe ingerido na abcissa.**

Como para a mesma fonte do mineral, a % de absorção diminui com o aumento do consumo, quando estes parâmetros foram relacionados ajustaram-se a uma equação exponencial. A partir desta equação, utilizando os valores de ferro ingerido pelos leitões em cada grupo, foram calculados os valores de absorção de ferro de cada uma das fontes testadas com relação ao $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, tomado como 100%.

4.8 Análise Estatística

Para verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos grupos, nos vários parâmetros avaliados, foram utilizados os seguintes testes:

- **ANOVA (Análise de Variância):** Variação do Pool; Ferro heme; Porcentagem de absorção relativa.
- **ANCOVA (Análise de covariância):** Peso(6 e 13); Hemoglobina (6 e 13); Pool (6 e 13); Ferro ingerido; Ração ingerida dia; Ração ingerida total; Proteína ingerida; peso do fígado; Porcentagem de absorção.
- **Comparações múltiplas de Tukey:** Peso 0; Hemoglobina 0; Pool 0.

- **Comparações múltiplas de Tamhane:** Conversão alimentar; Eficiência alimentar; Ferro total ingerido; Ferro não-heme; Coeficiente de Eficácia Protéica; Porcentagem de ferro nas rações.
- **Kruskal-Wallis:** Ganho de peso/dia.

O nível de significância estabelecido foi de 5%.

FIGURA 6 – Representação esquemática do modelo experimental

5. RESULTADOS

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E MINERAL DA DIETA BASE

Na tabela 1 encontram-se os resultados referentes à composição centesimal e mineral da dieta base dos leitões.

Tabela 1 – Composição centesimal e mineral da ração-base dos suínos. Média (D.P.)¹. (n = 3).

Composição centesimal	%	NRC (%)
Proteína	17,2 (0,9)	20
Lípides	2,6 (0,04)	-
Fibra solúvel	2,1 (0,1)	-
Fibra insolúvel	8,9 (0,2)	-
Amido	28,2 (0,6)	-
Açúcares totais	38,5 (0,3)	-
Umidade	8,5 (0,7)	-
Cinzas	4,4 (0,4)	-
Minerais	mg/100g	NRC (mg/100g)
Ferro	1,2 (0,04)	10
Cálcio	1490,0 (180,0)	800
Zinco	17,5 (0,6)	10
Cobre	2,6 (1,2)	0,6
Magnésio	92,0 (14,7)	43

n = número de replicatas; D.P. = Desvio Padrão

CONCENTRAÇÃO DE FERRO NA DIETAS DE REPLEÇÃO

Na tabela 2 estão expressas as concentrações de ferro nas dietas de repleção e a homogeneidade alcançada na formulação com as diferentes fontes de ferro, expressa como Coeficiente de Variação (C.V.).

Tabela 2 – Concentração de ferro nas rações de repleção. Média (D.P.) e Coeficiente de Variação (%). Determinações em triplicata.

Grupo	n	Fonte de Ferro	mg fe/ kg dieta	C.V. %
PFe80 ¹	5	FeSO ₄ .7H ₂ O	77,5 (24,3) ^a	31
PFe150 ¹	5	FeSO ₄ .7H ₂ O	141,4 (38,3) ^b	27
PFe200 ¹	5	FeSO ₄ .7H ₂ O	214,9 (67,6) ^{b,c}	31
NaCMC ²	5	FeSO ₄ microencapsulado	155,2 (5,8) ^b	4
Alginato	5	FeSO ₄ microencapsulado	150,5 (6,1) ^b	4
Fe quelado	5	Ferro quelado com metionina	156,7 (64,1) ^{a,b,c,d}	41
Fe eletrolítico	5	Ferro reduzido eletroliticamente	143,5 (11,4) ^b	8
Controle	5	FeSO ₄ .7H ₂ O	97,5 (14,1) ^{a,c,d}	15

Sobrescritos diferentes correspondem a resultados significativamente diferentes (p < 0,05).

¹ Grupos-padrão de ferro (rações fortificadas com FeSO₄.7H₂O em diferentes concentrações).

² carboximetilcelulose sódica

n = número de amostras

Na tabela 2 verifica-se que as rações que tiveram como fonte de ferro FeSO₄.7H₂O e ferro quelado com metionina ficaram pouco homogêneas (C.V.

entre 15 e 41%). Já as rações fortificadas com os compostos microencapsulados e com o ferro eletrolítico mostraram excelente homogeneidade (C.V. 4 e 8%, respectivamente).

DESEMPENHO DOS LEITÕES

Na tabela 3 estão apresentados os resultados referentes ao desempenho dos leitões dos grupos experimentais.

Tabela 3 – Desempenho dos leitões no período de repleção. Média (D.P.)

Grupos	n	Ração ing (g/dia)	Ganho de Peso (g/dia)	Conv. ¹ alimentar	Eficiência ² alimentar (%)
NaCMC	8	407,9 (96,5) ^a	317 (69) ^a	1,3 (0,1) ^a	77,9 (3,6) ^a
Alginato	8	400,7 (127,7) ^a	335 (76) ^a	1,2 (0,2) ^a	86,2 (14,7) ^a
Fe quelado	8	458,6 (190,5) ^a	363 (156) ^a	1,3 (0,3) ^a	78,3 (13,7) ^a
Fe eletrolítico	8	454,9 (191,3) ^a	326 (155) ^a	1,6 (0,4) ^a	68,2 (15,3) ^a
Controle	7	410,1 (75,5) ^a	341 (51) ^a	1,3 (0,2) ^a	76,7 (12,6) ^a

¹ Conversão alimentar = ração ingerida/ganho de peso

² Eficiência alimentar = ganho de peso/100g ração ingerida

Sobrescritos diferentes na mesma coluna correspondem a resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Os resultados acima descritos mostram que houve similaridade entre os grupos experimentais quanto à ingestão de ferro e o ganho de peso.

CONSUMO DE PROTEÍNA E COEFICIENTE DE EFICÁCIA PROTÉICA

Na tabela 4 estão descritos os valores médios de ingestão de proteína, variação de peso e coeficiente de eficácia protéica dos grupos experimentais.

Tabela 4 – Consumo de proteína, Variação de peso (Δ Peso) e Coeficiente de Eficácia protéica (CEP) de leitões no período de repleção. Média (D.P.)

Grupos	n	Proteína (g/dia)	Prot. ing. Total (kg)	Δ Peso (kg)	CEP
NaCMC	8	70,0 (16,6) ^a	1,0 (0,2) ^a	4,1 (0,9) ^a	4,6 (0,2) ^a
Alginato	8	68,8 (21,9) ^a	0,9 (0,2) ^a	4,4 (1,0) ^a	5,0 (0,9) ^a
Fe quelado	8	78,7 (32,7) ^a	0,9 (0,3) ^a	4,7 (2,0) ^a	4,6 (0,8) ^a
Fe eletrolítico	8	78,1 (32,9) ^a	1,0 (0,4) ^a	4,2 (2,0) ^a	4,0 (0,9) ^a
Controle	7	70,4 (13,0) ^a	0,9 (0,2) ^a	4,4 (0,7) ^a	5,1 (1,5) ^a

Sobrescritos diferentes na mesma coluna correspondem a resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$)

ABSORÇÃO DE FERRO DOS GRUPOS PADRÃO

Na tabela 5 estão apresentados os parâmetros peso (kg), hemoglobina (g/L), *pool* de ferro (mg), ferro ingerido (mg) e porcentagem de absorção dos leitões dos grupos-padrão de ferro.

Tabela 5 – Parâmetros de recuperação de hemoglobina em leitões anêmicos, alimentados por 13 dias com rações fortificadas com $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, com diferentes concentrações de ferro: 77,5 (PFe80); 141,4 (PFe150); 214,9 (PFe200)mg Fe/kg ração, respectivamente. Média (D.P.)

Parâmetros Biológicos	Dia	PFe80 (n=7)	PFe150 (n=7)	PFe200 (n=7)
PESO (kg)	0	7,8 (1,3) ^a	8,1 (1,2) ^a	7,7 (0,9) ^a
	6	9,9 (1,9) ^b	10,0 (1,6) ^b	9,1 (1,3) ^b
	13	11,8 (2,1) ^c	11,6 (1,7) ^c	11,3 (1,3) ^c
HEMOGLOBINA (g/L)	0	63,9 (6,2) ^a	60,3 (10,7) ^a	64,4 (7,5) ^a
	6	83,7 (9,7) ^b	81,1 (12,2) ^b	86,9 (10,3) ^b
	13	94,8 (9,1) ^c	100,9 (10,0) ^c	97,2 (8,7) ^c
Fe <i>POOL</i> (mg)	0	99,0 (14,3) ^a	99,1 (23,3) ^a	99,0 (10,7) ^a
	6	165,5 (27,8) ^b	165,2 (44,3) ^b	159,1 (28,4) ^b
	13	224,3 (44,8) ^c	236,9 (49,7) ^c	221,2 (42,2) ^c
Fe ingerido (mg)	13	498,0 (124,6) ^a	861,8 (159,4) ^b	1220,2 (203,4) ^c
Absorção (%)		25,4 (4,3) ^a	16,0 (3,1) ^b	9,9 (2,2) ^c

Sobrescritos diferentes na mesma linha correspondem a resultados significativamente diferentes ($p < 0,001$).

As diferenças observadas na ingestão de ferro de cada grupo, foram consequência das diferenças nas concentrações de ferro por kg de ração. O aumento na ingestão do ferro, por sua vez, propiciou a diminuição na porcentagem de absorção, indicando haver um limite na absorção deste mineral.

Há uma relação exponencial entre a ingestão de ferro (mg) e a porcentagem de ferro absorvido que tem sido reproduzida, por vários autores, em experimentos conduzidos em ratos (MILLER, 1982; BUCHOWSKI *et al*, 1989; PINTO *et al*, 1997; POLTRONIERI *et al*, 2000).

Desta forma, com os valores de ferro ingerido e porcentagem de absorção obtidos para os grupos-padrão de ferro, cujas dietas foram fortificadas com $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, foi estabelecida a curva de absorção em função da ingestão de ferro (Figura 7).

Figura 7 – Absorção de ferro (%) de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ x Ingestão de ferro (mg)

Esta curva ajustou-se a uma função exponencial e a equação obtida para a mesma foi:

$$y = 48,77 e^{-0,0013x}$$

com $R^2 = 0,9997$, onde:

x = ferro ingerido e y = absorção de ferro de sulfato ferroso.

Pelo uso da equação exponencial, as diferenças observadas na absorção de ferro podem ser relacionadas somente à fonte de ferro e não à diferenças na sua concentração (PINTO *et al*, 1997).

Assim, as respostas devidas à variação na ingestão de ferro dos grupos experimentais foram corrigidas. O percentual de absorção de ferro dos grupos fortificados com $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi tomado como 100% e a relação entre os valores de porcentagem de absorção da fonte de ferro dos grupos experimentais e do $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi chamada de porcentagem de absorção relativa.

ABSORÇÃO DE FERRO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Nas tabela 6 estão apresentados os parâmetros peso (kg), hemoglobina (g/L), *pool* de ferro (mg), ferro ingerido (mg) e porcentagem de absorção dos leitões dos grupos experimentais.

Tabela 6 – Parâmetros de recuperação de hemoglobina em leitões anêmicos, alimentados por 13 dias com rações fortificadas com FeSO₄ microencapsulado com NaCMC, FeSO₄ microencapsulado com alginato, ferro quelado com metionina e ferro eletrolítico e em leitões não-anêmicos (Controle), alimentados por 20 dias com rações fortificadas com FeSO₄.7H₂O. Média (D.P.)

Parâmetros	Dia	NaCMC (n=8)	Alginato (n=8)	Fe quel (n=8)	Fe Electr (n=8)	Controle (n=7)
PESO (kg)	0	6,8 (0,6) ^a	6,3 (1,5) ^a	6,5 (1, 1) ^a	6,7 (1,4) ^a	7,1 (1,4) ^a
	6	8,3 (0,8) ^b	8,2 (1,9) ^b	8,5 (1,8) ^b	8,5 (2,1) ^b	9,2 (1,4) ^b
	13	10,9 (1,2) ^c	10,7 (2,3) ^c	11,2 (2,9) ^c	10,9 (3,3) ^c	11,6 (1,8) ^c
HEMOGLOBINA (g/L)	0	68,7 (10,5) ^a	72,5 (12,8) ^{a,b}	71,2 (12,2) ^{a,b}	69,0 (13,5) ^a	88,6 (8,6) ^b
	6	79,7 (9,7) ^b	82,4 (13,6) ^b	84,6 (11,4) ^b	81,6 (12,0) ^b	100,4 (13,4) ^b
	13	96,7 (8,2) ^c	96,8 (8,2) ^c	96,4 (14,4) ^c	93,9 (13,8) ^c	110,4 (14,1) ^c
Fe POOL (mg)	0	93,2 (11,7) ^a	91,2 (22,7) ^a	91,4 (16,9) ^a	91,7 (23,4) ^a	127,8 (31,3) ^b
	6	133,0 (23,5) ^b	137,1 (43,0) ^b	145,6 (42,2) ^b	139,4 (44,5) ^b	185,1 (30,1) ^b
	13	213,4 (36,1) ^c	212,1 (74,6) ^c	219,6 (73,9) ^c	209,0 (78,3) ^c	256,3 (46,5) ^c
Fe ingerido (mg)	13	823,0 (194,7) ^a	783,9 (249,8) ^a	934,0 (388,0) ^a	848,5 (356,9) ^a	521,7 (96,0) ^b
Absorção (%)		14,7 (2,9) ^a	15,1 (3,8) ^a	13,3 (2,9) ^a	12,8 (4,3) ^a	
Absorção Relativa (%)		89,5 (25,9) ^a	92,1 (45,2) ^a	105,9 (60,5) ^a	93,1 (58,4) ^a	

Sobrescritos diferentes na mesma linha correspondem a resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$)

FERRO NO FÍGADO

Na tabela 7 estão apresentados os resultados de peso corporal (kg), peso do fígado (g), ferro total no fígado ($\mu\text{g/g}$), ferro heme ($\mu\text{g/g}$) e ferro não-heme ($\mu\text{g/g}$) dos grupos padrão de ferro, dos grupos experimentais e do grupo controle.

TABELA 7 - Peso corporal (kg), peso do fígado (g), ferro total no fígado ($\mu\text{g/g}$), ferro heme ($\mu\text{g/g}$) e ferro não-heme ($\mu\text{g/g}$) de leitões de diferentes grupos no 13º dia de recuperação. Média (D.P.)

GRUPO	n	Peso Corporal (kg)	FÍGADO			
			Peso Fígado (g)	Fe total ($\mu\text{g/g}$)	Fe heme ($\mu\text{g/g}$)	Ferro não-heme ($\mu\text{g/g}$)
PFe80	7	11,8 (2,1) ^{a,b}	288,5 (41,6) ^a	47,8 (11,0) ^a	16,1 (2,9) ^a	31,7 (10,8) ^a
PFe150	7	11,6 (1,7) ^a	263,4 (50,0) ^a	67,4 (18,1) ^a	15,4 (5,3) ^a	52,0 (19,7) ^a
PFe200	7	11,3 (1,3) ^a	250,4 (45,8) ^a	63,9 (12,3) ^a	11,9 (1,3) ^a	53,0 (15,7) ^a
NaCMC	8	10,9 (1,2) ^{a,b}	271,7 (29,6) ^a	59,6 (35,6) ^a	12,1 (3,5) ^a	47,5 (35,2) ^a
Alginato	8	10,7 (2,3) ^{a,b}	236,4 (53,3) ^a	58,8 (30,9) ^a	12,8 (2,3) ^a	46,0 (29,9) ^a
Fe quelado	8	11,2 (2,9) ^b	263,1 (69,2) ^a	58,5 (30,6) ^a	13,8 (7,3) ^a	44,7 (26,3) ^a
Fe eletrolítico	8	10,9 (3,3) ^{a,b}	252,5 (76,3) ^a	39,2 (23,2) ^a	10,5 (2,5) ^a	28,6 (22,3) ^a
Controle	5	11,6 (2,0) ^{a,b}	279,0 (35,4) ^a	317,2 (42,6) ^b	14,4 (3,3) ^a	308,1 (44,6) ^b

Sobrescritos diferentes na mesma coluna correspondem a resultados significativamente diferentes com $p < 0,05$.

De acordo com a tabela 7, com exceção do grupo controle que apresentou maior concentração de ferro total e ferro não-heme no fígado ($p < 0,05$), não houve diferença entre todos os grupos estudados quanto ao peso do fígado, ferro total, ferro heme e ferro não-heme ($p > 0,05$).

A representação gráfica do peso dos fígados (g), das concentrações de ferro total ($\mu\text{g/g}$), de ferro heme ($\mu\text{g/g}$) e de ferro não-heme ($\mu\text{g/g}$) no fígado dos leitões de todos os grupos é apresentada na Figura 8.

Figura 8 – Peso do fígado (g), concentração de ferro total (µg/g), ferro heme (µg/g) e ferro não-heme (µg/g) nos fígados dos leitões de todos os grupos (1 a 8: PFe80, PFe150, PFe200, NaCMC, Alginato, Fe quelado, Fe eletrolítico, controle)

INCIDÊNCIA DE DIARRÉIA NOS LEITÕES

A incidência de diarreia nos leitões, após o início da fase de repleção, é apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 - Incidência de diarreia, observada em cada grupo, após o início da fase de repleção de hemoglobina.

GRUPO	n	leitões sem diarreia no início da Repleção	leitões com diarreia no fim da Repleção	%	I.C. (95%)
PFe80	7	7	5	71	0,37-1,00
PFe150	7	7	5	71	0,37-1,00
PFe200	7	7	5	71	0,37-1,00
NaCMC	8	4	1	25	0,17-0,67
Alginato	8	4	1	25	0,17-0,67
Fe quelado	8	6	1	17	0,17-0,67
Fe eletrolítico	8	4	1	25	0,17-0,67
Controle	7	7	4	57	0,20-0,94

6. DISCUSSÃO

A fortificação de alimentos com sais de ferro é uma estratégia recomendada pela OMS para prevenir a anemia por deficiência de ferro. Todavia, as alterações organolépticas provocadas nos alimentos quando adicionados de sais de ferro com boa biodisponibilidade prejudicam a sua aceitação.

A técnica de microencapsulação de sulfato ferroso desenvolvida pelo Laboratório de Caracterização de Partículas do Agrupamento de Processos Químicos (IPT), em parceria com o Laboratório de Nutrição do Departamento de Alimentos da FCF - USP, buscou uma forma de fortificação que diminuísse a interação deste mineral com o meio ao qual foi adicionado, mas que garantisse ou melhorasse a sua biodisponibilidade.

Partículas obtidas de várias formulações foram testadas com relação à disponibilidade *in vitro* e mostraram resultados satisfatórios. Nosso trabalho teve como objetivo avaliar, *in vivo*, a biodisponibilidade dos compostos que apresentaram a melhor disponibilidade *in vitro*, usando leitões anêmicos como modelo animal.

O interesse na utilização de leitões neste ensaio, deu-se em função de sua similaridade fisiológica com os seres humanos e pela facilidade em torná-los anêmicos. Poucos relatos existem na literatura de ensaio de recuperação de hemoglobina em leitões anêmicos e, no Brasil, este é o primeiro experimento, conduzido em leitões, para avaliação da biodisponibilidade de ferro.

As dietas utilizadas foram formuladas usando como ingredientes leite em pó desnatado e milho, tendo-se o cuidado de adicionar os aminoácidos L-triptofano e L-lisina, os minerais zinco, cobre e manganês, além da mistura vitamínica (Quadro 4), de forma a torná-la adequada às necessidades de leitões pesando entre 5 e 10 kg, como os utilizados no experimento.

Diferente da formulação por nós utilizada, as dietas normalmente formuladas para leitões logo após o desmame, contêm fontes protéicas de origem vegetal, tais como farelo de soja e farelo de trigo, em maior proporção que o leite em pó (FERREIRA *et al*, 2001). Estas fontes, porém, têm digestibilidade inferior àquelas de origem animal, pois o alto pH estomacal (entre 3,8 e 4,3) em leitões com menos de 35 dias de idade, limita a proteólise gástrica, uma vez que a pepsina gástrica é lentamente ativada em pH 4 e rapidamente ativada em pH2 (WILSON & LEIBHOLZ, 1981). Dessa forma, leitões nesta faixa de idade têm sérias limitações para digerir proteínas de origem vegetal, mas digerem muito bem as proteínas do leite (BERTOL *et al*, 2000).

MAHAN (1993) indica o consumo de dietas que contenham ingredientes altamente digestíveis durante o período que se segue ao desmame, pois definem que a principal causa da redução do crescimento após essa fase, resulta da redução da absorção de nutrientes, uma vez que o sistema digestivo do leitão recém-desmamado está naturalmente adaptado ao leite da porca.

Desta forma, o uso de 40% de leite em pó desnatado e 58% de milho na dieta formulada para nosso ensaio, supriu as necessidades energéticas dos animais (Quadro 4) e forneceu proteína altamente digestível. Além disso, a análise da composição de aminoácidos (Tabela 2) mostrou que estão de acordo com as recomendações do NRC (1998).

Óleos vegetais, como de milho e de soja, são ingredientes que também costumam integrar grande parte das rações elaboradas para suínos (SOUTH *et al*, 2000; FERREIRA *et al*, 2001; QUADROS *et al*, 2002), e são utilizados, principalmente, como fonte de ácido linoleico, um ácido graxo essencial. O NRC

(1998), recomenda, para leitões pesando entre 5 e 10 kg, a ingestão diária de 0,5 g de ácido linoleico. Na nossa dieta não houve a necessidade da utilização de óleos vegetais, uma vez que o milho possui 2,2% de ácido linoleico, suprimindo as necessidades diárias dos animais na proporção em que foi utilizado na dieta.

É interessante notar que, diferente de humanos onde a ingestão recomendada de macronutrientes é de 60% de carboidratos, 25% de lipídios e 15% de proteínas e de ratos, onde as recomendações são de 64% de carboidratos, 17% de lipídios e 19% de proteína, na formulação de dietas para suínos estas proporções não são definidas. A ingestão diária de proteína, por exemplo, varia de 24%, para leitões pesando entre 1 e 5 kg, a 13%, para animais pesando entre 50 e 110 kg (NRC, 1998) e as proporções de carboidratos e lipídios não são definidas.

A adequação da dieta utilizada em nosso ensaio também pode ser vista no desempenho dos animais (Tabela 4). Segundo o NRC (1998), espera-se um consumo diário de ração para leitões entre 5 e 10 kg de 460g e ganho de peso diário de 250g. Em nosso ensaio, enquanto a média de consumo diário de ração esteve de acordo com o esperado pelo NRC (450g/dia), a média de ganho diário de peso foi de 317g, superando as expectativas.

A homogeneidade das fontes de ferro nas rações preparadas foi diferente (Tabela 3). As rações fortificadas com $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ficaram pouco homogêneas (C.V. entre 15 e 27%), o que ocorreu em função da característica física deste composto. A forma heptaidratada, normalmente, forma cristais grandes e espessos, dificultando a homogeneidade na sua distribuição.

O elevado coeficiente de variação observado na ração preparada com ferro quelado com metionina (C.V. 41%), também ocorreu em função da característica física deste composto. Partículas grandes e aderidas dificultaram a sua distribuição.

Os compostos de ferro microencapsulados, por outro lado, são, caracteristicamente, partículas finamente divididas, com excelente propriedade reológica (RÉ, 2000; RÉ, 2003), o que homogênea a distribuição nas rações.

Independentemente das fontes de ferro utilizadas e da homogeneidade na sua distribuição nas dietas, não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) quanto ao consumo diário de ração e ao ganho de peso entre os leitões dos diferentes grupos (Tabela 4).

Estes dados correspondem aos obtidos por outros autores em estudos conduzidos em animais, onde se observa que a redução de ferro nas rações não altera o ganho de peso e o consumo de ração (AMINE *et al*, 1972; SIIMES *et al*, 1980).

Na literatura, não foram encontrados trabalhos relacionando os índices de conversão e eficiência alimentar com dietas com diferentes concentrações de ferro em leitões anêmicos. FURUGOURI (1972), trabalhando com leitões não-anêmicos, alimentados durante 30 ou 60 dias com dietas contendo diferentes concentrações de ferro (de 202 a 7102 mg Fe/kg dieta), na forma de sulfato ferroso, não encontrou diferença tanto na ingestão diária de ração entre os grupos como no ganho de peso diário. Entretanto, neste trabalho, os índices de conversão e eficiência alimentar não são considerados

A diferença na biodisponibilidade dos diferentes compostos de ferro utilizadas em nosso ensaio, foi avaliada pelas porcentagens de absorção e de absorção relativa ao $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ($p > 0,05$), mostrando haver similaridade entre os mesmos. A porcentagem de absorção de ferro nesses grupos variou de 12,8(4,3)% (ferro eletrolítico) a 15,1(3,8) % (alginato) e a porcentagem de

absorção relativa variou de 89,5(25,9)% (NaCMC) a 105,9(60,5)% (ferro quelado) (Tabela 6).

Segundo MONSEN (1978), quando os estoques de ferro corporal estão depletados, são esperados valores de absorção entre 10 e 20% em refeições com média e elevada biodisponibilidade de ferro, respectivamente. Desta forma, os resultados de absorção acima descritos, indicam a alta biodisponibilidade destes compostos quando adicionados a um meio complexo, como a dieta utilizada no nosso ensaio e no animal anêmico.

Estudos *in vitro* (SANTOS, 2001; RÉ, 2003), avaliaram, no leite, a dialisabilidade dos compostos microencapsulados com NaCMC e alginato, usando como referência a dialisabilidade de FeSO_4 comercial e obtiveram porcentagem de ferro dialisado de 11.9, 3.7 e 2.2%, respectivamente (Quadro 3). O maior resultado obtido para o ferro microencapsulado com NaCMC pode ter ocorrido em função deste composto apresentar dissolução mais lenta que o alginato, cujo perfil de dissolução é semelhante ao do FeSO_4 (RÉ, 2003).

In vivo, porém, todos os compostos mostraram alta biodisponibilidade (Tabelas 5 e 6), o que sugere que a característica de dissolução dos compostos não foi o principal fator a influenciá-la.

Por se tratar de um novo composto, não existem relatos, na literatura, sobre a biodisponibilidade de compostos de ferro microencapsulados com polímeros de NaCMC e de Alginato. O composto mais largamente estudado, é o composto de ferro microencapsulado com lecitina de soja (SFE-171®). O mesmo ocorre com o quelato de ferro utilizado no nosso ensaio. Na literatura, o composto mais estudado é o ferro bisglicina quelato. Nos quadros 5 e 6, estão descritos diversos trabalhos, com fontes de ferro semelhantes às utilizadas em nosso ensaio, onde foram avaliadas as porcentagens de absorção e de absorção relativa ao FeSO_4 .

Quadro 5: Relatos na literatura de porcentagem de absorção e de absorção relativa ao FeSO₄ de sulfato ferroso microencapsulado.

AUTORES	FONTE DE FERRO	MÉTODOS	RESULTADOS
A) MICROENCAPSULADOS			
GOTELLI <i>et al</i> (1996)	SFE-171	Estudo em humanos, não anêmicos, da biodisponibilidade de SFE-171 marcado com ⁵⁹ Fe, no leite.	10,2% abs ¹
ZUBILLAGA <i>et al</i> (1996)	SFE-171 FeSO ₄	Comparação da biodisponibilidade de SFE-171 e de FeSO ₄ no leite. Estudo em ratos não anêmicos com ⁵⁹ Fe.	SFE: 28% abs. FeSO ₄ : 24% abs. (p < 0,01)
BOCCIO <i>et al</i> (1996)	SFE-171 FeSO ₄	Estudo em camundongos, da biodisponibilidade e estabilidade de SFE-171 e FeSO ₄ marcados com ⁵⁹ Fe, SFE-171 e FeSO ₄ , no leite.	SFE: 12% abs. FeSO ₄ : 8% abs. (p < 0,01)
LYSIONEK <i>et al</i> (2002)	SFE-171	Avaliar a biodisponibilidade de SFE-171 e de FeSO ₄ , no leite em pó, em ratos .	FeSO ₄ : 43% abs. SFE-171: 42% abs. 98% absR ²

¹: porcentagem de absorção

²: porcentagem de absorção relativa

Quadro 6: Relatos na literatura de porcentagem de absorção e de absorção relativa ao FeSO_4 de ferro bisglicina quelato e de ferro eletrolítico.

AUTORES	FONTE DE FERRO	OBJETIVOS	RESULTADOS
A) Ferro bisglicina quelato			
FOX <i>et al</i> (1998)	ferro glicina FeSO_4	Avaliação, em crianças não-anêmicas, da biodisponibilidade das duas fontes quando adicionadas a purê de vegetais para bebês.	Glicina: 9% abs ¹ . FeSO_4 : 10% abs.
PINEDA & ASHMEAD (2000)	ferro glicina FeSO_4	Avaliação da biodisponibilidade de xaropes dos dois compostos, em crianças anêmicas.	Não houve diferença entre os grupos na % abs.
LAYRISSE <i>et al</i> (2000)	Ferro glicina FeSO_4	Avaliar o efeito do fitato e polifenóis na absorção de ferro (1 homem, 12 mulheres)	Glicina: 11% abs 220% absR FeSO_4 : 5% abs
B) Ferro eletrolítico (Fe^0)			
ANDERSON <i>et al</i> (1974)	$\text{Fe}^0 < 40\mu\text{m}$ FeSO_4	Avaliação da biodisponibilidade de diferentes fontes de ferro em leitões em miniatura, não anêmicos	Fe^0 : 21% abs 70% absR FeSO_4 : 30% abs 100%absR ²
SACKS & HOUCHIN (1978)	$\text{Fe}^0 < 40\mu\text{m}$ FeSO_4	Avaliação da biodisponibilidade de diferentes fontes de ferro em ratos anêmicos.	Fe^0 : 48% absR
HOWARD <i>et al</i> (1993)	Fe^0 10-20 μm (35%) < 10 μm (40%) FeSO_4	Avaliação da biodisponibilidade de Fe^0 em cereais pelo método de repleção de Hb em leitões.	Fe^0 : 8% abs 40% absR FeSO_4 : 20% abs 100% absR
LYSIONEK <i>et al</i> (2000)	Fe^0 SFE-171 FeSO_4	Determinação da biodisponibilidade das diferentes fontes, em ratos.	Fe^0 : 15% abs 34% absR SFE: 43% abs 98% absR FeSO_4 : 44% abs 100% absR

¹: porcentagem de absorção

²: porcentagem de absorção relativa

Os compostos microencapsulados utilizados no nosso ensaio, apesar de apresentarem porcentagem de absorção relativa similar à do $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (NaCMC: 89,5 (25,9) %; alginato: 92,1 (45,2) % - Tabela 6), mostraram resultados um pouco abaixo do que o encontrado por LYSIONEK *et al* (2000) – (Quadro 5). Esta diferença pode ter ocorrido tanto pela utilização de metodologia diferente para avaliar os compostos como pela característica dos polímeros utilizados na microencapsulação. Nossos polímeros foram derivados de celulose e de alginato e testes de dissolução revelaram compostos altamente solúveis em pH ácido (RÉ, 2003), o que, uma vez dentro do trato digestivo, os torna semelhantes ao FeSO_4 , podendo sofrer influência dos fatores inibidores e promotores da absorção de ferro presentes nos alimentos. Já o composto SFE-171 é microencapsulado com lecitina de soja (lipídio). Segundo BOCCIO *et al* (1998) esta microcápsula proporciona lenta liberação do ferro dentro do lúmen intestinal, mas, uma vez liberado este segue o mesmo mecanismo de absorção do FeSO_4 . Possivelmente, a diferente característica de dissolução dos dois compostos e as diferentes metodologias utilizadas para avaliar a biodisponibilidade, sejam responsáveis pelas diferentes porcentagens de absorção e de absorção relativa ao FeSO_4 observadas entre os mesmos.

De acordo com a tabela 6, verifica-se que o grupo que recebeu ferro quelado com metionina obteve 13,3 (2,9)% de absorção e 105,9 (60,5)% de absorção relativa ao $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sendo, portanto, similar à este.

Em humanos, a utilização de quelatos de ferro para o tratamento da anemia por deficiência de ferro tem demonstrado grande eficácia. Entretanto, diferentemente do ferro quelado com metionina utilizado no nosso ensaio, a fonte de ferro mais utilizada nesses estudos é a de glicinato ferroso, um composto com elevada biodisponibilidade (Quadro 6).

No Brasil, TORRES *et al* (1996) e TUMA *et al* (2003), observaram redução da prevalência de anemia, em crianças que receberam alimentos

fortificados com ferro bisglicina quelato (leite e farinha de mandioca, respectivamente, adicionados de 3 mg Ferrochel®). Nesses trabalhos, porém, não se fez a comparação com o sulfato ferroso.

Em leitões, KEGLEY *et al* (2002), conduziram um experimento para avaliar a utilização de ferro quelado com metionina como fonte de ferro para leitões recém-nascidos. O ferro injetável mostrou ser a melhor fonte de ferro para estes animais, mas a biodisponibilidade relativa de ferro quelado com metionina recebido via oral no terceiro dia foi maior que a do sulfato ferroso recebido pela mesma via.

A utilização de ferro como quelatos protege o mineral da reação com diversos constituintes da dieta, aumentando, portanto, a sua biodisponibilidade (FOX *et al*, 1998; PINEDA & ASHMEAD, 2000). Segundo ASHMEAD & JEPPSEN (1993), a maior biodisponibilidade do glicinato de ferro ocorreria em função de este composto ser absorvido intacto pelas células epiteliais do intestino, provavelmente, via mecanismo de transporte ativo. Entretanto, os estudos de biodisponibilidade deste composto mostram-se divergentes quanto à sua biodisponibilidade (Quadro 7), o que pode estar relacionado à pureza do mesmo.

Em nosso ensaio, os resultados de porcentagem de absorção e de porcentagem de absorção relativa ao $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ do ferro quelado com metionina, mostraram um composto com elevada biodisponibilidade, similar ao sulfato ferroso.

A porcentagem de absorção e de absorção relativa ao $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ do grupo que recebeu dieta fortificada com ferro eletrolítico foi 12,8 (4,3)% e de 93,1(58,4) %, respectivamente (Tabela 6). Estes resultados não diferiram daqueles encontrados para os demais grupos experimentais ($p = 1,000$), mostrando similaridade entre eles.

O ferro reduzido é considerado uma fonte atrativa para a fortificação de alimentos em função do seu baixo custo, da estabilidade na farinha durante estoque prolongado e pela manutenção de suas propriedades durante o processo de cozimento (SACKS & HOUCHIN, 1978).

Por ser um composto inerte, o ferro reduzido não promove o desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis nos alimentos (SHAH *et al*, 1977). Segundo HOWARD *et al* (1993), o ferro reduzido é oxidado a Fe^{+2} ou Fe^{+3} quando exposto ao meio ácido do estômago, tomando-se disponível para absorção na porção proximal do intestino.

As principais características que influenciam a absorção de ferro reduzido são o tamanho e a forma das partículas e a área superficial, uma vez que estas influenciam sua dissolução no suco gástrico (HURREL *et al*, 2002).

RASMUSSEN *et al* (1976), compararam a biodisponibilidade de diferentes amostras de ferro reduzido e concluíram que a área superficial e a razão de dissolução das partículas, e não o seu tamanho, são os melhores preditores da sua biodisponibilidade. Todavia, a maioria dos trabalhos com ferro reduzido, utiliza como referência apenas o tamanho da partícula e a variedade de resultados obtidos pode ser decorrente deste fato (Quadro 6).

No fígado (Tabela 7), um compartimento de reserva corporal de ferro, não houve diferença entre todos os grupos experimentais quanto ao peso do fígado, ferro total, ferro heme e ferro não-heme ($p > 0,05$). Todavia, houve tendência a maior concentração de ferro total e de ferro não-heme para os grupos PFe150 e PFe200, confirmando o sulfato ferroso como uma fonte de ferro com alta biodisponibilidade.

Apenas um relato foi encontrado na literatura, utilizando leitões como modelo animal, relacionando dieta fortificada com ferro eletrolítico com os estoques de ferro no fígado. ANDERSON *et al* (1974), trabalharam com leitões com cinco dias de idade, não anêmicos, tratados com dietas com

diferentes fontes de ferro, mas com semelhante concentração do mineral (64 a 69 mgFe/kg dieta). Não houve diferença no peso do fígado entre os grupos que receberam ração fortificada com sulfato ferroso e com ferro eletrolítico (168,3 e 168,2g, respectivamente), mas o grupo que recebeu ferro eletrolítico mostrou tendência a maior concentração final de hemoglobina (10,3 g/dL contra 9,6 g/dL) e a maior concentração de ferro total no fígado (61,45 μ g/g contra 47,91 μ g/g). Os autores concluíram que a melhor biodisponibilidade do ferro eletrolítico que a do sulfato ferroso ocorreu em função do pequeno tamanho das partículas do composto utilizado no ensaio (0 a 40 μ m).

Em nosso trabalho, o ferro eletrolítico tinha partículas com tamanho médio de 20 μ m, e os resultados obtidos para este grupo não diferiram dos demais grupos estudados, em todos os parâmetros avaliados. Entretanto, a tendência a menor concentração de ferro total, ferro heme e ferro não-heme no fígado dos animais deste grupo, nos faz acreditar que este composto foi o menos disponível de todos.

Ainda de acordo com a tabela 7, verifica-se que os leitões do grupo controle, apresentaram a maior concentração hepática de ferro total (317,2(42,6) μ g/g) e de ferro-não heme (308,1 (44,6) μ g/g) ($p < 0,05$), estando muito acima dos valores encontrados na literatura (Quadro 7). Isto pode ter ocorrido porque estes leitões só receberam a dose total de ferro dextrano (200mg) quando estavam com 21 dias de idade, período em que foi iniciada a primeira fase do experimento. Esta dose, necessária aos animais nos primeiros dias de vida em função, tanto do pequeno estoque de ferro corporal como do seu rápido crescimento, mostrou-se, portanto, elevada quando aplicada após esta fase, refletindo alto estoque no fígado.

Quadro 7: Relatos na literatura da concentração de ferro total ($\mu\text{g/g}$) no fígado de leitões alimentados com rações fortificadas com FeSO_4 .

REFERÊNCIA	OBJETIVO	MÉTODO	Peso Fígado (g)	FERRO TOTAL ($\mu\text{g/g}$)
ANDERSON <i>et al</i> (1974)	Avaliar a biodisponibilidade de diferentes fontes de ferro em leitões miniatura, não-anêmicos, com 33 dias de idade (68mgFe/kg ração)	Determinação em EAA	168	48,0
BERTO <i>et al</i> (1997)	Avaliar o efeito da adição de Cu e Zn na ração, sobre a deposição de minerais no fígado de leitões não-anêmicos, com 44 dias de idade. (300 mgFe/kg ração)	Determinação em EAA	-	97,0
YU <i>et al</i> (2000)	Avaliar a biodisponibilidade de ferro em leitões anêmicos, com 30 dias de idade. (100mgFe/kg ração)	Determinação em EAA	397	62,0

Ao longo do ensaio, avaliaram-se as diferentes fontes de ferro testadas quanto a incidência de efeitos colaterais no trato gastrintestinal dos leitões (Tabela 8).

Segundo COOK *et al* (1982), a incidência de efeitos como náusea e desconforto epigástrico, variam de 10 a 25% em pacientes que recebem doses orais de ferro. Tais sintomas poderiam estar correlacionados com a alta concentração do ferro no lúmen intestinal. Entretanto, quando os autores compararam a incidência destes efeitos em pacientes recebendo compostos de ferro com liberação controlada (Feosol Spansule®) e de sulfato ferroso líquido (Feosol®), não encontraram diferença entre as duas formas.

NAUDE *et al* (2000), avaliaram a incidência de efeitos colaterais de sulfato ferroso (Fer-in-Sol®) e de um composto de FeIII não iônico (complexado com polissacarídeos de baixo peso molecular)(Ferricure®). Os resultados obtidos não mostraram diferença na incidência de tais efeitos entre os dois compostos estudados, mas houve tendência a maior incidência de efeitos colaterais no trato gastrintestinal nos grupos que receberam sulfato ferroso.

Os resultados obtidos no nosso ensaio, foram calculados considerando apenas os leitões que, no início da fase de repleção, estavam sem diarreia. Em função do pequeno número de animais utilizados para fazer este cálculo, não foi feita avaliação estatística desses resultados. A sobreposição de valores do Intervalo de Confiança indica que os resultados não foram diferentes. Entretanto, os grupos que receberam sulfato ferroso mostraram forte tendência a maior incidência de diarreia, sendo este, entre outros, um aspecto negativo na utilização destes compostos na fortificação de alimentos.

Este efeito merece ser melhor estudado.

7. Comentários

Ficou evidente em nosso trabalho que os compostos de ferro microencapsulado, de ferro quelado com metionina e de ferro eletrolítico apresentaram alta biodisponibilidade, comparável à do sulfato ferroso..

Entretanto, a utilização de sulfato ferroso na fortificação de alimentos tem, como aspecto negativo, a interação do composto com o alimento , diminuindo ao vida de prateleira e provocando alterações organolépticas.

Nas rações dos leitões, das alterações organolépticas observadas, foi possível verificar que a ração fortificada com ferro quelado apresentou um odor característico deste aminoácido, o que pode prejudicar seu uso para fortificação de alimentos.

Na ração fortificada com ferro microencapsulado com NaCMC a cor da ração ficou mais escura no decorrer do experimento. Este fato não diminuiu a ingestão pelos animais, mas tem que ser considerado quando de seu uso em humanos. Já a ração fortificada com ferro microencapsulado com alginato não mostrou alteração aparente.

Dados ainda não publicados mostram que a disponibilidade do ferro microencapsulado com alginato adicionado na farinha de trigo, não diminuiu ao longo do tempo , indicando que a microcápsula protegendo o sulfato ferroso o torna inerte e, portanto, protege o alimento de mudanças organolépticas indesejáveis.

Estes resultados, além dos resultados obtidos no nosso ensaio, indicam que o melhor composto a ser utilizado na fortificação de alimentos é o composto de ferro microencapsulado com alginato, que além de se mostrar similar ao sulfato ferroso em todos os parâmetros avaliados, tem como aspecto positivo possibilitar uma maior vida de prateleira ao alimento.

8. CONCLUSÕES

✦ A biodisponibilidade do ferro microencapsulado com NaCMC e do ferro microencapsulado com alginato, no modelo depleção/repleção de hemoglobina em leitões, foi de 14,7 (2,9) e 15,1 (3,8)%, respectivamente, igual à de ferro quelado com metionina e de ferro reduzido eletroliticamente (13,3 (2,9) e 12,8 (4,3)%, respectivamente).

✦ A biodisponibilidade relativa ao $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dos compostos de ferro foram: ferro microencapsulado com NaCMC: 89,5 (25,9); ferro microencapsulado com alginato : 92,1 (45,2) %; ferro quelado com metionina : 105,9 (60,5)%; ferro reduzido eletroliticamente: 93,1 (58,4)%, não sendo significativamente diferentes ($p > 0,05$).

✦ Os grupos fortificados com $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ apresentaram tendência a maior porcentagem de diarreia, não confirmada estatisticamente.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALBERICO, A.P.M.; VEIGA, G.V.; BAIÃO, M.R.; SANTOS, M.M.A.S.; SOUZA, S.B.; SZARFARC. Iron deficiency anaemia in infants attended at municipal primary health care centres in Rio de Janeiro – Brazil, *Nutr.Food Sci.*, v.33(2):50-55, 2003.
- ANDERSON, T.A.; FILER, L.J.; FOMON, S.J.; ANDERSEN, D.W.; NIXT, T.L.; ROGERS, R.R.; JENSEN, R.L.; NELSON, S.E. Bioavailability of different sources of dietary iron fed to Pitman-Moore miniature pigs. *J. Nutr.*, v.104:619-627, 1974.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária . Resolução RDC nº 344 de 13 de dezembro de 2002 – D.O.U. de 18/12/2002.
- ASHMEAD, H.D.; JEPPSEN, R.B. Enhanced tissue metabolism of minerals chelated to amino acids. Apud: FOX, T.E.; FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Bioavailability of iron glycine as a fortificant in infant food. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.67:664-668, 1998.
- ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 13.ed. , p.505, 1980.
- BALASSA, L.L; FANGER, G.O. Microencapsulation in the food industry. *Crit.Rev.Food Tech.*, v.2:245-65, 1971.
- BENITO, P.; MILLER, D. Iron absorption and bioavailability: an update review. *Nutr.Res.*, 18(3):581-603, 1998.
- BERNER, L.A.; CLYDESDALE, F.M.; DOUGLASS, J.S. Fortification contributed greatly do vitamin and mineral intakes in the United States, 1989-1991. *J. Nutr.*, v.131:277-2183, 2001.
- BERTO, D.A.; CURI, P.R.; WATANABE, L.G. Efeitos da adição de cobre e zinco nas rações sobre a deposição de minerais no fígado, baço e rins

rins de leitões. Anais da XXXIV Reunião da SBZ, 28 de julho a 1º de agosto, 1997, Juiz de Fora – MG.

BERTOL, T.M.; LUDKE, J.V.; MORES, N. Efeito de diferentes fontes proteicas sobre desempenho, composição corporal e morfologia intestinal em leitões. *Rev. Bras. Zootec.*, v.29(6):1735-1742, 2000.

BOCCIO, J.R.; ZUBILLAGA, M.B.; CARO, R.A.; GOTELLI, C.A.; GOTELLI, M.J.; WEILL, R. Bioavailability and stability of microencapsulated ferrous sulfate in fluid milk: studies in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v.42:233-239, 1996.

BOCCIO, J.R.; ZUBILLAGA, M.B.; CARO, R.A.; GOTELLI, C.A.; GOTELLI, M.J.; WEILL, R. A new procedure to fortify fluid milk and dairy products with high bioavailable ferrous sulfate. *Nutr.Rev.*, v.55(6):240-46, 1997

BOCCIO, J.R.; ZUBILLAGA, M.B.; CARO, R.A.; LYSIONEK, A.; GOTELLI, C.A.; GOTELLI, M.J.; WEILL, R. Bioavailability, absorption mechanism, and toxicity of microencapsulated iron (II) sulfate. Studies in mice. *Biol. Trace Elem. Res.*, v.62:65-73, 1998.

BJÖRN-RASMUSSEN, E.; HALLBERG, L.; ROSSANDER, L. Absorption of fortification iron. *Br.J.Nutr.*, v.37:375-389, 1977.

BRUNKEN, G.S.; GUIMARÃES, L.V.; FISBERG, M. Anemia em crianças de 3 anos que frequentam creches públicas em período integral. *J. Pediatr.*, v.78(1):50-56, 2002.

BUCHOWSKI, M.J.; MAHONEY, A.W.; KALPATHIKA, M.P.V. Nonheme iron absorption, apparent and hemoglobin regeneration efficiency in anemic and normal rats fed with dietary heme and non heme iron at various levels. *Nutr. Res.*, v.9:773-783, 1989.

- BUSTAD, L.K.; McCLELLAN, R.O. Swine in Biomedical Research. In: MILLER, E.R.; ULLREY, D.E. The pig as a model for human nutrition. *Ann.Rev.Nutr.*, v.7:361-82, 1987.
- CARDOSO, M.A.; FERREIRA, M.V.; CAMARGO, L.M.A.; SZARFARC, S. Anemia em população de área endêmica de malária, Rondônia (Brasil). *Rev.S.Públ.*, v.26(3):161-6, 1992.
- CONRAD, M.E.; UMBREIT, J.N. Pathways of Iron Absorption. *Blood cells, Molecules and Diseases*, v.29(3):336-355, 2002.
- COOK, J.; LAYRISSE, M.; FINCH, C. The measurement of iron absorption. *Blood*, 33:421-29, 1969.
- COOK, J.D.; LIPSCHITZ, D.A.; SKIKNE, B.S. Absorption of controlled-release iron. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v.32(4):531-539, 1982.
- COOK, J.D.; REUSSER, M.E. Iron fortification: an update. *Am.J.Clin.Nutr.*, 38:648-659, 1983.
- COOK, J. Determinants of nonheme iron absorption in man. *Food Tech.*, v.37(10):124-126, 1983.
- COOK, J.D. Adaptation in iron metabolism. *Am.J.Clin.Nutr.*, v.51:301-8, 1990.
- CONRAD, M.E.; UMBREIT, J.N.; MOORE, E.G. Iron absorption and transport. *Am.J.Med.Sci.*, v.318:213-229, 1999.
- CROSBY, W.H. Iron deficiency anaemia in a nutritionally complex situation. *Am. J. Clin.Nutr.*, v.32:715-16, 1979.
- DeMAYER, E.M. Preventing and controlling iron deficiency anaemia through primary health care: a guide for health administrators and programme managers. *World Health Organization*, Geneva, 1989.

DRABKIN, D.L.; AUSTIN, J.H. Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulphhemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v.112:51-65, 1935.

DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Tech.*, v.42(3-4):137-51, 1988.

FAIRWEATHER-TAIT, S.; Iron Biochemistry. In: Iron Nutritional and physiological significance. The report of the British Nutrition Foundation's Task Force. London, CHAPMAN & HALL ed., 1995.

FAO/WHO Micronutrient deficiencies and preventing specific micronutrient Deficiencies, Rome, 1992.

FISBERG, M. Utilização de suplemento alimentar enriquecido com ferro na prevenção de anemia em pré-escolares. *Rev.Ped.Moderna.*, v.32:753-57, 1996.

FISBERG, M.; NAUFEL, C.C.S.; BRAGA, J.A.P. National prevalence of Anaemia in Pré School Brazil: 10 Capitals Survey. *Annals of Nutrition & Metabolism*, v. 45 (Suppl 1), 2001.

FISBERG, M.; LIMA, A.M.; RHEIN, S.O.; NAUFEL, C.; RODRIGUES, C.; OLIVEIRA, S. Feijão enriquecido com ferro na prevenção de anemia em pré-escolares. *Nutrição*, n.59:10-19, 2003.

FORBES, A.L.; ADAMS, C.E.; ARNAUD, M.J.; CHICHESTER, C.O.; COOK, J.D.; HARRISON, B.N.; HURRELL, R.F.; KAHN, S.G.; MORRIS, E.R.; TANNER, J.T.; WHITTAKER, P. Comparison of in vitro, animal, and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutritional Anemia Consultative Group Task Force report on iron bioavailability. *Am.J.Clin.Nutr.*, v.49:225-38, 1989.

- FOX, T.E.; FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Bioavailability of iron glycine as a fortificant in infant food. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.67:664-668, 1998.
- FRITZ, J.; PLA, G.; HARRISON, B.; CLARK, G. Estimation of the bioavailability of iron. *J.Am.Assoc.Anal.Chem.*, v.58:902-905, 1975.
- FURUGOURI, K. Effect of elevated dietary levels of iron on iron store in liver, some blood constituents and phosphorus deficiency in young swine. *J. Ani. Sci.*, v. 34 (4):573-77, 1972.
- GOTELLI, C.A.; GOTELLI, M.J.; BOCCIO, J.R.; ZUBILLAGA, M.B.; CARO, R.A.; DEL RIO, H.G.; WEILL, R. Bioavailability of microencapsulated ferrous sulfate in fluid milk studies in human beings. *APPTLA*, v.46:239-245, 1996.
- HALLBERG, L. Bioavailability of dietary iron in man. *Ann.Rev.Nutr.*,v.1:123-47, 1981.
- HALLBERG, L.; BRUNE, M.; ERLANDSSON, M.; SANDBERG, A.S.; ROSSANDER-HULTÉN, L. Calcium: effect of different amounts on nonheme and heme-iron absorption in humans. *Am.J. Clin. Nutr.*, v.53 (1): 112-19, 1991.
- HALLBERG, L.; ALNWICK, D.; LOFTI, M.; VITERI, F. Food fortification. **In:** Guidelines for the control of iron deficiency in countries os the Eastern Mediterranean Middle East and Noth Africa, WHO/UNICEF, Iran, 1995.
- HALLBERG, L. Perspectives of nutritional iron deficiency. *Ann.Rev.Nutr.*, v.21:1-21, 2001.
- HASWELL, S.J. Atomic Absorption Spectrometry -- Theory, Design and Applications, Elsvier Sci. Publishers B.V. ed, Amsterdam, 1991, 255p.
- HORNSEY, H.C. Estimation of the Nitric oxid-Haem Pigments. *J.Sci.Food Agric.*, v.7:534-40, 1956.

- HOWARD, L.; BUCHOWSKI, M.; WANG, B.J.; MILLER, D.D. Bioavailability of eletrolytic iron in fortified infant cereal determined by hemoglobin repletion in piglets. *Nutr. Res.*, v.13:287-295, 1993.
- HURREL, R.; BOTHWELL, T.; COOK, J.D.; DARY, O. ; DAVIDSSON, L.; FAIRWEATHER-TAIT, S.; HALLBERG, L.; LYNCH, S.; ROSADO, J.; WALTER, T.; WHITTAKER, P. The usefulness of Elemental Iron for Cereal Flour Fortification: A SUSTAIN Task Force Report, *Nutr. Rev.*, v.60(12):391-406, 2002.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*, 3 ed. v.1:533, 1985.
- JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulated iron for food fortification. *J. Food Sci.*, v.4:1047-51, 1991.
- KEGLEY, E.B.; SPEARS, J.W.; FLOWERS, W.L.; SCHOENHERR, W.D. Iron methionine as a source of iron for the neonatal pig. *Nutr. Res.*, v.22:1209-17, 2002.
- KERR, B.J.; YEN, J.T.; NIENABER, J.A.; EASTER, R.A. Influences of dietary protein level, aminoacid supplementation and enviromental temperature on perfomance, body composition, organ weights and total heat production of growing pigs. *J. Ani. Sci.*, v.81(8):1998-2007, 2003.
- LATUNDE-DADA, G.O.; BIANCHI, M.L.P.; OLIVEIRA, J.E.D. On the methods for studying the mechanisms and bioavailability of iron. *Nutr.Rev.*, v.56(3):76-80, 1998.
- LAYRISSE, M.; GARCIA-CASAL, M.N.; SOLANO, L.; BARON, M.A.; ARGUELLO, F.; LLOVERA, D.; RAMIREZ, J.; LEETS, I.; TROPPER, E. Iron bioavailability in humans from breakfasts enriched with iron bis-glycine chelate, phytates and polyphenols. *J. Nutr.*, v.130:2195-2199, 2000.

- LEE, K.; CLYDESDALE, F.M. Iron source in food fortification and their changes due to food processing. *Crit.Rev.Food Sci.Nutr.*, v.19:117-53, 1979.
- LIEU, P.T.; HEISKALA, M.; PETERSON, P.A.; YANG, Y. The roles of iron in health and disease. *Molec.Asp.Med.*, v.22:1-87, 2001.
- LOZOFF, B.; JIMENEZ, E.; WOLF, A. W. Long Term development outcome of infants with iron deficiency. *N.Engl.J.Med.*, v.325:687-694, 1991.
- LOZOFF, B.; BRITTENHAM, G.M.; WOLF, A. W. Iron deficiency anemia and iron therapy: effect on infant developmental test performance. *Pediatric*, v.79:981-95, 1987.
- LYSIONEK, A.E.; ZUBILLAGA, M.B.; SALGUEIRO, M.J.; SARABIA, M.I.; CARO, R.A.; WEILL, R.; BOCCIO, J.R. Study of industrial microencapsulated ferrous sulfate by means of the prophylatic-preventive method to determine its bioavailability. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v.46:125-129, 2000.
- LYSIONEK, A.E.; ZUBILLAGA, M.B.; SALGUEIRO, M.J.; P, A.; CARO, R.A.; WEILL, R.; BOCCIO, J.R. *Nutr.*, v.18:279-281, 2002.
- MacPHAIL, A.P. Iron deficiency and the developing world. *Arch.Lat.Nutr.*, v. 51 (Supl.1), 2001.
- MAHAN, D.C. Evaluating two sources of dried whey and the effects of replacing the corn and dried whey component with corn gluten meal and lactose in the diets of wealing pigs. *J. Ani. Sci.*, v.71(11):2860-66, 1993.
- MEHANSHO, H. Eradication of iron deficiency anemia through food fortification: the role of the private sector. *J.Nutr.*, v.132:831-33, 2002.
- MERCK index. *Na encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 11.ed. Rahway:Merck, 1989. 1605p.

MILLER, D. Comunicação pessoal, 2002

MILLER, E.R.; PARSONS, M.J.; ULLREY, D.E.; KU, P.K. Bioavallability of iron from ferric choline citrate and a ferric copper cobalt choline citrate complex for young pigs. *J. Animal Sci.*, v.52(4):783-90, 1981.

MILLER, E.R.; ULLREY, D.E. The pig as a model for human nutrition. *Ann.Rev.Nutr.*, v.7:361-82, 1987.

MILLER, J. Assessment of dietary iron availability by rat hemoglobin repletion assay. *Nutr. Rep. Int.*, v.26(6):993-1005, 1982.

MIRANDA, A.S.; FRANCESCHINI, S.C.C.; PRIORE, S.E.; EUCLYDES, M.P.; ARAÚJO, R.M.A.; RIBEIRO, S.M.R.; PEREIRA NETTO, M.; FONSECA, M.M.; ROCHA, D.S.; SILVA, D.G.; LIMA, N.M.M.; MAFFIA, U.C.C. Anemia ferropriva e estado nutricional de crianças com idade de 12 a 60 meses do Município de Viçosa, MG. *Rev. Nutr.*, v.16(2):163-169, 2003

MONSEN, E.R.; HALLBERG, L.; LAYRISSE, M.; HEGSTED, M.; COOK, J.D.; MERTZ, W.; FINCH, C.A. Estimation of available dietary iron. *Am.J.Clin.Nutr.*, v.31:134-141, 1978.

MONTEIRO, C.A.; SZARFARC, S.C. Estudo das condições de saúde das crianças no Município de São Paulo, SP (Brasil), *Rev.S.Públ.*, v.21(3):255-260, 1987.

MONTEIRO, C.A.; SZARFARC, S.C.; MONDINI, L. Tendência secular da anemia na infância na cidade de São Paulo (1984-1996), *Rev.S.Públ.*, v.34(Supl.6):62-72, 2000.

MOUGHAN, P.J.; BIRTLES, M.J.; CRANWELL, P.D.; SMITH, W.C.; PEDRAZA, M. The piglet as a model animal for studying aspects of digestion and absorption in milk-fed human infants. *World Rev.Nutr.Diet.*, v.67:40-113, 1992.

- NARASINGA RAO, B.B. Methods for the determination of bioavailability of trace metals: a critical evaluation. *J. Food. Sci. Techn.*, 31(5):353-61, 1994.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. In: Nutrient Requirements of Swine, 10th ed, National Academy Press, 1998.
- NAUDE, S.; CLIJSEN, S.; NAULAERS, G.; DANIELS, H.; VANHOLE, C.; DEVLIEGER, H. Iron supplementation in preterm infants: a study comparing the effect and tolerance of a Fe²⁺ and a nonionic FeIII compound. *J. Clin. Pharmacol.*, v.40:1447-1451, 2000.
- NEUMAN, N.A.; TANAKA, O.Y.; SZARFARC, S.C.; GUIMARÃES, P.R.V.; VICTORA, C.G. Prevalência e fatores de risco para anemia no Sul do Brasil, *Rev. Saúde Públ.*, 34(1):56-63, 2000.
- OLIVEIRA, R.S.; DINIZ, A.S.; BENIGNA, M.J.C.; MIRANDA-SILVA, S.M.; LOLA, M.M.; ASCIUTTI-MOURA, L.; RIVERA, M.A.; SANTOS, L.M.P. Magnitude, distribuição espacial e tendência da anemia em pré-escolares da Paraíba. *Rev. S.Públ.*, v.36(1):26-32, 2002.
- PEKAS, J.C. Versatile swine laboratory apparatus for physiologic and metabolic studies. *J. Ani. Sci.*, v. 27(5), 1968.
- PINEDA, O.; ASHMEAD, H.W. Effectiveness of treatment of iron-deficiency anemia in infants and young children with ferrous bis-glycinate chelate. *Nutr.*, v.17:381-384, 2001.
- PINTO, T.A.; COLLI, C.; AREAS, J.A.G. Effect of processing on iron bioavailability of extruded bovine lung. *Food Chem.*, v.60(4):459-463, 1997.
- POLTRONIERI, F.; ARÊAS, J.A.G.; COLLI, C. Extrusion and iron bioavailability in chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Food Chem.*, v.70(2):175-80, 2000.

- QIAN, Z.M.; TANG, P.L. Mechanisms of iron uptake by mammalian cells. *Bioch. Bioph. Acta*, 1269:205-214, 1995.
- QUADROS, A.R.B.; KIEFER, C.; HENN, J.D.; SCARIOT, G.; SILVA, J.H.S. Dietas simples e complexa sobre o desempenho de leitões na fase de creche. *Ciência Rural*, v.32(1):109-114, 2002.
- RASMUSSEN, E.B.; HALLBERG, L.; ROSSANDER, L. Absorption of fortification iron. Bioavailability in man of different samples of reduced Fe, and predction of the effects of Fe fortification. *Br. J. Nutr.*, v.37:375-388, 1976.
- RÉ, M.I. Estudo da microencapsulação de mineral (ferro) por *Spray Drying*. Relatório Técnico final Fapesp DQ/APQ N° 47774, 2000.
- RÉ, M.I. Desenvolvimento de micropartículas de sulfato ferroso modificadas para uso em estudo clínico de combate à anemia ferropriva em pré-escolares. Relatório Técnico Parcial Fapesp n°. 67459, 2003.
- ROSS, G.; HUEBSCHLE, T.; PEHL, U.; BRAUN, H.A.; VOIGT, K.; GERSTBERGER, R.; ROTH, J. Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs. The role of cytokines and prostaglandins. *J. Appl. Phys.*, v.94(4):1395-1402, 2003.
- SACKS, P.V.; HOUCHIN, D.N. Comparative bioavailability of elemental iron powders for repair of iron deficiency anemia in rats. Studies of efficacy and toxicity of carbonyl iron. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.31:566-573, 1978.
- SALZANO, A.C.; TORRES, M.A.A.; BATISTA FILHO, M.; ROMANI, S.A.M. Anemia em crianças de dois serviços de saúde de Recife, PE (Brasil). *Rev. Saúde Públ.*, v.19(6):499-507, 1985.
- SANTOS, T.O. Avaliação da disponibilidade *in vitro* de ferro de sulfato ferroso microencapsulado. Tese apresentada à Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre, 2001.

- SHAH, B.G.; GIROUX, A.; BELONJE, B.; Specifications for reduced iron as a food additive. *J. Agr. Food Chem.*, v.108:473-478, 1977.
- SHAHIDI, F.; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. *Crit.Rev.Food Sci.Nutr.*, v.33(6):501-47, 1993.
- SICHERI, R. Anemia nutricional em crianças menores de 5 anos no Município de São Paulo: papel da dieta na determinação de sua prevalência. Tese apresentada à Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Doutor, 1987.
- SIGULEM, D.M.; TUDISCO, E.S.; GOLDENBERG, P.; ATHAIDE, M.M.M.; VAISMAN, E. Anemia ferropriva no município de São Paulo. *Rev.Saúde Públ.*, v.12(2):168-78, 1978.
- SIGULEM, D.M.; TUDISCO, E.S.; PAIVA, E.R.; GUERRA, C.C.C. Anemia nutricional e parasitose intestinal em menores de 5 anos. *Ver.Paul.Med.*, v.103:308-312, 1985.
- SIIMES, M.A.; REFINO, C.; DALLMAN, P.R. Manifestation of iron deficiency at various levels of dietary iron intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.33:570-574, 1980.
- SILVA, L.S.M.; GIUGLIANI, E.R.J.; AERTS, D.R.G.C. Prevalência e determinantes de anemia em crianças de Porto Alegre, RS, Brasil. *Rev. Saúde Públ.*, v.35(1):66-73, 2001.
- SOARES, N.T.; GUIMARÃES, A.R.P.; SAMPAIO, H.A.C.; ALMEIDA, P.C.; COELHO, R.R. Estado nutricional de lactentes em áreas periféricas de Fortaleza. *Rev. Nutr.*, v.13(2):99-106, 2000.
- SOUTH, P.K.; LEI, X.; MILLER, D.D. Meat enhances nonheme iron absorption in pigs. *Nutr. Res.*, v. 20(12):1749-59, 2000.

- SPARKS, R.E. Microencapsulation. **In:** Encyclopedia of chemical technology. Ed. Kirk-Othmer, 3^a ed. 15, 470-93, 1981.
- STEFANINI, M.L.R.; COLLI, C.; LERNER, B.R.; LEI, D.L.M.; CHAVES, S.P.; DI PIETRO, M.S.; OLIVEIRA, A.A.M.; SZARFARC, S. Anemia e desnutrição em escolares da rede pública do Município de Osasco, São Paulo, Brasil. *Cad.Saúde Públ.*, v.11(3):439-47, 1995.
- SZARFARC, S.; SOUZA, S. Prevalence and risk factor in iron deficiency and anemia. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v.47 (Suppl 1):35-81, 1997.
- TASSANI, P.; SCHAD, H.; HEIMISCH, W.; BERNHARD, A.A.; ETTNER, U.; MENDLER, N.; LANGE, R. Effect of the calcium sensitizer levosimendan on the performance of ischaemic myocardium in anaesthetised pigs. *Card. Drug Ther.*, v.16(5):435-41, 2002.
- TORRES, M.A.A.; SATO, K.; QUEIROZ, S.S. Anemia em crianças menores de dois anos atendidas nas unidades básicas de saúde no Estado de São Paulo, Brasil. *Rer.S. Públ.*, v.28(4):290-4, 1994.
- TORRES, M.A.A.; LOBO, N.F.; SATO, K.; SOUZA, Q.S. Fortificação do leite fluido na prevenção e tratamento da anemia carencial em crianças menores de 4 anos. *Rev.S. Públ.*, v.30:350-57, 1996.
- TUMA, R.B.; YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; MARQUES, H.O. Impacto da farinha de mandioca fortificada com ferro aminoácido quelato no nível de hemoglobina de pré-escolares. *Rev. Nutr.*, v.16(1):29-39, 2003.
- VAN CAMPEN, D.R.; GLAHN, R.P. Micronutrient bioavailability techniques: Accuracy, problems and limitations. *Field Crops Res.*, 60:93-113, 1999.
- VENN, J.A.J. Iron metabolism in piglet anaemia. **Apud** JAIN, N.C. Schalm's Veterinary hematology, Lea and Febiger ed, 4^a ed, 1986.

- VREMEC, M.A.; BORNSTEIN, J.C.; WRIGHT, C.E.; HUMPHREY, A. Differential effects of omega – conotoxin GVIA on cholinergic and non-cholinergic secretomotor neurones in the guinea-pig small intestine. *Br.J.Pharm.*, v.121(2):232-36, 1997.
- WADDELL, J. Bioavailability of iron sources. *Food.Prod.Dev.*, v. 8(2):80-86, 1974.
- WHO/UNICEF – Consultation on strategies for control of iron-deficiency anaemia. Guidelines for the control of iron deficiency in countries of the Eastern Mediterranean Midle East and North Africa, Iran, 1995.
- WILSON, R.H.; LEIBHOLZ, J. Digestion in the between 7 and 35d of age. The digestion of nitrogen in pigs given milk and soya-bean proteins. *Brit. J. Nutr.*, v.45:337-346, 1981.
- YIP, R. Prevention and control of iron deficiency: policy and strategy issues. *J.Nutr.*, v.132:802S-805S, 2002.
- YU, B.; HUANG, W.J.; CHIOU, P.W.S. Bioavailability of iron from amino acid complex in wealing pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.*, v.86:39-52, 1990.
- ZOLLE, M.; WOLINSKY, I.; PADEN, C.A.; HOSKIN, J.C.; LEWIS, K.C.; LINEBACK, D.R.; McCARTHY, R.D. Fortification of non-staple food items whith iron. *Food Tech.*, v. 34:42-47, 1980.
- ZUBILLAGA, M.B.; CARO, R.A.; BOCCIO, J.R.; GOTELLI, C.A.; GOTELLI, M.J.; WEILL, R. New procedure to fortify fluid milk with iron: Metabolic and biochemical study in rats. *Nutr. Res.* , v.16(1):131-137, 1996.

10. ANEXOS

ANEXO 1

Concentração de ferro nos ingredientes da ração

Na tabela A1 estão apresentados os resultados referentes à concentração de ferro nos componentes das rações dos suínos e na água oferecida aos animais.

Tabela A1 – Concentração de ferro nos ingredientes empregados na formulação da dieta base dos suínos e na água oferecida aos animais. Média (D.P.)

Ingrediente	% na ração	Fe (mg/100g)
Milho	58	1,6 (0,1)
Leite em pó desnatado	40	0,2 (0,01)
Água		0,01 ¹

¹Determinação efetuada por método de padrão adicionado

A necessidade de analisar a água destinada ao consumo dos animais deu-se em função da não disponibilização, no local do ensaio, de uma fonte de água desionizada. Segundo o NRC (1998) a razão água:consumo de ração para leitões com 3 semanas de vida varia de 3:1 a 4:1. Desta forma, considerando um consumo médio diário de ração entre todos os grupos de, aproximadamente, 450 g, o consumo de água variou de 1,4 a 1,8 L, levando a uma ingestão de ferro desta fonte de 0,14 a 0,18 mg/dia.

Com relação ao milho e ao leite em pó, a contribuição diária na ração do ferro advindo destes componentes foi de, aproximadamente, 4,5 mg.

Desta forma, água, milho e leite em pó somaram com, aproximadamente, 5 mg de ferro no consumo diário dos leitões. Por se tratar de fontes com baixa biodisponibilidade de ferro e por sua pequena contribuição na concentração total de ferro na dieta, estes valores não foram considerados quando se fez o cômputo da ingestão de ferro diária dos leitões, utilizando-se, para tal, apenas as fontes de ferro acrescentadas em cada dieta

ANEXO 2

CONCENTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NA DIETA BASE

Na tabela 3 estão os resultados da concentração de aminoácidos na dieta base dos leitões.

Tabela 2 – Concentração de aminoácidos na ração-base oferecida aos leitões (g/100g de ração em base integral).

Aminoácido	g/100 g de dieta	Consumo ¹ Diário (g)	NRC (g/dia)
Lisina	1,153	5,2	6,7
Treonina	0,766	3,4	4,3
Metionina	0,430		
Cistina	0,212		
Metionina + Cistina	0,642	3,0	3,8
Alanina	0,857		
Arginina	0,681	3,1	2,7
Ácido Aspártico	1,411		
Ácido Glutâmico	3,997		
Glicina	0,451		
Histidina	0,510	2,3	2,1
Isoleucina	0,830	3,6	3,7
Leucina	1,995	8,9	6,6
Fenilalanina	0,915	7,4 ²	6,2 ²
Serina	1,023		
Tirosina	0,728		
Valina	1,108	4,9	4,6

¹Considerando um consumo médio diário de 450g de ração

²Fenilalanina + Tirosina

ANEXO 3

Evolução do Peso e Hemoglobina

Na Tabela A2 estão descritos os valores do peso , de todos os grupos, nos dias 0, 3, 6, 9 e 13 do início da fase de repleção de hemoglobina.

Tabela A1: Peso (kg) de todos os grupos nos dias 0, 3, 6, 9 e 13 da fase de repleção de hemoglobina. Média (D.P.)

Grupos	Dia 0	Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 13
PFe80	7,8 (1,3)	8,7 (1,3)	10,0 (1,9)	10,6 (2,0)	11,8(2,1)
PFe150	8,1 (1,2)	8,9 (1,3)	10,0 (1,6)	10,8 (2,1)	11,6 (1,7)
PFe200	7,7 (1,2)	8,5 (1,0)	9,1 (1,3)	9,9 (1,4)	11,3 (1,3)
NaCMC	6,8 (0,6)	7,1 (0,9)	8,3 (0,8)	9,3 (1,0)	10,9 (1,2)
Alginato	6,3 (1,5)	7,0 (1,5)	8,2 (1,9)	9,0 (2,1)	10,7 (2,3)
Fe quelado	6,5 (1,1)	7,3 (1,4)	8,5 (1,8)	9,6 (2,2)	11,2 (2,9)
Fe eletrolít	6,5 (1,1)	7,3 (1,4)	8,5 (2,1)	9,4 (2,9)	10,9 (3,3)
Controle	7,1 (1,4)	7,9 (1,5)	9,2 (1,4)	10,3 (1,7)	11,6 (1,8)

Na Tabela A3 está descrita a evolução da hemoglobina nos dias 0, 3, 6, 9 e 13 da fase de repleção de hemoglobina.

Tabela A3: Evolução da concentração de hemoglobina (g/dL), de todos os grupos, na fase de repleção de hemoglobina. Média (D.P.)

Grupos	Dia 0	Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 13
PFe80	6,4 (0,6)	7,3 (0,8)	8,4 (1,0)	8,9 (1,3)	9,5 (0,9)
PFe150	6,0 (1,1)	6,8 (1,1)	8,1 (1,2)	9,2 (1,4)	10,1 (1,0)
PFe200	6,4 (0,8)	7,4 (0,8)	8,7 (1,0)	9,8 (0,8)	9,7 (0,9)
NaCMC	6,9 (1,1)	7,2 (1,1)	8,0 (1,0)	8,5 (0,7)	9,7 (0,8)
Alginato	7,3 (1,3)	8,0 (1,2)	8,2 (1,4)	8,9 (2,2)	9,7 (1,8)
Fe quelado	7,1 (1,2)	7,9 (1,1)	8,5 (1,1)	8,8 (1,4)	9,6 (1,4)
Fe eletrolít	6,9 (1,4)	7,7 (1,3)	8,2 (1,8)	8,5 (1,2)	9,4 (1,4)
Controle	8,9 (0,9)	9,9 (1,4)	10,0 (1,3)	10,3 (1,3)	11,0 (1,4)

Nas figuras A1 a A3 temos a evolução do peso, da hemoglobina e da variação do *pool* de ferro, com relação ao tempo, dos grupos experimentais estudados. Pelas figuras, pode-se verificar a semelhança na evolução destes parâmetros em todos os grupos.

Figura A1 – Evolução do peso (kg) dos grupos experimentais com relação aos dias de recuperação.

Figura A2 – Evolução na hemoglobina (g/L) dos grupos experimentais em relação aos dias de recuperação.

Figura A3 – Evolução no *pool* de ferro (mg) dos grupos experimentais em relação ao período de recuperação.