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

**Biodisponibilidade do zinco em dieta brasileira utilizando técnica
com isótopos estáveis**

Marisilda de Almeida Ribeiro

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

**Orientador:
Profa. Dra. Silvia Maria F. Cozzolino**

**São Paulo
2002**

14.285

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004876

Ficha Catalográfica

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

Ribeiro, Marisilda de Almeida
R384b Biodisponibilidade do zinco em dieta brasileira utilizando
técnica com isótopos estáveis / Marisilda de Almeida Ribeiro. --
São Paulo, 2002.
154p.

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

Orientador: Cozzolino, Silvia Maria Franciscato

1. Biodisponibilidade : Nutrição experimental I. T. II.
Cozzolino, Silvia Maria Franciscato, orientador.

641.1 CDD

Marisilda de Almeida Ribeiro

Biodisponibilidade do zinco em dieta brasileira utilizando técnica
com isótopos estáveis

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2002.

*“TUDO VALE A PENA
SE A ALMA NÃO É PEQUENA”*

Fernando Pessoa

A Deus,

*por fazer-me acreditar, sempre, nas obras de sua criação
e ter colocado tantos “anjos da guarda” em meu caminho.*

Dedico este trabalho,

*Aos meus PAIS (in memoriam),
que me ensinaram a cultivar a perseverança.*

*À minha irmã ARIADNE,
meu cunhado ISSAO e
Sobrinhas JULIANA e BEATRIZ,
pelas aulas de solidariedade e amor ao próximo que recebi.
Minha gratidão pelo carinho, atenção e participação ativa neste
trabalho.*

*Ao meu marido JOÃO e
filhas ARIANE e SORAYA,
por compreenderem e compartilharem comigo, solidários e
carinhosamente, todos os momentos da minha formação e
aperfeiçoamento profissional.*

*Ao colega MAURÍCIO H. KAKAZU,
pelos ensinamentos, estímulo, dedicação e exemplo profissional.*

Em especial,

*À Professora Dra. SILVIA MARIA F. COZZOLINO, pela
dedicação, orientação, oportunidade e confiança que me foram
conferidas.*

AGRADECIMENTOS

“ Qualquer realização é sempre fruto de um trabalho coletivo ”

À Universidade Federal de Pernambuco e colegas do Departamento de Nutrição, pela minha liberação das atividades docentes;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, pelo apoio financeiro que permitiu a realização desta pesquisa;

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pela prestação do auxílio Bolsa;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-IPEN, pela disponibilidade técnica e física de seus laboratórios;

Ao Departamento de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, desta Universidade, pela colaboração durante as coletas sanguíneas e aplicação da dose intravenosa de zinco;

Ao Laboratório Farmoterápica, na pessoa da Dra. Dirce Akamine, pela colaboração no preparo das doses intravenosas de zinco;

À Professora Dra. Telma Ma. B. Biscontini, pelo incentivo para início deste doutoramento;

Aos voluntários deste estudo, pela contribuição em prol da pesquisa no Brasil;

Ao Dr. Thomas Edgard Fox, do Institute of Food Research Norwich Laboratory, UK, pela valiosa colaboração como assessor deste trabalho;

Ao Professor Dr. Jorge Eduardo de Souza Sarkis, pela oportunidade e apoio e orientação técnica para a realização desta pesquisa;

Ao Dr. Issao Yanaguizawa, pelo acompanhamento médico e atenção dedicados aos voluntários durante o desenvolvimento deste estudo;

Ao Dr. Ralf Greiner, pelo auxílio na realização das análises de fitato, pela técnica com HPLC;;

À Professora Dra. Débora I. T. Fávaro e a estagiária Izabel Ma. O. Eiras, pelo auxílio na realização de todas as análises minerais, pela técnica de Ativação de Nêutrons;

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Tullia M. C. C. Filisetti e à técnica Lúcia H. Impalea, pelo auxílio nas realização da análise de fibras numa das refeições do experimento;

À Professora Dra. Ida Caramico Soares, pelos aconselhamentos técnicos em farmácia em apoio a este trabalho, além do carinho e amizade;

À colega Vanessa Coutinho, pela ajuda efetiva durante a coleta dos dados antropométricos;

Ao Dr. Andréas Marten von Salzen, pelo socorro técnico prestado no final deste trabalho;

Ao Dr. Jack Dainty, pela inestimável ajuda na realização dos cálculos desta pesquisa;

A Kátia Mayumi Baba, minha dedicada aluna de Iniciação Científica, pela inesquecível colaboração nesta pesquisa, especialmente, durante a coleta de dados e preparo das amostras;

À colega Irland B. Gonzaga e Gilberto Simione, pela inestimável ajuda para a separação das frações sangüíneas nas amostras coletadas durante o desenvolvimento do plano piloto;

Ao Luiz Cláudio Silva, pelo apoio e ensinamentos técnicos prestados;;

Aos colegas do Laboratório de Minerais: Adriana de S. Lima, Adriana G. Hertzog, Cláudia Cezar, Elizabete Chicorel, Denise Mafra, Dilina N. Marreiro, Gilberto Simione, Irland B. Gonzaga, Vanessa Coutinho, Vanuska L. Silva, demais colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental: Lourdinha, Joana, Beth (SBAN), Ivani, Helena, Rosangela, Lúcia, Alberto, Márcia, Eliane, Fátima, Raquel, Malu, Luciana, Ana Vládia, Renata, Elma e outros, ainda que aqui não citados, pelo convívio, amizade e permanente espírito de colaboração e solidariedade;

A todos os colegas do Laboratório de Caracterização Isotópica-IPEN, principalmente à secretária Elza, pelo carinho e atenção que me foram dispensados durante quatro anos de convivência;

Às Professoras Célia Colli, Marilene De V. C. Penteado, Bernadette D. G. Franco e Prof. Fernando S. Moreno, pelo estímulo e consideração nos momentos de desalento;

AGRADECIMENTOS

A Rozeli T. Balestrim, pela colaboração durante a fase de análise deste trabalho pelo Comitê de Ética;

A Ma. Ap. R. S. Hóz e Sílvia I. S. Lacerda, do Departamento de Compras, pela paciência e dedicação a mim dispensadas, na fase de aquisição de material importado;

A Ângela M. L. Oliveira, Izabel C. B. Alves, Mônica D. Perussi, Tânia Cacheiro e Catarina A. Marocco, secretárias do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental bem como, à Benedita E. S. Oliveira, Elaine M. Ychico e Jorge A. de Lima, secretários da Pós-Graduação, pelo apoio administrativo e atenção recebidos durante todo o período do curso.

A TODOS MINHA GRATIDÃO

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
3 OBJETIVOS	41
3.1 Geral	42
3.2 Específicos	42
4 METODOLOGIA	43
4.1 Desenho experimental	44
4.2 Casuística e métodos	45
4.2.1 Voluntários	45
4.2.2 Perfil nutricional do grupo	46
4.2.2.1 Medidas antropométricas	46
4.2.2.2 Parâmetros bioquímicos e clínicos	47
4.2.2.3 Inquérito alimentar	47
4.2.3 Preparo das soluções isotópicas e doses oral e intravenosa	48
4.2.4 Dietas	49
4.2.4.1 Planejamento	49
4.2.4.2 Oferta	51

4.2.5 Administração das doses oral e intravenosa	53
4.2.6 Coleta do material biológico	54
4.2.6.1 Sangue	54
4.2.6.2 Urina de 24 horas	55
4.2.7 Avaliação do estado nutricional relativo ao zinco	56
4.2.8 Rastreamento isotópico do zinco urinário	56
4.2.9 Procedimentos analíticos	56
4.2.9.1 Limpeza do material	56
4.2.9.2 Análise química direta das dietas consumidas	57
4.2.9.2.1 Preparo das amostras para análise química	57
4.2.9.2.2 Umidade	58
4.2.9.2.3 Fração cinza ou resíduo mineral fixo.....	58
4.2.9.2.4 Proteínas	58
4.2.9.2.5 Extrato etéreo	59
4.2.9.2.6 Fração fibras	59
4.2.9.2.7 Fração nifext	59
4.2.9.2.8 Energia	59
4.2.9.2.9 Minerais	60
4.2.9.2.10 Fitato	60
4.2.9.3 Determinação do zinco no material biológico	61
4.2.9.3.1 Preparo das amostras de plasma	61
4.2.9.3.2 Preparo das amostras de eritrócitos	62
4.2.9.3.3 Urina	62
4.2.9.4 Preparo das amostras de urina para medidas da razão isotópica do zinco	63
4.2.9.5 Medidas da razão isotópica do zinco na urina	64

4.3 Análise estatística	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 Caracterização dos participantes do estudo	68
5.2 Perfil alimentar do grupo	70
5.2.1 Avaliação antropométrica	70
5.2.2 Avaliação bioquímica e clínica	72
5.2.3 Inquérito Alimentar	74
5.3. Planejamento e avaliação das dietas experimentais	78
5.4. Avaliação do estado nutricional relativo ao zinco	87
5.5. Biodisponibilidade do zinco na dieta	96
6 CONCLUSÕES	101
7 ANEXOS.....	103
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Percentual de energia e de macronutrientes da dieta habitual de cada indivíduo, considerada a média do registro de três dias	76
Figura 2:	Cardápios qualitativos oferecidos aos voluntários na semana do experimento	79
Figura 3:	Percentuais de energia e de macronutrientes obtidos das dietas planejadas e consumidas, analisadas teoricamente e por métodos diretos, respectivamente	83
Figura 4:	Comparação entre as concentrações de zinco, ferro e cálcio nas dietas avaliadas	85
Figura 5	Perfil médio das concentrações de zinco no plasma dos indivíduos, antes (T0), depois do consumo de dietas planejadas durante sete dias (T1) e uma semana após retorno à dieta habitual (T2)	89
Figura 6:	Perfil médio das concentrações de zinco nos eritrócitos dos indivíduos, antes (T0), depois do consumo de dietas planejadas durante sete dias (T1) e uma semana após retorno à dieta habitual (T2).....	90
Figura 7:	Perfil médio das concentrações de zinco na urina dos indivíduos, antes (T0), depois do consumo de dietas planejadas durante sete dias (T1) e uma semana após retorno à dieta habitual (T2)	91
Figura 8:	Perfis individuais das concentrações de zinco no plasma dos indivíduos, antes (T0), depois do consumo de dietas planejadas durante sete dias (T1) e uma semana após retorno à dieta habitual (T2)	92
Figura 9:	Perfis individuais das concentrações de zinco nos eritrócitos dos indivíduos, antes (T0), depois do consumo de dietas planejadas durante sete dias (T1) e uma semana após retorno à dieta habitual (T2)	93
Figura 10:	Perfis individuais das concentrações de zinco na urina dos indivíduos, antes (T0), depois do consumo de dietas planejadas durante sete dias (T1) e uma semana após retorno à dieta habitual (T2)	94
Figura 11:	Distribuição dos indivíduos em relação às concentrações de zinco no plasma, eritrócitos e urina, determinadas em três condições de ingestão dietética	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Caracterização dos participantes do estudo	69
Tabela 2:	Composição corporal e taxa de metabolismo basal dos indivíduos	71
Tabela 3:	Resultados de testes bioquímicos de cada indivíduo	73
Tabela 4:	Média da composição química da dieta habitual do grupo, analisada teoricamente, considerado o registro de três dias.....	75
Tabela 5:	Média da composição das dietas teoricamente planejadas para o período de sete dias, relativa ao grupo.....	80
Tabela 6:	Média da composição química das dietas consumidas pelo grupo no período de sete dias do experimento, analisadas por método direto, em laboratório	81
Tabela 7:	Composição da refeição marcada, analisada por métodos diretos	86
Tabela 8:	Concentrações de zinco no plasma, eritrócitos e urina de cada voluntário, antes(T0) , após consumo de dietas planejadas durante sete dias e uma semana após retorno à dieta habitual (T2)	88
Tabela 9:	Doses intravenosa e oral de zinco administradas a cada voluntário e percentuais de absorção de zinco da refeição marcada, após uma semana de consumo de dieta equilibrada	98

RESUMO

A associação entre distúrbios metabólicos e carência dietética de zinco mostra-se relacionada com o desequilíbrio de nutrientes na dieta, apontado como um fator interferente na biodisponibilidade desse mineral. Este trabalho teve por objetivo, avaliar a biodisponibilidade do zinco em dieta brasileira, adequada em energia e macronutrientes, utilizando técnica com isótopos estáveis. Depois de identificado o perfil alimentar de 12 indivíduos, do sexo masculino, com idade entre 19 e 42 anos, o grupo consumiu, durante 7 dias, uma dieta experimental, equilibrada e variada. No 8º dia do experimento cada indivíduo recebeu uma dose intravenosa de ^{70}Zn e a refeição do almoço marcada, extrinsecamente, com ^{67}Zn , ambos enriquecidos. Os voluntários, com $68 \pm 5\text{ kg}$ e $1,73\text{ m}$, apresentavam-se eutróficos ($\text{IMC}=23 \pm 1$) e clinicamente saudáveis, tendo-se constatado um consumo usual de dieta hiperproteica e hiperlipídica, para a maioria do grupo. A análise direta das dietas consumidas revelou que foi atendida 95% da recomendação de energia para o grupo ($2809 \pm 198,54\text{ kcal}$), distribuída em 16, 26 e 58% para proteínas, lipídios e carboidratos, respectivamente. Ao contrário do Ca ($712 \pm 79\text{ mg}$), as concentrações de Zn ($11,62 \pm 1,55\text{ mg}$) e Fe ($10,65 \pm 1,47\text{ mg}$) superaram as recomendações, e as frações IP5 e IP6 do fitato não foram detectáveis ($<0,01$). Das análises das concentrações de zinco no plasma, eritrócitos e urina, concluiu-se que o estado nutricional, relativo ao zinco, da maioria dos voluntários mostrou-se satisfatório, uma vez estar de acordo com os padrões de referência. O enriquecimento dos isótopos ^{67}Zn e ^{70}Zn na urina de cada indivíduo foi determinado pela técnica de espectrometria de massa por plasma induzido (ICP-MS), revelando percentual de absorção de 30%, com variações entre 11 e 47%. Os resultados indicam que a biodisponibilidade do zinco na dieta avaliada pode ser classificada como sendo de moderada a alta, segundo critérios da OMS.

Marisilda de Almeida Ribeiro

Sílvia Maria Franciscato Cozzolino

“Bioavailability of zinc in the Brazilian diet by the use of a stable isotope technique”

Key words: zinc, bioavailability, diet, stable isotopes.

marisild@hotmail.com

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the bioavailability of zinc in the Brazilian diet, containing the required energy and macronutrients, by the use of a stable isotope technique. Twelve male eutrophic healthy individuals in age between 19 - 42 years were enrolled in the study. The group consumed an experimental diet for a week, corresponding to 95% of the energy requirement (RDA-1989) and composed of 16% protein, 26% fat and 58% carbohydrate. In day eighth of the experiment, an intravenous injection of ^{70}Zn was given to each individual and the meal consumed at lunch was extrinsically labeled with ^{67}Zn , in that both stable isotopes were enriched. The percentage increase, or enrichment, of ^{67}Zn and ^{70}Zn in the urine of each individual was evaluated by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) and showed an average zinc absorption of 30%, variation from 11 to 47%, and a bioavailability from modest to high, according to the WHO criteria.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Microminerais ou elementos traço são denominações dadas a elementos inorgânicos, encontrados em baixas concentrações no organismo humano, representando menos do que 0,005% do peso corpóreo. Considerando o número e a variedade de funções biológicas que desempenham, a importância de muitos desses elementos para a espécie humana é hoje reconhecida, alguns com quantidades dietéticas recomendadas (NRC, 1989a; FNB, 2001). O zinco é um exemplo, podendo assumir valores de absorção entre 15 e 50% do seu conteúdo na dieta (SANDSTRÖM *et al.*, 1993; FAIRWEATER-TAIT, 1997; SALGUEIRO *et al.*, 2000).

A essencialidade do zinco para o homem no entanto, só foi identificada em meados dos anos 60, quando alguns sinais clínicos apresentados por adolescentes hospitalizados, foram relacionados com a deficiência de zinco na dieta. Depois dessa data, décadas de trabalho têm sido dedicadas à elucidação da participação deste mineral em processos bioquímicos no organismo humano. Nesta busca, tanto técnicas *in vitro*, como modelos animais e humanos, têm sido experimentalmente utilizados, (PRASAD, 2001).

Trabalhos *in vitro*, auxiliados pelos avanços dos conhecimentos da biologia celular e molecular, têm demonstrado a atividade e o papel intracelular do zinco na síntese de ácidos nucleicos, como componente de proteínas, estabilizador da membrana celular e em diversos processos enzimáticos (COUSINS & HEMPE, 1991; KREBS *et al.*, 1995; CONNEL, *et al.*, 1997).

O uso do método de depleção e repleção de zinco, em modelo animal, tem permitido relacionar a deficiência desse mineral com repercussões nos tecidos, fluidos biológicos e enzimas consideradas dele dependentes (NISHI, 1996; STALLARD & REEVES, 1997; SHANKAR & PRASAD, 1998).

Em humanos, a importância do zinco tem sido avaliada, depois de constatada a reversão de sinais clínicos, em estudos de suplementação com esse mineral (NINH *et al.*, 1996; ROSADO *et al.*, 1997; SAZAWAL *et al.*, 1997; RIVERA *et al.*, 1998; GARDNER *et al.*, 1998).

Dados da OMS (1998), revelam que dietas de países emergentes, são tidas como deficientes em calorias e proteínas de origem animal, ricas em produtos vegetais, em especial cereais e leguminosas, e consequentemente, pobres em zinco, além de possuírem teores elevados de fibras e fitato, apontados como principais inibidores da absorção de zinco.

Com relação ao Brasil, trabalho realizado por MONDINI & MONTEIRO (1994), utilizando dados de pesquisas nacionais de orçamentos familiares e inquérito sobre consumo de alimentos, verificaram mudanças no padrão alimentar da população urbana brasileira, com resultados indicando redução no consumo de cereais, feijão, raízes e tubérculos; substituição de gordura animal pela de origem vegetal e aumento no consumo de ovos, leite e derivados. Constataram ainda, um consumo de lipídios, com proporção (29,8%) próxima do máximo recomendado pela Organização Mundial da Saúde (30%). Evidenciaram também, o consumo de proteínas na ordem de 12%, com crescimento da participação da proteína animal. Salientam os autores, que as mudanças foram semelhantes nos Estados do Sudeste e Nordeste.

Estudos nas áreas da saúde têm demonstrado, enfaticamente, que o consumo de uma dieta equilibrada em nutrientes, capaz de satisfazer as necessidades do organismo, é uma condição essencial para a manutenção da saúde em humanos (KUBENA & McMURRAY, 1996; BIDLACK, 1996).

Segundo princípios da Ciência da Nutrição, uma dieta deve respeitar quatro leis básicas: quantidade, qualidade, harmonia e adequação. Pedro Escudero acentua que, uma alimentação equilibrada deve conter quantidade suficiente de todos os nutrientes que integram um organismo, respeitando a

relação proporcional entre eles, para a manutenção adequada do balanço e exigência orgânica (TIRAPEGUI & MENDES, 2000).

A partir dos anos 80, diante da premissa de que a quantidade de nutriente presente na dieta pode não garantir sua total utilização pelo organismo, o termo *biodisponibilidade*, antes utilizado, apenas, pela área farmacêutica, foi adotado também em Nutrição, para indicar a proporção do nutriente, realmente utilizada pelo organismo. Em 1997, num encontro de estudiosos realizado na Holanda, foi proposta a atual definição para o termo, como sendo : "fração de qualquer nutriente ingerido que tem o potencial para suprir demandas fisiológicas em tecidos alvo" (COZZOLINO, 1997).

Por tratar-se de um processo dinâmico, influenciado por vários fatores relacionados tanto à dieta, quanto ao indivíduo, a biodisponibilidade não deve ser considerada como uma propriedade exclusiva do alimento ou da dieta, mas principalmente, como uma resposta do indivíduo ao alimento. Por esse motivo, medidas da biodisponibilidade de nutrientes, envolvendo humanos, exigem técnicas sensíveis e seguras (FAIRWEATHER-TAIT, 1992).

Avanços tecnológicos nas áreas da química, da física e instrumentação analítica, registrados desde a década de 1930, têm beneficiado a investigação científica nas diversas áreas do conhecimento, em especial no campo da Ciência dos Alimentos e da Nutrição. O emprego de isótopos estáveis como traçadores biológicos, em estudos de metabolismo em humanos, tem possibilitado desde os anos 70, a quantificação de elementos traço em amostras biológicas pelo método de diluição isotópica, facilitando o desenvolvimento de protocolos simplificados de trabalho. Particular interesse tem sido demonstrado para estudos de biodisponibilidade do zinco, tanto pela gama de funções intracelulares que lhe são atribuídas, quanto pelo número variado de isótopos que possui, com percentuais de abundância que favorecem o enriquecimento isotópico (TURNLUND, 1989; CREWS *et al.*, 1996; FRIEL *et al.*, 1992; SANDSTRÖM *et al.*, 1996; FAIRWEATHER-TAIT, 1997).

Estudos com isótopos estáveis baseiam-se no princípio de que um nutriente quando enriquecido em um dado isótopo, comporta-se de maneira idêntica àquele naturalmente presente no organismo, podendo ser utilizado como um marcador biológico. O rastreamento do mesmo pode ser realizado em amostras de sangue, fezes e/ou urina, por meio da técnica de espectrometria de massa, que permite identificar mudanças na razão isotópica desse nutriente, em relação à sua abundância natural. Dessa forma, a rota metabólica do nutriente de interesse, pode ser acompanhada e sua biodisponibilidade estimada. Uma vez que os isótopos estáveis são inócuos, vários isótopos podem ser utilizados simultaneamente, possibilitando trabalhos, com segurança, em gestantes e crianças, grupos mais vulneráveis à deficiência de zinco (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 1993, KREBS *et al.*, 1995; SANDSTRÖM *et al.*, 1996; van DOKKUM *et al.* 1996).

Nos últimos anos, a técnica de espectrometria de massa com fonte de plasma induzido (ICP-MS) tem se apresentado como uma poderosa ferramenta para determinações isotópicas em amostras biológicas. Esta técnica usa o plasma de argônio em alta temperatura, como uma eficiente fonte de ionização, operada à pressão atmosférica. Apresenta tempo de medida de 5 a 10 minutos por amostra, podendo medir vários elementos simultaneamente (KREBS *et al.*, 1995 ;CREWS & McGAW, 1996).

No Brasil, estudos de biodisponibilidade de minerais utilizando isótopos estáveis, como traçadores, são praticamente inexistentes.

Considerando a essencialidade do zinco para o homem, a importância da dieta para o suprimento desse nutriente e a disponibilidade de novas técnicas para a determinação da biodisponibilidade de zinco, em humanos, este trabalho foi proposto, com a finalidade de verificar a hipótese de que a dieta brasileira, se adequada em energia e macronutrientes, atende à necessidade orgânica de zinco, do indivíduo considerado saudável.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Zinco

2.1.1 Importância biológica

O zinco é um mineral vastamente encontrado na natureza, com amplo desempenho em processos metabólicos, considerados vitais para os organismos vivos. Todavia, sua importância para a nutrição humana somente foi reconhecida e documentada em meados de 1960, por PRASAD e colaboradores, em trabalho realizado no Egito e Irã. Os mesmos verificaram que os sinais clínicos de retardo de crescimento e imaturidade dos órgãos reprodutores, em pacientes adolescentes que consumiam habitualmente trigo integral e pequena quantidade de proteína animal, não regrediram com a suplementação de ferro, a exemplo de outros parâmetros avaliados como: anemia, letargia mental, geofagia e hepatomegalia. A relação entre os sinais clínicos observados e a deficiência de zinco na dieta consumida pelos pacientes, foi subsidiada pelos achados de O'DELL & SAVAGE (1960), os primeiros a sugerirem que o fitato (hexafosfato de mio-inositol), abundante nos grãos de cereais, poderia prejudicar a absorção de zinco. Por outro lado, tais distúrbios já haviam sido observados em animais deficientes em zinco, com resposta positiva à suplementação dietética com esse nutriente. Embora não mencionada como causa de deficiência nutricional, esta síndrome clínica também já havia sido observada por LEMANN, no ano de 1910, em pacientes com verminose. Tais achados permitiram confirmar não somente a essencialidade do zinco para o homem, mas principalmente, a importância da dieta para o seu suprimento (PRASAD, 1991).

2.1.2 Distribuição no organismo

No organismo humano, o zinco apresenta-se distribuído em todos os tecidos, órgãos, fluidos e secreções corporais. No indivíduo adulto, a quantidade de zinco total é representada por cerca de 1,5 g na mulher e 2,3 g no homem, estando, aproximadamente 85% dele, concentrados nos tecidos muscular e ósseo, 6% na pele, 5% no fígado, 1,5% no cérebro e 0,7% nos rins (JACKSON, 1989). Em menores concentrações, o zinco é encontrado na próstata e retina do olho, demonstrando sua importância em funções intracelulares, contendo o citoplasma o maior percentual, com cerca de 60 a 80%. No plasma a quantidade de zinco apresenta-se na faixa entre 80 - 110 $\mu\text{g/dL}$ (OMS, 1998), valor considerado baixo se comparado aos demais compartimentos. Em adultos, concentrações eritrocitárias de zinco são encontradas na faixa de $42,2 \pm 5,6 \mu\text{g/g Hb}$ (GIBSON, 1990).

2.1.3 Recomendações

A ingestão de zinco de 12 a 15 mg/dia, recomendada para indivíduos adultos saudáveis (NRC, 1989a) foi recentemente modificada para 9,4 a 11,0 mg/dia (FNB, 2000). Desse total, cerca de 1,8 a 4,5 mg de zinco/dia podem ser absorvidos, se considerado uma absorção de 20 a 40% (SANDSTRÖM, 1996).

A possibilidade de sintomas de toxicidade, como náuseas, vômito, diarreia e febre pode ocorrer, apenas, numa faixa de ingestão de zinco entre 4 e 8 g/dia. Apesar disso, uma ingestão superior a 40 mg de zinco/dia tem demonstrado interferir no metabolismo do cobre, diminuindo a atividade da enzima superóxido dismutase, a qual é dependente, tanto do cobre quanto do zinco (OMS, 1998).

2.1.4 Fontes

A necessidade de zinco do organismo é normalmente suprida pela dieta, sendo sua concentração nos alimentos amplamente variável, mesmo naqueles pertencentes a um mesmo grupo. Nos alimentos protéicos de origem animal, por exemplo, o ovo apresenta 0,02 mg de zinco/ 100 g do produto, enquanto a carne de frango branca e de ostra, em torno de 1 mg e 75 mg/100g, respectivamente (KING & KEEN, 1994; PEDROSA & COZZOLINO, 2001). Os crustáceos, as vísceras e as carnes vermelhas são consideradas suas melhores fontes. Os cereais são relativamente ricos em zinco, contudo, por estar concentrado na porção germinativa do grão, cerca de 80% de seu conteúdo pode ser perdido durante processos de refinamento. Outras fontes vegetais são as nozes e as leguminosas. As frutas e hortaliças apresentam quantidades reduzidas de zinco, se comparadas com aquelas contidas nos cereais, leguminosas ou alimentos de origem animal. A água é, normalmente, pobre em zinco, porém, as concentrações deste mineral no solo e fertilizantes, contribuem para a sua quantidade nos alimentos vegetais (KING & KEEN, 1994). Segundo KING *et al.*, (2000), a ingestão dietética deste nutriente, para a maioria das populações, apresenta-se na faixa entre 107 a 231 $\mu\text{mol}/\text{dia}$ (6,9 a 15 mg/dia).

2.1.5 Absorção, transporte e excreção pelo organismo

O trato gastrointestinal é o local onde o zinco exógeno (procedente da ingestão dietética) e o endógeno (oriundo das secreções pancreática, biliar e intestinal), juntamente com outros elementos constituintes da dieta, tornam-se disponíveis para a absorção. Por ação enzimática, a digestão promove a liberação do zinco de uma forma química complexada para a forma livre, tornando-o disponível para constituir novos complexos, normalmente com aminoácidos, peptídios, fosfatos e ácidos orgânicos.

Nos mamíferos, a maior parte do zinco é absorvida ao longo do intestino delgado, por um processo transcelular, compreendendo o influxo do mesmo no enterócito, passagem pela membrana basolateral e transporte até a circulação portal (JACKSON, 1989; KREBS, 2000). O principal local de absorção do zinco, bem como a contribuição dos segmentos duodeno, jejuno e íleo neste processo, são ainda discutidos e controversos, embora extensivamente estudados. O duodeno e o íleo são mencionados por COUSINS & HEMPE (1991) e KRAUSE (1989), respectivamente. Segundo KING & KEEN (1994), a quantidade de zinco na porção distal do duodeno aumenta de 1,5 a 3 vezes a quantidade ingerida, provavelmente devido à secreção gástrica, diminuindo sua concentração na porção jejunal, sugerindo ser este o local de maior absorção do zinco. FINLEY *et al.* (1994) sugeriram que o zinco exógeno e endógeno, no lúmen intestinal, podem ser absorvidos em compartimentos distintos. HOUSE, (1999), comenta que, as conclusões variadas poderiam ser explicadas pelos diferentes métodos experimentais empregados, dentre eles, segmentos intestinais ligados, perfusão intestinal, radioimunoensaio ou marcação com isótopos.

Presume-se que no lúmen intestinal, o zinco seja capturado pelas bordas em escova e translocado para o enterócito, processo que ocorre contra um gradiente de concentração e mediação de carreadores. Este último mecanismo é predominante quando a dieta é pobre em zinco, estando a velocidade do processo como um todo, diretamente relacionada com o *status* de zinco do organismo (KING *et al.*, 2000). No compartimento intracelular, o zinco pode ligar-se à proteína metalotioneína, provavelmente sua forma de transporte. Nesse pool parte do zinco é utilizado para o desempenho de funções nas células locais e o restante, transportado através da borda serosa, mediado por carreadores, atingindo a circulação portal e o fígado, de onde é distribuído aos diversos tecidos (COUSINS & HEMPE, 1991; KRAUSE, 1989; KING & KEEN, 1994).

A recente identificação e caracterização de uma proteína transportadora de zinco (ZnT-1), presente nos vilos do intestino delgado proximal (MAcMAHON & COUSINS, 1998, LIUZZI *et al.*, 2001), devem esclarecer melhor a inter-relação da captação e efluxo do zinco celular. No entanto, ensaios em ratos são ainda insuficientes para demonstrar a expressão desta proteína, diante da restrição de zinco dietético.

O zinco apresenta uma grande atividade metabólica, sendo primeiro captado pelo fígado, considerado um compartimento de troca muito rápida, juntamente com o plasma, pâncreas e rins. Os tecidos muscular e ósseo são tidos como compartimentos de troca lenta (LOWE *et al.*, 1997). No plasma, o zinco circula ligado à α_2 macroglobulina (40%), à albumina (57%) e a amino-ácidos (3%).

A mais importante rota de excreção de zinco corporal é o trato gastrointestinal, uma vez que as secreções intestinal, pancreática e biliar são as maiores fontes de excreção do zinco endógeno. Pelas fezes são eliminados o zinco de origem exógena e endógena não absorvidos, com valores que podem variar entre 1,7 a 5,8 mg/dia, para uma faixa de ingestão dietética de 4,1 a 30,8 mg/dia (KING *et al.*, 2000).

Uma outra via de excreção de zinco são os rins. As perdas urinárias deste mineral giram em torno de 300 a 600 $\mu\text{g}/24$ horas ou 400 a 600 $\mu\text{g}/\text{dia}$, segundo, GIBSON, (1990) e a OMS (1998), respectivamente, valores considerados pouco influenciados pela variação dietética, exceto em casos de ingestão extremamente alta ou baixa. Um aumento na excreção urinária de zinco tem sido descrita em pacientes com nefrose, diabetes mellitus, cirrose hepática, possivelmente, relacionado com o aumento da produção urinária e da excreção de creatinina, normalmente constatados nestes casos (LINDERMAN *et al.*, 1978, PEDROSA *et al.*, 1999; MARREIRO, 1999).

O cabelo, o suor, o sêmen, a secreção menstrual e a descamação da pele, também são veículos de excreção de zinco, somando aproximadamente, 0,48 mg/dia para o homem e 0,43 mg /dia para a mulher, valores considerados na literatura como constantes. (KING & KEEN, 1994).

O organismo não demonstra possuir um estoque específico de zinco, o que tem sido verificado por experimentos que apontam uma relação direta entre a redução dietética de zinco e o aparecimento de sinais clínicos de deficiência do mesmo.

2.1.6 Funções bioquímicas e sinais clínicos de deficiência

Como elemento divalente e afinidade protéica, o zinco desempenha funções de destaque no organismo. Apresentando-se em locais diversificados da célula, a habilidade e versatilidade desse nutriente no sistema biológico é comprovada por sua atuação ao mesmo tempo, em três categorias funcionais: catalítica, estrutural e reguladora (COUSINS & HEMPE, 1991).

Na função reguladora de estabilidade das membranas celulares, atribui-se ao zinco a capacidade de manter os sítios protéicos e de ligação com grupos fosfolipídios, caracterizando uma forma de proteção e defesa da membrana, contra processos de peroxidação (CONNEL *et al.*, 1997). Por outro lado, a habilidade do zinco em se combinar com aminoácidos em diferentes locais da proteína, facilita mudanças nas estruturas (secundária, terciária e quaternária) das mesmas, auxiliando o complexo enzima substrato e conseqüentemente a ação enzimática (KRAUSE, 1989). A presença do zinco é confirmada em todas as seis classes de enzimas reconhecidas (VALLEE & GALDES, 1984). A anidrase carbônica, foi a primeira enzima descrita como dependente de zinco, no ano de 1940. Hoje sabe-se que centenas de enzimas diminuem sua atividade durante a depleção de zinco, sendo a álcool desidrogenase, a superóxido dismutase,

a DNA polimerase, a RNA polimerase, a fosfatase alcalina e a carboxipeptidase, alguns exemplos.

Com função estrutural, o zinco participa de configurações protéicas nos receptores de retinol e vitamina D, bem como na regulação do RNA e DNA. Vários fatores de transcrição parecem conter os chamados “dedos de zinco”, segmentos repetidos, onde proteínas do DNA, contendo histidina e cisteína, se ligam fortemente ao zinco, numa configuração tetraédrica. Esta configuração é vista como necessária à captação do DNA, manutenção estrutural do RNA e controle da transcrição gênica, o que demonstra a responsabilidade direta desse mineral na síntese de ácidos nucléicos, expressão gênica e duplicação celular (COUSINS, 1998; KLUG, 1999).

A importância biológica e funcional do zinco, bem como a repercussão da carência do mesmo nos sistemas imunológico, endócrino, reprodutor e neurológico, têm sido evidenciadas por sinais clínicos como diarreia, dermatites, infecções respiratórias, imaturidade sexual, atraso no crescimento e desenvolvimento, distúrbios cognitivos, dificuldade de adaptação visual ao escuro e ausência de palatabilidade. Tais manifestações mostram-se reversíveis diante de terapia de suplementação com esse mineral.

STALLARD & REEVES (1997), na tentativa de explicar o hipogonadismo no homem, verificaram que a deficiência dietética de zinco diminuiu a atividade da enzima conversora de angiotensina (ACE) em testículos de ratos, pela redução do gene transcritor da ACE.

NISHI (1996) e SHANKAR & PRASAD (1998), mostraram o efeito da deficiência do zinco na redução do hormônio de crescimento (GH) e no funcionamento de células do sistema imunológico, respectivamente, o que também pode explicar a interferência do zinco nos processos de crescimento e imunodeficiência.

BORON, *et al.* (1988) verificaram que a deficiência de zinco reduz a atividade da álcool desidrogenase, metaloenzima responsável, na retina, pela conversão do retinol em retinal, o que causaria dificuldade de adaptação ao escuro, sinal clínico comum na deficiência de zinco e vitamina A .

Como se observa, ainda não está perfeitamente elucidado o entendimento dos mecanismos metabólicos responsáveis por mudanças fisiológicas, decorrentes de uma ingestão dietética de zinco deficiente ou mesmo, excessiva. A deficiência crônica de zinco, na verdade, somente tem sido observada em casos de má absorção deste nutriente, causada por um defeito genético, considerada uma disfunção rara, denominada “acrodermatite enteropática”. Todavia, os sinais clínicos de dermatite crônica, diarreia e baixa retenção de zinco, apresentados por essa anomalia, também mostram-se reversíveis, com a terapia de suplementação com zinco (HAMBIDGE, 2000). Apesar disso, a reversão de sinais clínicos pelo uso de suplementos, em humanos, tem apresentado controvérsias.

NINH *et al.* (1996) em estudo de suplementação realizado, concluíram que a carência de zinco pode limitar o crescimento de crianças desnutridas devido, muito mais, à baixa ingestão protéica observada, do que ao zinco isoladamente.

RIVERA *et al.* (1998) utilizaram suplemento de zinco em crianças com atraso no crescimento e verificaram um aumento linear deste, em relação à situação inicial. GARDNER *et al.* (1998) e ROSADO *et al.* (1997), no entanto, não encontraram correlação entre suplementação com zinco e aumento de estatura nos grupos por eles estudados, porém, uma redução na morbidade foi observada. Por outro lado, SAZAWAL *et al.* (1997) relatam um efeito significativo da suplementação de zinco na morbidade da diarreia aguda, em crianças com baixas concentrações de zinco no plasma.

Controvérsias com relação à suplementação dietética de zinco, podem ser atribuídas a diferenças metodológicas como: quantidade de zinco suplementado, tipo e tempo de suplementação, idade e estado nutricional dos indivíduos. Pelo mesmo motivo, são apontadas evidências pouco conclusivas quanto à relação entre deficiência de zinco e anemia ferropriva e/ou hipovitaminose A (FORTES *et al.*, 1998; CHRISTIAN & WESTER, 1998; WHITTAKER, 1998). Porém, admite-se que este tipo de associação possa existir, quando as populações se apresentam mal nutridas (WAPNIR, 2000).

Conforme demonstra a literatura, os conhecimentos acumulados sobre o zinco atestam a importância da deficiência desse mineral, que mesmo sem apresentar sinais clínicos característicos poderia ser considerada um problema de saúde pública. Será a deficiência de zinco em humanos, um problema negligenciado? (SANDSTEAD, 1995; PRASAD, 1998).

2.1.7 Homeostase

Em situações adversas, a capacidade orgânica de manter um estado interno constante torna-se condição essencial à sobrevivência. Este processo, conhecido como “homeostase”, envolve vários mecanismos fisiológicos regulatórios, normalmente com ajustes na absorção, utilização e excreção de nutrientes (KING *et al.*, 2000). Uma vez que tanto a absorção, quanto a maior parte da excreção endógena do zinco ocorrem no trato gastrointestinal (uma característica peculiar deste nutriente), o intestino delgado, o fígado e o pâncreas são considerados os maiores responsáveis pela regulação homeostática do mesmo.

JACKSON *et al.* (1982) mediram as concentrações de zinco em tecidos de ratos e cadáveres humanos com deficiência crônica desse mineral. Os autores verificaram que em ambas as espécies, as concentrações de zinco no pêlo e cabelo, derme, coração e músculo

esquelético mantiveram-se constantes, em relação aos valores normais, enquanto no plasma, fígado, ossos e testículos as concentrações de zinco apresentaram-se significativamente diminuídas. Tais resultados mostraram que num estado de depleção crônica de zinco, as perdas teciduais não foram uniformes. Provavelmente mecanismos específicos foram desenvolvidos por alguns tecidos para a retenção do zinco, ou ainda, o plasma, o fígado, os ossos e os testículos, seriam os responsáveis pela manutenção do mineral nos demais tecidos orgânicos, durante a deficiência.

Muitos trabalhos indicam que a manutenção do zinco nos tecidos, mostra-se controlada pela relação inversa entre a absorção exógena e a excreção endógena desse nutriente, em função da ingestão dietética do mesmo (SANDSTRÖM, 1995; KING *et al.*, 2000).

JACKSON *et al.* (1984), estudando mudanças nas concentrações dietéticas de zinco e resposta gastrointestinal em humanos, observaram um aumento nos percentuais de excreção do zinco endógeno, proporcionais às concentrações de zinco na dieta (110, 230 e 473 μmol de zinco/dia), oferecidas durante três períodos de 8 dias consecutivos. Os resultados evidenciam uma relação direta entre a fração de zinco dietético absorvida e a de zinco endógeno excretada, quando satisfeitas as necessidades do organismo.

SIAN *et al.* (1996) estudaram a resposta homeostática a uma dieta deficiente em zinco, em dois grupos de mulheres chinesas, com baixa ingestão do nutriente. Os grupos avaliados, um da área rural e o outro da área urbana, absorveram 34 e 31% do consumo habitual de 5,2 mg e 8,1 mg de zinco/dia, respectivamente. As quantidades absolutas de zinco absorvido e de endógeno excretado nas fezes pelo grupo rural (1,76 mg/dia e 1,30 mg/dia) foram menores em relação ao grupo urbano (2,51 mg/dia e 2,34 mg/dia), mostrando que quanto mais reduzida a disponibilidade de zinco, maior a absorção e menor a excreção endógena nas fezes. Apesar de não significativas as diferenças encontradas, o trabalho mostra a relação

existente entre a absorção, o zinco endógeno dos tecidos e a excreção destes nas fezes.

Ajustes na excreção renal e na redistribuição celular e tecidual do Zn, em condições de alta ou baixa ingestão dietética, figuram como secundários na manutenção do zinco corporal. Perdas urinárias de zinco tendem a manter-se constantes, numa faixa de ingestão dietética entre 4 e 25 mg de zinco/dia em adultos (FNB , 2001).

JOHNSON *et al.* (1993), oferecendo a humanos dietas com diferentes concentrações de zinco (21,9; 37,5; 51,6 e 67,8 $\mu\text{mol/dia}$), observaram que, somente quando a ingestão dietética foi inferior a 51,6 μmol (3,4 mg/dia), a excreção urinária de zinco mostrou-se reduzida.

Segundo OBERLEAS (1996), a capacidade homeostática é uma característica de um organismo saudável. KING *et al.* (2001), utilizando isótopo estável intravenoso (^{70}Zn), estudaram o efeito da depleção crônica de zinco, em humanos isentos de enfermidade crônica, e concluíram que mecanismos homeostáticos possibilitam ao organismo adaptar suas necessidades específicas à ingestão de zinco.

Todavia, estudo realizado por LEE *et al.* (1993) em humanos, sugere que ajustes na homeostase do zinco, em condições prolongadas de baixa ingestão do mesmo, podem não ocorrer rapidamente. Os autores observaram um período de 6 meses, até que um possível equilíbrio tenha sido alcançado. Enquanto isso, JOHNSON *et al.* (1993), verificaram que um balanço de zinco positivo pode ser mantido, se quantidades de zinco na faixa de 1,43 a 20 mg/dia são oferecidas.

Como visto, a literatura demonstra carência de informações que expliquem os limites para mecanismos adaptativos para o zinco, em função da disponibilidade do mesmo.

2.1.8 Avaliação do estado nutricional

Presente em todos os órgãos, tecidos e fluidos do corpo, a quantidade de zinco circulante corresponde à menor fração, porém com alto turnover plasmático. As trocas entre os diversos compartimentos orgânicos, segundo estudo realizado por FAIRWEATHER-TAIT *et al.* (1993), giram em torno de 350 mg.

Incertezas com respeito à concentração de zinco nos tecidos e mecanismos que regulam sua homeostase têm dificultado o estabelecimento de testes e padrões bioquímicos sensíveis, que possibilitem um diagnóstico seguro de sua deficiência. Também não há, até o momento, uma medida reconhecidamente aceita para avaliação do estado nutricional relativo ao zinco, em humanos (OMS, 1998). Da mesma forma, são limitados os critérios clínicos e bioquímicos para reconhecimento de estados moderados e limítrofes de deficiência de zinco (WOOD, 2000). Esta lacuna tem dificultado os informes necessários para recomendações seguras de ingestão dietética de zinco, assim como para a identificação de grupos de risco, o que permitiria intervenções preventivas por meio de programas educativos ou até mesmo de suplementação e de fortificação de alimentos.

Devido ao fato de a concentração de zinco no plasma ser baixa em relação aos demais tecidos, e sensível a qualquer variação de zinco tecidual (KING & KEEN, 1994), este referencial tem sido amplamente utilizado, como um indicador, do estado nutricional relativo a esse nutriente em humanos, apesar de sua baixa sensibilidade de resposta (FNB, 2001).

2.2 Avaliação da ingestão dietética de zinco

A absorção do zinco em solução aquosa mostra-se superior, quando comparada com a ingestão realizada por meio de alimentos sólidos. Portanto dados de ingestão dietética e de biodisponibilidade são

instrumentos considerados importantes, para a estimativa de riscos de deficiência de zinco em populações, uma vez que, vários fatores são apontados como interferentes na absorção desse nutriente, promovendo ou inibindo a biodisponibilidade do mesmo (OMS,1998; GIBSON & FERGUSON, 1998; HAMBIDGE *et al.*,1998; LÖNNERDAL, 2000).

Com base em estudos experimentais, sabe-se que a etapa de absorção do zinco pode ser influenciada tanto pela dieta, quanto por variáveis ligadas ao próprio indivíduo, como sexo, idade, etapas do desenvolvimento (gestante, nutriz, criança, idoso), estresse orgânico (atividade física intensa, traumas), distúrbios do aparelho gastrointestinal (erro inato de má absorção, diarreias, diminuição da secreção gástrica em idosos), alterações do pH gástrico (decorrentes do uso de medicamentos), estado de saúde geral, ou ainda, enfermidades específicas, como diabetes mellitus, em que se observam perdas urinárias acima de índices considerados normais (OMS,1998; COZZOLINO,1997). O estado nutricional do indivíduo, relativo ao zinco, e a capacidade de adaptação do organismo, também são consideradas relevantes nesta etapa (SANDSTRÖM, 1995; KING *et al.*, 2000). Taxas de absorção de zinco próximas de 80% da ingestão dietética foram verificadas por JACKSON *et al.* (1988) em nutrízes brasileiras desnutridas e com deficiência de zinco.

Com relação à dieta, sua interferência na biodisponibilidade do zinco mostra-se dependente, principalmente, da sua composição química como um todo, do quantitativo de zinco na mesma, da quantidade e tipo de proteínas disponíveis e ainda, do seu conteúdo de fibras e fitato (SANDSTRÖM, 1987; FAIRWEATHER- TAIT, 1992, SANDSTRÖM, 1997; HAMBIDGE, 2000).

A composição química de dietas pode ser modificada por influência de condições genótípicas, climáticas, das propriedades do solo, e ainda, do tipo de armazenamento e processamento a que são submetidos os alimentos. Portanto, estudos sobre a biodisponibilidade de nutrientes, de

dietas consumidas por diferentes populações, são tidos como necessários, seja o país considerado desenvolvido ou em desenvolvimento (GIBSON & FERGUSON, 1998; HOUSE, 1999).

O processamento é apontado como o principal agente de mudança da composição química de dietas, independente do tipo de processo empregado, seja ele, industrial ou culinário.

O processamento dos alimentos tem por finalidade, torná-los adequados ao consumo, conferindo aos mesmos melhorias do ponto de vista sanitário, de digestibilidade e de qualidades organolépticas que favorecem sua maior aceitação. Em contra partida, o emprego de processos mecânicos de divisão, subdivisão, união, adição e mistura de alimentos, bem como de diferentes tipos de calor e graus de temperatura, modificam a composição química inicial dos alimentos, tanto quantitativa, quanto qualitativamente, possibilitando, inclusive, a formação de novos compostos (HORVATIC & GUTERMAN, 1997; SANDSTRÖM, 1997; EL & KAVAS, 1997; HARDY *et al.*, 1999). Em conseqüência, reações de complexão e formação de quelatos, resultantes de interações entre nutriente-nutriente e/ou nutrientes e outras substâncias, ainda não identificadas como essenciais na nutrição humana, seriam responsáveis por possíveis prejuízos na absorção do zinco (COZZOLINO & PEDROSA, 1995; GIBSON & FERGUSON, 1998; HOTZ *et al.*, 2001).

As proteínas representam um, dos vários nutrientes, apontados com potencial de interferência na biodisponibilidade do zinco. Os alimentos protéicos são, naturalmente, uma boa fonte de zinco, ferro, cálcio e vitamina A e alguns tipos de proteína presentes nestes alimentos, dependendo da sua quantidade, teriam a capacidade de produzir quelados, formados de zinco e aminoácidos de baixo peso molecular, com efeito positivo na biodisponibilidade do zinco. Embora o papel da proteína animal, neste processo, seja ainda pouco claro, sua composição em aminoácidos parece favorecer a manutenção do zinco em solução, facilitando a absorção do

zinco, em dietas ricas em fitato (SANDSTRÖM, 1987; OMS, 1998). FAIRWEATHER-TAIT *et al.* (1992a), não verificaram diferença significativa para absorção do zinco, quando compararam o consumo de sanduíche de galinha com pão branco e com pão integral, utilizando a técnica de marcação com isótopos estáveis.

O fitato ou hexafosfato de mio-inositol, encontrado principalmente nos grãos e sementes, representando o maior estoque de fosfato e reserva energética para a germinação das plantas, é apontado como o maior inibidor da absorção de zinco, tendo em vista seu forte potencial para ligar cátions bivalentes (HOUSE, 1999). Sabe-se que, em condições fisiológicas, o fitato é facilmente ionizável, com capacidade para complexar o zinco, o cálcio e o magnésio (De ANGELIS, 1999). Todavia, se presente em dietas mistas, esta habilidade do hexafostato de mio-inositol seria influenciada pela composição total das mesmas (OMS, 1998).

Considerando que o potencial complexante do fitato demonstra uma estreita relação quantitativa entre o mesmo e os minerais zinco e cálcio, existentes na dieta, as razões molares fitato / zinco < 10 e fitato x cálcio / zinco < 200 , têm sido frequentemente utilizadas como referência, para predizer a biodisponibilidade do zinco (ELLIS *et al.*, 1987). Entretanto, o efeito do fitato como antagonista do zinco parece provável, apenas, quando as dietas são constituídas predominantemente de leguminosas e cereais não refinados, associadas à alta ingestão de cálcio.

Embora experiências com animais sugiram que o cálcio, presente em dietas ricas em fitato, prejudica a absorção do zinco, o mesmo não se pode afirmar em relação ao modelo humano, uma vez que estudos nesta área são ainda insuficientes para comprovar resultados semelhantes (PATTERSON, 1994). Por outro lado, GIBSON & FERGUSON (1998) colocam que, em geral, dietas de países não industrializados, ricas em alimentos de origem vegetal, não possuem conteúdo de cálcio suficiente para potencializar o efeito negativo do fitato na biodisponibilidade do zinco. No Brasil, estudos

realizados no Laboratório de Minerais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, bem como em cinco cidades brasileiras, apontam um consumo de cálcio abaixo das recomendações, para a maioria da população avaliada (INAN, 1997, COZZOLINO, 1997).

Há evidências, também, de que os processos de refinamento, fermentação, remolho e cocção podem provocar mudanças na estrutura química do fitato, por ativação de enzimas capazes de degradá-lo, reduzindo suas formas penta (IP5) e hexafostato (IP6), consideradas prejudiciais à absorção do zinco, uma vez que, os demais isômeros (IP1, IP2, IP3 e IP4) apresentam baixa capacidade quelante (SANDSTRÖM, 1997; GIBSON & FERGUSON, 1998). Os processos de fermentação, remolho e cocção, proporcionariam ainda, o aumento da digestibilidade das proteínas, fator favorável à biodisponibilidade do zinco, tomado-se em conta a dependência proteína/zinco/fitato, conforme citado anteriormente (SILVA, 1999).

Tendo em vista que alimentos ricos em fitato, raramente são consumidos crus, o efeito prejudicial do mesmo na biodisponibilidade do zinco, é passível de questionamentos.

Estudo realizado por HOTZ *et al.* (2001) em comunidades onde é típico o consumo de cereais e leguminosas, os autores confirmaram que o simples preparo culinário pode diminuir a quantidade de fitato nos alimentos.

SANDSTRÖM *et al.* (2000), utilizando a técnica de marcação com isótopos estáveis, constataram que o farelo de aveia, rico em fitato, quando acrescido ao preparo de dieta mista, não prejudicou a absorção do zinco em humanos.

Trabalho de revisão, realizado por GIBSON & FERGUSON (1998) cita que até recentemente, o método de eleição para determinação do fitato

era o de separação por cromatografia de troca iônica, contudo, o mesmo não diferencia os grupamentos do hexafosfato mio-inositol IP1,IP2,IP3,IP4,IP5,IP6. Atualmente, o uso da técnica da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação de fitato, tem permitido a quantificação dessas frações, facilitando estudos sobre a influência do processamento na concentração desses isômeros, assim como destes na biodisponibilidade de minerais.

O emprego de método analítico que possibilite avaliação dos efeitos do processamento sobre o fitato, bem como a repercussão desses efeitos no metabolismo humano, é hoje um procedimento indispensável, tendo em vista a diversidade cultural de práticas alimentares existentes. No Brasil, por exemplo, é comum a prática culinária de remolho do feijão, leguminosa típica da dieta brasileira, e ainda, da sua cocção por pressão ou tempo prolongado, utilizando horas. Também é prática habitual dos brasileiros, o consumo de arroz polido e de pão fermentado, produzido com trigo refinado.

Ademais, tendo em conta as diferenças de métodos analíticos e modelos experimentais empregados para avaliação quantitativa de fitato em dietas, uma cuidadosa análise crítica de resultados deve preceder todo e qualquer processo comparativo (TORRE *et al.*, 1991).

Considerando a presença concomitante da fibra em alimentos ricos em fitato, a ação inibidora da mesma na absorção do zinco, apesar de ainda pouco esclarecida, estaria relacionada ao seu papel de facilitar o trânsito gastrointestinal. Guias alimentares recomendam que sua ingestão seja decorrente de vegetais folhosos, frutas, leguminosas e cereais integrais, fontes inclusive de vitaminas e minerais (NRC, 1991).

TORRE *et al.* (1991), em trabalho de revisão sobre o papel da fibra e do fitato na disponibilidade de minerais, concluem que a fibra pode não ter um efeito adverso na absorção, se o seu consumo for acompanhado de outros componentes da dieta como proteínas e os ácidos ascórbico, cítrico e

oxálico, presentes nas frutas e vegetais. Comentam ainda, que dados contraditórios encontrados na literatura, podem ser atribuídos a comparações feitas entre diferentes condições experimentais (*in vitro* e *in vivo*) e metodologias utilizadas.

A competição entre minerais por um mesmo sítio de absorção no lúmen intestinal, também tem sido apontada como um fator interferente no processo de absorção do zinco. Porém, COUZY *et al.* (1993) concluíram que interações desse tipo, não apresentam efeito apreciável, se a ingestão de minerais atende às necessidades do indivíduo.

Uma vez que ambos apresentam-se como cation bivalente, o ferro é considerado o maior concorrente do zinco no processo de absorção no trato intestinal. No entanto, esta disputa parece ocorrer apenas em casos onde as quantidades de ferro são consumidas na forma de suplementação (COUZY *et al.*, 1993). KUBENA & McMURRAY (1996), em revisão sobre a interação nutriente-nutriente e seu efeito no sistema imune, alertam para o consumo variado de alimentos como um caminho para a ingestão balanceada de nutrientes, ao mesmo tempo em que enfatizam a importância dessa atitude para a saúde.

Conforme comenta BIDLACK, (1996), o equilíbrio quantitativo e qualitativo no consumo de nutrientes, em função das necessidades orgânicas, parece impor-se como um limite entre a saúde e a doença.

Como visto, os processos envolvidos na regulação e controle da biodisponibilidade de nutrientes consumidos a partir de dietas, não estão, até o momento, suficientemente esclarecidos. Por esse motivo, para o estabelecimento de taxas seguras de ingestão de zinco, carecem estudos sobre a disponibilidade desse elemento traço, em dietas típicas de diferentes populações. No Brasil, trabalhos realizados sobre concentrações de zinco em dietas consumidas por grupos da população, mostram baixo consumo de carnes e uso de alimentos ricos em fitato. Algumas apresentam

conteúdo de zinco aquém das recomendações (PEDROSA & COZZOLINO, 1990; COZZOLINO, 1997).

Num estudo de biodisponibilidade em humanos, utilizando a técnica de marcação com isotópos estáveis, um baixo percentual de absorção do zinco foi mostrado em dieta consumida pela população brasileira de baixa renda. Vale salientar no entanto, que o trabalho foi desenvolvido na Inglaterra, com voluntários ingleses, e a carne não foi contemplada na dieta, uma vez que, conforme justificado pela autora, o momento econômico do país impunha a restrição dessa fonte protéica, tanto pela falta do produto no mercado, quanto pelos preços proibitivos do mesmo para a maioria da população (TRAMONTE, 1994).

Verifica-se ao longo da história, que um padrão dietético é determinado pelas características culturais, sociais, econômicas e políticas de uma sociedade, sendo os hábitos e atitudes alimentares, consequência dos mesmos. No entanto, mudanças nos padrões de dietas têm sido observadas como um fenômeno mundial, influenciadas pelo atual processo de “globalização”, do qual o Brasil não se mostra ausente.

Tomando como referência a RDA (NRC, 1989a), um estudo multicêntrico, envolvendo cinco cidades brasileiras (Campinas, Curitiba, Goiânia, Ouro Preto e Rio de Janeiro), avaliou o perfil de consumo destas populações do ponto de vista socio-econômico, demonstrando uma relação direta entre ingestão de nutrientes e poder aquisitivo. Os resultados apontaram adequação percentual de proteínas disponível nos domicílios variando entre 89 e 155%, para famílias com renda até 1 salário mínimo, e de 131 a 216% para as demais faixas salariais. Verificou ainda, um consumo de gordura ao redor de 30% em relação à energia total. O trabalho concluiu que exceto nas famílias com renda até 1 salário mínimo, a recomendação para ingestão energética no âmbito familiar, foi atendida. No entanto, se avaliada para o indivíduo, esta variável mostrou-se inadequada. Um outro aspecto abordado pelo estudo foi a identificação de alimentos

mais consumidos pelas famílias em cada município. A avaliação mostrou um total de 24 produtos, sendo 17 deles de consumo comum nas 4 cidades e os demais de uso regional (INAN, 1997).

Mais recentemente, OLIVEIRA & THÉBAUD-MONY (1998) investigaram hábitos e práticas alimentares em três níveis sociais da população da cidade de São Paulo, utilizando os métodos: recordatório de 24 horas e frequência alimentar. A exemplo do que foi encontrado no estudo multicêntrico, os resultados mostram um consumo similar para 29 tipos de alimentos nos três níveis estudados, entre eles, o arroz, feijão, carne, macarrão, leite, ovos, alface, tomate, cebola, batata, pão, laranja, banana, mamão, margarina e óleo. Neste estudo, além do arroz e feijão, foi comum a preferência por algumas preparações como salada de maionese, macarronada, frango assado e feijoada. A inserção de alguns produtos industrializados como iogurte, embutidos e enlatados, também foi verificada nos três níveis sociais.

BARRETO *et al.* (1998), analisaram a disponibilidade de energia, proteínas, nove vitaminas e oito minerais, contidos nos 22 produtos listados na cesta básica DIEESE & PROCON, baseados numa família referência (IBGE, 1991), utilizando tabelas de composição de alimentos e considerando o ponto de corte de dois terços dos valores de referência dados pela RDA "Recommended Dietary Allowances" (1989a) como parâmetro das necessidades mínimas. Os autores concluíram que uma alimentação adequada em energia e proteínas pode não prover todos os demais componentes dietéticos igualmente indispensáveis. Contudo, trabalhos de comparação de dados entre as diversas tabelas de composição de alimentos, disponíveis e utilizadas para planejamento e avaliação de dietas brasileiras, têm mostrado a escassez e imprecisão das informações no que se refere ao conteúdo de minerais em alimentos (PHILIPPI *et al.*, 1995; RIBEIRO, *et al.*, 1995). Esta lacuna, segundo COZZOLINO & PEDROSA, 1995, poderia explicar a inconsistência dos resultados de correlação entre a

ingestão dietética e o estado nutricional do zinco, em humanos, quando avaliados os parâmetros bioquímicos e sinais clínicos característicos de sua deficiência.

Referências de ingestão dietética são utilizadas, mundialmente, há mais de 50 anos para o planejamento e avaliação da adequação de dietas, com vista ao monitoramento do estado nutricional de indivíduos e populações. No entanto o estabelecimento destes parâmetros, por sua vez, dependem de informações científicas tanto acerca da biodisponibilidade de nutrientes, quanto de indicadores para avaliação do estado nutricional de indivíduos (YATES, 2001). A necessidade destas evidências, têm impulsionado a Ciência na busca de novas metodologias, voltadas para a investigação do papel da dieta no metabolismo humano, bem como sua relação de dependência no processo saúde/doença.

2.3 Métodos para estimativa da biodisponibilidade de nutrientes

Estudos de biodisponibilidade, metabolismo e cinética de minerais, bem como determinações quantitativas dos mesmos em materiais orgânicos, são imprescindíveis para uma maior compreensão dos benefícios e prejuízos que estes elementos possam trazer ao organismo humano (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 1993; ANDERSEN, 1998).

Com vista a estimar a biodisponibilidade de nutrientes, vários métodos têm sido utilizados: técnicas *in vitro*, técnica de balanço químico, taxa de depleção e repleção, aparecimento do nutriente no plasma, suplementação do nutriente seguida de avaliação de sinais clínicos ou da atividade de enzimas dele dependentes, além daqueles com isótopos traçadores (radioativos ou estáveis).

As técnicas *in vitro* embora quantifiquem a capacidade solúvel ou dialisável do nutriente, não permitem concluir sobre a biodisponibilidade

uma ferramenta importante e um caminho promissor para estudos de biodisponibilidade em humanos. O número de trabalhos, empregando este método, tem crescido nos últimos 20 anos, em função, principalmente, do aperfeiçoamento das técnicas instrumentais.

2.4 Uso de isótopos estáveis como traçadores biológicos

Isótopos foi a denominação dada pelo químico inglês FREDERICH SODDY (1877- 1956), para designar átomos que possuem mesmo número atômico (Z) e propriedades químicas idênticas, porém apresentam número de massa (A) diferente, em função do número de nêutrons modificado.

Com número de prótons iguais e mesmas características químicas, os isótopos estáveis diferenciam-se, apenas, em relação às suas massas atômicas, o que permite serem diferenciados e quantificados. Por essa razão, o uso de isótopos estáveis como traçadores, baseia-se no princípio de que um elemento quando enriquecido em um determinado isótopo, deve comporta-se de forma similar ao elemento natural.

Quadro 1 - Composição isotópica do zinco

Elemento	Isótopos radioativos		Isótopos estáveis	
	Nº Massa	Meia vida	Nº massa	% abundância
Zn	65	243,6d	64	48,6
	69m	13,9h	66	27,9
			67	4,1
			68	18,8
			70	0,6

O primeiro trabalho realizado com isótopos estáveis como traçadores, foi publicado por SCHOENHEIMER & RITTEMBERG em 1935. Os autores utilizaram o ^2H , também conhecido como deutério, em estudo do

metabolismo intermediário, com modelos animal (camundongos e cachorros) e humano. No entanto, a primeira experiência publicada com isótopos estáveis de um elemento, considerada o marco na pesquisa com minerais, somente ocorreu em 1963, escrita por LOWMAN & KRIVI que utilizaram a técnica de ativação atômica de nêutrons para a quantificação, no plasma, do ^{59}Fe e ^{58}Fe , isótopos estável e radioativo, respectivamente, para avaliação dos dois métodos (TURLUND, 1989).

Para estudos com traçadores, os isótopos estáveis apresentam a vantagem de serem inócuos, uma vez que podem ser encontrados na natureza e no homem. Por esse motivo, seu uso não representa perigo mesmo para crianças, gestantes e nutrízes. A ausência de radiação, decorrente da estabilidade de seu núcleo, permite o emprego de vários isótopos simultaneamente e por repetidas vezes, com a facilidade de que as amostras podem ser estocadas por tempo indeterminado. Uma vez que se diferenciam nas massas, e apresentam percentuais de abundância distintos e constantes, como verificado no Quadro-1, estes isótopos podem ser diferenciados e quantificados nos organismos vegetais e animais. Por estes aspectos, os isótopos estáveis têm sido considerados como “perfeitos” no papel de traçadores biológicos.

As razões entre os isótopos estáveis de um elemento são consideradas, praticamente constantes. Assim sendo, se um determinado isótopo for, quantitativamente alterado, a razão original da amostra será conseqüentemente modificada. Este princípio, conhecido como “diluição isotópica” é o mesmo empregado para a quantificação de traçadores estáveis.

A técnica de análise por diluição isotópica permite a determinação quantitativa do elemento de interesse em amostras, medindo-se a razão isotópica do mesmo, após a adição de uma quantidade conhecida de um isótopo (spike = referencial), com percentual de abundância elevado (enriquecido), diferindo daquela apresentada pelo mesmo na sua forma

natural. O principal mérito dessa técnica é que a precisão e exatidão das análises não são prejudicadas pela recuperação incompleta do analito. Uma vez alcançado o equilíbrio isotópico, os resultados não são afetados durante os processamentos químicos. Esta técnica analítica tem sido reconhecida como efetiva na determinação de elementos traço (HWANG, 1997; OHATA *et al.*, 1998). Com o princípio do enriquecimento, assume-se que o traçador acrescentado, se comportará de maneira idêntica aos outros isótopos presentes na amostra, inclusive nos processos de absorção e metabolismo. Nestas condições, cada indivíduo é tido como controle dele mesmo.

A marcação com traçadores pode ser realizada intrínseca ou extrinsecamente, utilizando em ambos os casos, uma solução contendo o elemento com o isótopo enriquecido. Este é produzido por empresas especializadas, sendo elas próprias, as encarregadas pela comercialização dos mesmos.

A marcação intrínseca, consiste na incorporação do isótopo estável ao alimento, durante a sua produção. Para alimentos vegetais, utiliza-se a imersão da raiz da planta numa solução nutritiva contendo o isótopo enriquecido ou a aplicação de doses injetáveis no caule da planta. No caso de animais, o enriquecimento é feito na ração, ou também, por meio de doses injetáveis. Melhores resultados são obtidos quando este último procedimento é utilizado. No entanto, por tratar-se de um processo biológico, a técnica de marcação intrínseca, torna-se trabalhosa, demorada e dispendiosa, motivo pelo qual, tem sido substituída pela marcação extrínseca do alimento (FOX *et al.*, 1991; EGAN *et al.*, 1991).

Na marcação extrínseca, a solução preparada com o isótopo enriquecido é adicionada ao alimento ou refeição já prontos para o consumo. Contudo, uma cuidadosa homogeneização deve ser garantida, com um tempo mínimo de espera de 12 horas, de forma a permitir a perfeita interação do isótopo da solução com o conteúdo do isótopo naturalmente presente no alimento ou preparação (van DOKKUM *et al.*, 1996).

Em estudos metabólicos envolvendo humanos, a administração de soluções com traçadores de isótopos estáveis, pode ser realizada por via oral, a partir da marcação extrínseca e/ou intravenosa. A solução intravenosa deve ser ajustada para o pH sanguíneo, esterilizada, submetida a testes pirogênicos e aplicada com rigor de procedimentos e cuidados hospitalares. Em ambos os casos, as doses devem possibilitar a quantificação e o rastreamento do isótopo administrado, em compartimentos no organismo, como: fezes, sangue, plasma e urina. Para tanto, três pontos principais devem ser considerados: a sensibilidade do equipamento para medidas de razão isotópica, os percentuais de absorção do nutriente no organismo, considerados em função da ingestão recomendada, e ainda, dos percentuais de enriquecimento do isótopo, uma vez que quanto maior o enriquecimento, maior também a sensibilidade para as medidas (SANDSTRÖM, 1993; van DOKKUM *et al.*, 1996).

O rastreamento fecal de traçadores, utiliza o mesmo protocolo do tradicionalmente conhecido método de balanço químico, quantificando o isótopo excretado. Se o isótopo é administrado apenas por via oral, os resultados são de absorção aparente, determinados pela diferença entre o ingerido e excretado nas fezes, uma vez que o método não permite a quantificação direta das perdas endógenas. Neste caso, a marcação isotópica favorece apenas a identificação do alimento ou dieta porém, se utilizados dois isótopos, permite verificar também a interação de nutrientes. No entanto o método apresenta limitações para nutrientes cuja absorção é baixa (SANDSTRÖM, 1993).

Para o rastreamento no plasma, duas técnicas diferentes podem ser utilizadas: o aparecimento ou o decaimento no plasma. Em ambas, são necessárias coletas de sangue com intervalos inicialmente pequenos (5,10,15,30,e,60 minutos), por mais de 6 horas após a administração dos traçadores, podendo se prolongar por alguns dias, se adotada a segunda técnica. No primeiro caso, em que se administra apenas uma dose oral, o

grau de enriquecimento pode ser usado como referência e a absorção é calculada como a área da curva de aumento do elemento. Esta técnica favorece estudos comparativos. Com relação ao decaimento no plasma, dois traçadores e duas vias de administração diferentes devem ser utilizadas, uma oral e outra intravenosa. Tanto o aparecimento do isótopo da dose oral, quanto o desaparecimento daquele administrado por via intravenosa, são medidos no plasma. Assim a fração oral absorvida é determinada pelo cálculo do decaimento da concentração do traçador (van DOKKUM *et al.*, 1996).

Para o rastreamento urinário, também são usados dois traçadores e as vias de administração oral e intravenosa. Coletas de urina de 24 horas são realizadas por um período de sete dias. Um tempo é necessário para que ocorra, no organismo, a interação da dose oral com a intravenosa. Este fator é determinante para a escolha das amostras de urina a serem analisadas. O alcance desse patamar para o zinco é de 40 horas devendo ser analisadas as amostras coletadas do 3º ao 5º dia (van DOKKUM *et al.*, 1996).

A técnica com duplo traçador e rastreamento urinário, foi primeiro utilizada por YERGEY *et al.* (1987) para determinação da absorção de cálcio, sendo posteriormente modificada por FRIEL *et al.* (1992) para estudos com zinco. Os autores administraram dois isótopos de zinco enriquecidos (^{70}Zn e ^{67}Zn), pelas vias intravenosa e oral, respectivamente, em quatro indivíduos sadios e compararam os cálculos da fração de zinco absorvida obtidos na urina e nas fezes. Os resultados encontrados mostraram correlação positiva entre os dois métodos de rastreamento isotópico, sugerindo vantagens no uso de amostras urinárias, em relação à técnica de balanço metabólico. A dose intravenosa de zinco administrada tem por finalidade normalizar a massa do pool de distribuição do elemento no organismo. Com o pool de massa em equilíbrio, a razão dos dois

traçadores presentes na urina permite a estimativa da fração absorvida do mineral (KING, 1997).

Lowe, *et al.* (2000) compararam a fração de zinco absorvida (FZA) utilizando isótopos estáveis em quatro tipos de rastreamento: balanço químico (BQ), rastreamento fecal (RF), análise de decaimento no plasma (AD) e razão de duplo traçador isotópico (RDTI). Os quatro métodos foram aplicados em cada uma de 6 mulheres. Como referência, foi usado um modelo de compartimentos, baseado em estudo com isótopos radioativos. Os autores concluíram que os métodos BQ e RF são trabalhosos e superestimam a FZA. O método AD, apesar de relativamente correto, tem a inconveniência de várias coletas de sangue por vários dias consecutivos, enquanto a técnica RDTI proporciona medida exata da FZA, usando apenas uma porção de urina, obtida durante 3 dias, após a administração do traçador, sendo este o método recomendado.

Na espécie humana, o método com traçadores isotópicos favorece estudos longitudinais e de efeitos de enfermidades no metabolismo de nutrientes, em qualquer estágio de vida, inclusive, nas condições fisiológicas de crescimento, gestação e lactação (ABRAMS, 1999). Na Nutrição, o método possibilita estudos de biodisponibilidade, interação e necessidades de nutrientes, avaliação do estado nutricional, toxicidade de elementos essenciais e tóxicos, além da cinética de nutrientes (LOWE, 1997). O método também tem sido amplamente utilizado nas áreas de geologia, agricultura, controle ambiental e medicina (JUNQUEIRA-FRANCO *et al.*, 1999).

2.5 Avanços na técnica de espectrometria de massa

A técnica por espectrometria de massa permite a discriminação de íons, o que possibilita a quantificação de um elemento e sua concentração isotópica.

Para estudos de metabolismo em humanos, a aplicabilidade da razão isotópica depende, basicamente, da exatidão e precisão com que esta razão pode ser medida. Uma excelente precisão é demonstrada, quando os percentuais de desvios para a razão situam-se entre 0,1 e 0,99%, referencial normalmente empregado para avaliação de desempenho do método analítico (van HEUZEN *et al.*, 1989).

Na busca por melhor desempenho na precisão isotópica, uma rápida evolução instrumental vem sendo registrada desde 1970. A introdução, no mercado, de instrumentos com maior grau de eficiência e menor custo, aumentou o potencial de uso da espectrometria de massa nas diversas áreas do conhecimento humano, destacando-se as áreas clínicas e da nutrição. Tais avanços tem possibilitado a determinação de concentrações de elementos inorgânicos em amostras biológicas e ambientais, em nível de ng/g, bem como a medida de pequenas mudanças na razão isotópica, propiciando maior conhecimento e compreensão da participação e importância dos elementos metais no binômio saúde/doença (BARNES, 1993; CREWS *et al.*, 1994; VANHOE *et al.*, 1994; HEUMANN *et al.*, 1998).

A espectrometria de massa com fonte de plasma induzido (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry-ICP-MS), desenvolvida na década de 80, mostra-se no momento a técnica mais indicada para estudos metabólicos com traçadores estáveis, com precisão analítica de 0,3 a 1% para medidas de razão isotópica, superada, apenas, pelos valores de 0,03-0,5%, alcançados com a ionização térmica (Thermal Ionization Mass Spectrometry-TIMS).

O espectrômetro de massa com fonte de plasma induzido (ICP-MS), possui um sistema de ionização com fonte de plasma induzido. A temperatura do plasma (8000 K), permite uma maior eficiência na ionização dos elementos, razão pela qual a técnica tem sido, provavelmente, a mais sensível para a determinação simultânea de concentração e razão isotópica de elementos traço e ultra-traço, em

soluções aquosas com quantidades mínimas de amostra (VANHAECKE *et al.*, 1997; SCHRAM *et al.*, 1996; BECKER & DIETZE, 1998). O equipamento apresenta-se subdividido em cinco unidades fundamentais: sistema de introdução da amostra, fonte de plasma induzido (ICP) e sistemas de focalização, analisador e detector, respectivamente. A amostra na forma líquida passa inicialmente por um nebulizador, onde é transformada pelo gás argônio em aerosol. Este é introduzido no plasma onde a amostra é ionizada. Os íons positivamente carregados são separados em um campo elétrico e acelerados por um sistema de lentes de focalização, em um ambiente de alto vácuo. Seguem em movimento retilíneo para travessia de um campo magnético, até alcançar o sistema analisador onde ocorre a separação dos isótopos, em função da razão, massa /carga (m/q) do íon. Finalmente, a “contagem” é realizada quando os íons atingem os detectores

No entanto, a presença de interferências espectrais e efeitos de supressão de sinal em análises de amostras com matriz complexa, é apontada como um fator limitante desta técnica.

As interferências espectrais podem ser isobáricas ou poliatômicas. A primeira devido à proximidade de massas de isótopos de elementos diferentes e a segunda pela presença de íons molecular ou de dupla carga, resultantes da combinação do argônio, com elementos constituintes da matriz, da água e ácidos presentes na amostra. Os efeitos de supressão de sinal são normalmente observadas, quando os níveis de sólidos dissolvidos ultrapassam o limite de 0,2% na solução (MOENS *et al.*, 1994, GEROTTO *et al.*, 1995).

Na tentativa de contornar algumas interferências espectrais, comuns, em amostras biológicas, em meados de 1990, foi comercializado o High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry-HR-ICP-MS, um equipamento com poder de alta resolução ($m/\Delta m=300, 3000$ e 7000), instrumentado com um sistema analisador de dupla focalização (magnético

e eletrostático), capaz de separar massas muito próximas e de determinar razões isotópicas e elementos traço livres de interferência.

MOENS (1994) testou o desempenho do HR-ICP-MS em trabalho comparativo, usando um ICP-MS quadrupolo, para determinação de zinco em amostras de soro. Verificou nas análises com o quadrupolo, a presença de interferências causadas por íons poliatômicos contendo enxofre (S), nos cinco isótopos de zinco. O autor comenta que as interferências encontradas para o ^{66}Zn ($^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}_2^1\text{H}$ e $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$), podem ser eliminadas com o HR-ICP-MS em resolução 3000 (média resolução). Porém, o trabalho não esclarece quanto à eficiência do HR-ICP-MS para interferências nos demais isótopos.

Segundo MULLIGAN (1990), interferências poliatômicas ocorrem mais facilmente em elementos de massa atômica entre 10-80, o que corresponde exatamente àqueles metais considerados essenciais e de interesse na nutrição humana. O mesmo autor, usando o método de diluição simples para o preparo de amostras de urina, verificou interferências na determinação de metais com massa entre 46 a 81 e isótopos com abundância menor que 10%. Para o Zn foram observadas interferências no ^{66}Zn e ^{70}Zn , causadas pelo $^{34}\text{SO}_2$ e ^{35}Cl , respectivamente. O pesquisador sugere que tais interferências podem ser solucionadas com a digestão da amostra ou outras técnicas que possam reduzir o impacto do efeito da matriz.

Apesar da eficiência do HR-ICP-MS para eliminar interferências espectrais em amostras biológicas, relatadas por MOENS *et al.* (1994), uma completa eliminação do material orgânico presente na amostra, assim como a separação química do analito, podem ser necessários para garantir a exatidão e precisão de medidas de razões isotópicas, condição essencial para validade dos resultados de estudos metabólicos, uma vez que não existem padrões certificados ou de referência para esse tipo de análise.

Figura 1 - Componentes básicos de um ICP-MS

Figura 2. Esquema do analisador HR-ICP-MS ELEMENT 1. interface do plasma, 2. focalizador e transferidor óptico, 3. acelerador e focalizador do feixe, 4. fenda de entrada, 5. setor magnético, 6. setor elétrico, 7. fenda de saída, 8. multiplicador de elétrons, 9. Detector multiplicador de elétrons secundários.

2.6 Preparo da amostra para análise no ICP-MS

O tratamento da amostra para análise, apesar de consumir o maior tempo do trabalho técnico, é uma etapa indispensável do processo analítico, principalmente, quando a introdução da amostra no sistema é realizada por via úmida. Nesta etapa, o preparo correto da amostra, em função dos objetivos do estudo, pode aumentar as vantagens oferecidas pela técnica de espectrometria de massa com fonte de plasma induzido.

O primeiro estágio no preparo da amostra biológica é a remoção do seu conteúdo orgânico, o que normalmente se consegue com a digestão da amostra em sistema de aquecimento fechado, com controle de tempo, pressão e temperatura ou aberto, auxiliado pelo uso de alguns ácidos, ou combinações deles (HNO_3 , H_2SO_4 , HClO_4). Um outro método utilizado é a incineração da amostra em mufla, com temperaturas entre 450 e 550 °C por um período médio de 48 horas.

Além da digestão, a separação do analito de interesse de outros elementos com capacidade de interferência poliatômica, têm proporcionado redução nos níveis de desvio padrão relativo, elevando a precisão analítica em estudos que utilizam dados de razão isotópica (EAGLES & ROGHAN, 1991)

A maioria dos trabalhos que realiza a separação do zinco, utiliza a técnica de cromatografia de troca iônica com resina sintética, cujo processo tem demonstrado um alto grau de eficiência (EAGLES & ROGHAN, 1991; FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 1993; LOWE *et al.*, 1997; MARÉCHAL *et al.*, 1999; KING *et al.*, 2001).

Uma avaliação experimental (SARKIS *et al.*, 2002), comprova a eficiência da separação do zinco por cromatografia de troca iônica, no aumento da precisão analítica para medidas das razões isotópicas desse elemento, em amostras de urina, analisadas por espectrometria de massa com fonte de plasma induzido de alta resolução (HR-ICP-MS).

Diante do exposto e da necessidade de informações acerca da influência de dietas típicas de diferentes regiões na biodisponibilidade do

zinco, justifica-se a realização deste trabalho. Espera-se ainda, que a técnica utilizada permita novos caminhos para pesquisas na área da nutrição, visando a identificação e prevenção dos riscos da deficiência nutricional do zinco e de outros minerais traço.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar, em humanos, a biodisponibilidade do zinco em dieta brasileira, adequada teoricamente em energia e macronutrientes, utilizando técnica com isótopos estáveis.

3. 2 Específicos

- Caracterizar os participantes do estudo;
- Identificar o perfil alimentar do grupo;
- Elaborar e oferecer dietas equilibradas em macronutrientes aos participantes da pesquisa;
- Avaliar o estado nutricional relativo ao zinco dos participantes.

4 METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho experimental

Este trabalho contou com a disponibilidade física, instrumental e técnica do Laboratório de Nutrição Minerais do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo e do Laboratório de Caracterização Isotópica, do Departamento de Supervisão de Caracterização Química, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- IPEN.

Colaboraram também com esta pesquisa, o Laboratório FARMOTERÁPICA, na elaboração e acondicionamento das doses de zinco intravenosas, bem como o Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, durante as coletas de sangue e administração intravenosa do isótopo.

Participaram do estudo indivíduos adultos, saudáveis, do sexo masculino, recrutados junto à Comunidade Universitária da Universidade de São Paulo.

A primeira etapa do trabalho se constituiu da identificação dos participantes da pesquisa e posterior avaliação do perfil nutricional de cada um. Para tanto foram considerados parâmetros antropométricos, exames bioquímicos e clínicos, além de registros de ingestão alimentar. Com base no perfil nutricional avaliado e utilizando um programa computadorizado, dietas de uma semana foram teoricamente planejadas, balanceadas em energia e macronutrientes, para cada indivíduo, segundo a RDA (Recommended Dietary Allowance- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989a). Simultaneamente foram preparadas doses de soluções isotópicas de ^{70}Zn e ^{67}Zn , para serem administradas como traçadores.

Numa segunda etapa, as dietas planejadas, compostas de quatro refeições/dia, foram elaboradas e oferecidas a cada um dos participantes,

durante sete dias consecutivos, antes da administração dos traçadores. No oitavo dia do experimento, após jejum de 12 horas, cada voluntário recebeu uma dose intravenosa de uma solução de ^{70}Zn , antes do desjejum, e uma dose oral de ^{67}Zn , acrescida à refeição de almoço. A partir daquela refeição, todos retornaram à sua alimentação habitual. Duplicatas das dietas individuais oferecidas foram congeladas para posterior análise química laboratorial. Esta etapa do trabalho teve a duração de dois meses (outubro/dezembro de 2000).

Durante o período do experimento, com vista à determinação do estado nutricional relativo ao zinco, cada participante foi submetido a três colheitas de sangue venoso de 20 mL cada uma, sendo a primeira no dia de início da ingestão das dietas planejadas, a segunda sete dias após a ingestão das mesmas e a terceira, no final do experimento, ou seja, sete dias após retorno à dieta habitual de cada um. No mesmo período, foram feitas nove (9) colheitas de urina de 24 horas, sendo uma no primeiro dia do experimento, a outra antes da administração dos isótopos e mais sete colheitas consecutivas, para rastreamento isotópico na urina e conseqüente avaliação da biodisponibilidade do zinco da dieta. O protocolo do experimento é apresentado como **Anexo A**.

4.2 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.2.1 Voluntários

Para o recrutamento dos voluntários foram utilizados cartazes, contatos pessoais e uma ficha de identificação, conforme **Anexo B**. Tendo em foco a homogeneidade do grupo, foram convocados apenas indivíduos adultos, do sexo masculino, com idade entre 18 e 45 anos. Foram considerados como critérios de exclusão o uso de fumo, medicamentos e suplementos minerais.

Catorze (14) indivíduos, do sexo masculino, com idade entre 19 e 42 anos, considerados saudáveis, iniciaram a pesquisa, porém, dois deles tiveram sua participação cancelada, por incompatibilidade de horários durante o período experimental. Todos os participantes foram informados previamente sobre os procedimentos do estudo e forneceram por escrito seu consentimento (**Anexo C**). O desenho experimental do trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas–FCF, da Universidade de São Paulo–USP, conforme Port. 111 de 11/12/97–F.C.F. (**Anexo D**).

4.2.2 Perfil nutricional do grupo

4.2.2.1 Medidas antropométricas

Para a avaliação da composição corporal dos indivíduos participantes da pesquisa foram utilizadas as variáveis estatura, massa corporal e distribuição da mesma. Todas as medições foram realizadas estando os voluntários em jejum de 12 horas, descalços, usando roupas leves. O peso foi aferido em balança digital (Kratos-CAS®, modelo Línea, capacidade para 150 kg, mínimo 50g) e a estatura com o auxílio de um antropômetro, constituído de uma plataforma e uma fita métrica graduada em centímetros, acoplada a um esquadro móvel. Ambas as medidas foram obtidas com o indivíduo em posição ereta.

A quantificação corporal da massa gorda, massa magra e água, de cada indivíduo, foi facilitada pelo uso da técnica da impedância bioelétrica, utilizando-se um BIODYNAMICS, modelo 310, Body Composition Analyser – USA. As medidas foram realizadas com o indivíduo deitado sobre uma mesa de madeira, após alguns minutos de relaxamento.

Dada sua facilidade de interpretação para diagnóstico e classificação de obesidade, o Índice de Massa Corporal (IMC), que relaciona o peso atual do indivíduo (kg) e sua altura ao quadrado (m^2) (BRAY, 1996), foi utilizado como uma medida secundária.

o peso atual do indivíduo (kg) e sua altura ao quadrado (m²) (BRAY, 1996), foi utilizado como uma medida secundária.

4.2.2.2 Parâmetros bioquímicos e clínicos

Cada voluntário foi submetido aos seguintes exames laboratoriais: hemograma completo, glicemia, creatinina, uréia, transaminase alanina (ALT/TGP) e transaminase aspartato (AST/TGO), todos em amostra sanguínea, por métodos padronizados, conforme verificado no **Anexo E**. De posse dos resultados, cada voluntário foi submetido a exame clínico, realizado por um profissional médico (**Anexo F**). Tais medidas, além do intuito de avaliação do estado nutricional do grupo, serviram para identificar a presença de anemia, infecções, diabetes mellitus, comprometimento renal ou hepático, visando evitar fatores relacionados ao indivíduo passíveis de interferência nos resultados do trabalho. Ao final da avaliação os mesmos foram considerados aptos para a pesquisa.

4.2.2.3 Inquérito alimentar

Considerando que a combinação de métodos é aconselhável quando se deseja obter o perfil alimentar de indivíduos (STEEN, 1994), a ingestão dietética dos participantes do experimento foi identificada com base nos métodos de frequência alimentar e registro de consumo de três dias, sendo um, no final de semana.

Quando da entrega dos formulários utilizados, também foram fornecidas as devidas instruções de preenchimento (**Anexo G e H**) e um conjunto de medidas padrão, composto de xícaras, colheres e copo graduado, no sentido de facilitar e uniformizar as medidas registradas.

O questionário de frequência alimentar, composto por uma lista de alimentos classificados por grupos, além de alguns tipos de preparações, foi preenchido pelo próprio indivíduo. Este questionário foi utilizado com o objetivo principal, de obter informações acerca das preferências (não gosto,

gosto mais ou menos, gosto muito), consumo de alimentos por refeição e frequência de ingestão (semanal e mensal), com a finalidade de subsidiar o planejamento e elaboração das refeições oferecidas.

As dietas registradas pelos participantes, consumidas num período de três dias, foram avaliadas quanto à sua composição química, tendo como instrumento de análise o “Virtual Nutri” do Departamento de Nutrição, da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (PHLIPPI *et al*, 1996), o qual considera os parâmetros da *Recommended Dietary Allowances* (NRC, 1989a), e cujo banco de dados abrange variadas tabelas de composição de alimentos.

4.2.3 Preparo das soluções isotópicas e das doses oral e intravenosa

Os três isótopos (^{67}Zn , ^{70}Zn e ^{68}Zn) utilizados no preparo das soluções isotópicas, foram adquiridos na Oakridge National Laboratory - Oakridge, TN, na forma de óxido de zinco (ZnO), enriquecidos com uma abundância de 94,6%, 99,71% e 99,72%, respectivamente.

Para o preparo da solução ^{67}Zn , o isótopo, na forma adquirida (ZnO), foi dissolvido com algumas gotas de HCl 30% concentrado (suprapur - Merk) e repassado para um béquer, previamente tarado, onde a massa da solução foi completada com água trideionizada, tipo Milli-Q, para uma concentração de 2mg/mL. Esta solução, destinada à administração oral, foi dividida em alíquotas de $\pm 1,5\text{g}$ (balança analítica), acondicionadas em Eppendorfs, previamente desmineralizados e identificados. As doses foram mantidas à 4°C, até o momento de seu uso.

A solução de ^{68}Zn foi preparada de maneira idêntica àquela de ^{67}Zn , porém, com concentração aproximada de 123 $\mu\text{g/mL}$. Esta solução foi utilizada como spike, para quantificação da concentração de zinco na urina, pela técnica de diluição isotópica.

A solução de ^{70}Zn , administrada por via intravenosa, foi preparada utilizando-se água injetável e material estéril e apirogênico. O isótopo ^{70}Zn , conforme adquirido (ZnO), foi analiticamente pesado e dissolvido com aproximadamente 4mL de HCl (30% suprapur-Merck). Em seguida, a solução foi diluída com 10mL de água e evaporada até a secura. O precipitado foi retomado com solução aquosa equimolar de citrato trissódico e seu pH ajustado para 6,5 com uma solução de bicarbonato de sódio 10%. A solução de citrato de ^{70}Zn foi filtrada em Sterivex GP 0,22 micra e cada 2mL envasados em seringa de 3 mL, para uma concentração de ^{70}Zn de aproximadamente 1,2 mg por seringa ou dose. As amostras foram submetidas a testes pirogênicos e de esterilização, conforme rotina do laboratório e prescrição legal. Todo o procedimento foi realizado pelo laboratório FARMOTERÁPICA, especialista na elaboração de dietas parenterais, sob a supervisão de um profissional farmacêutico credenciado.

4.2.4 Dietas

4.2.4.1 Planejamento

Considerando o perfil alimentar do grupo, dietas adequadas em energia e distribuição percentual de macronutrientes, foram teoricamente planejadas para atender às necessidades de cada participante do estudo, segundo recomendações da *Recommended Dietary Allowances* – RDA (NRC, 1989a).

O planejamento das dietas teve início com a elaboração de um modelo de cardápios qualitativos, constituído de preparações diversificadas, para fazer face a um período de oito dias, dos quais, sete com quatro refeições/dia e o oitavo até a refeição do almoço. Este plano modelo foi submetido à apreciação dos participantes da pesquisa, sendo o mesmo aprovado por todos.

Ainda como um modelo, cada dieta foi balanceada para atender aproximadamente 3 000 kcal/dia, distribuídas entre o desjejum ($\pm 15\%$), almoço ($\pm 36\%$), lanche da tarde ($\pm 13\%$) e jantar (36%) (**Anexo I**). Para estimativa da composição química teórica das dietas planejadas, também, foi utilizado o *software* "Virtual Nutri" do Departamento de Nutrição, da Faculdade de Saúde Pública, da Universidade de São Paulo (PHILIPPI *et al*, 1996).

Durante o processo de padronização dos cardápios, verificou-se que algumas preparações, as quais se desejava oferecer, não estavam contempladas no referido *software*, havendo contudo, a possibilidade de serem inseridas. Diante dessa informação, várias preparações entre elas: arroz, feijão, bife acebolado, almôndegas aceboladas, abobrinha à moda, batata frita, "stroganoff" de frango e feijoada, foram introduzidas no programa, depois de determinada a composição centesimal teórica de cada uma, utilizando o mesmo banco de dados. Para tanto, foi pesado um quilo do alimento considerado como básico da preparação, citando-se como exemplo o arroz, no caso do arroz refogado. As quantidades de todos os demais ingredientes utilizados nas preparações, foram padronizadas com medidas caseiras e pesadas. Depois de elaborada, cada preparação teve seu peso aferido e rendimento calculado, tomando-se como referência, porções de 100g. O total, em gramas, de cada ingrediente cru utilizado foi dividido pelo número de porções calculadas, o que possibilitou conhecer a composição quantitativa de ingredientes crus em 100g da preparação pronta para posterior determinação de sua composição química teórica, pelo próprio "Virtual Nutri". Quando da ausência de dados no programa, foram consultados e inseridos aqueles da tabela de composição Química da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo (<http://www.fcf/TABELA>). Desta forma, as preparações planejadas foram introduzidas no "Virtual Nutri", como uma nova preparação, passando a servir de referência no desenvolvimento da pesquisa.

As dietas foram adaptadas quantitativamente às necessidades de cada um dos participantes, utilizando o software do "Virtual Nutri" e as variáveis peso, idade, estatura e atividade física, conhecidas durante os registros das medidas antropométricas. Para a classificação dos voluntários na categoria "atividade", tomou-se, como semelhante, a atividade ocupacional dos voluntários, e como diferencial, o fato de que vários deles praticavam algum tipo de modalidade física, embora não competitiva. Por falta de informações sobre a intensidade dos exercícios praticados, foram levados em conta, apenas, o tempo e a frequência das atividades desenvolvidas, cujo produto dividido por sete dias, permitiu uma estimativa do tempo diário dedicado à atividade praticada. Considerando pequena a contribuição dos ácidos graxos, como substrato energético, nos primeiros trinta minutos de exercício, este tempo foi adotado como um "ponto de corte". Assim aqueles indivíduos praticantes de alguma modalidade física, por um período de tempo superior a 30 minutos/dia, foram incluídos na atividade moderada, enquanto os demais na atividade leve.

Todos os participantes da pesquisa receberam os mesmos alimentos e refeições, com pequenas diferenças, apenas, nas preparações de arroz, feijão, macarrão e carnes, necessárias para ajuste das necessidades energéticas de cada um.

4.2.4.2 Oferta

Conforme o que foi planejado, as dietas foram executadas, segundo hábitos da população e dos participantes, considerando os registros anteriormente citados. Estas foram oferecidas a cada um dos indivíduos, por um período de sete dias consecutivos. Todas as refeições foram identificadas com o nome do participante e da dieta. Preparações que exigiam um maior tempo de preparo foram elaboradas com antecedência, pesadas, acondicionadas em embalagens apropriadas e em seguida congeladas. Outras como saladas, ovos, sucos, frutas e lanche da tarde foram confeccionadas de véspera. O leite, o café e sanduíche do desjejum

foram preparados no mesmo dia. Todas as dietas foram recebidas diariamente, pela manhã, por cada um dos participantes, no Bloco-14 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, exceto a de domingo, cuja entrega foi realizada no sábado. O desjejum foi ingerido na copa do próprio local de entrega e sob supervisão. As demais refeições foram levadas por eles, e mantidas em geladeira até o momento do consumo. As refeições de almoço e lanche, exceto as de final de semana, foram realizadas, nas copas dos locais de trabalho de cada um, uma vez que todas eram equipadas com forno de microondas. A refeição do jantar, bem como aquelas do sábado e domingo, foram transportadas por eles próprios, para serem consumidas em suas residências. Tal procedimento foi adotado não só pela falta de uma Unidade Metabólica, mas também por ser desejável o desenvolvimento do trabalho em condições livres e o mais natural possível. Durante todo o processo de seleção, e principalmente no período do experimento, foi enfatizado que todos deveriam comer, apenas, a dieta oferecida. O fato de que poderiam ficar com fome, foi um receio manifestado por todos os participantes. Diante disso e da preocupação de que algum alimento pudesse ser ingerido adicionalmente, sem nenhum registro, ficou acordado entre as partes que, se por necessidade, algum alimento fosse consumido a mais, uma duplicata do mesmo seria trazida para o laboratório, assim como, no caso de sobras, estas seriam devolvidas. Duplicatas das refeições diárias de cada indivíduo, assim como da dieta marcada, foram acondicionadas da mesma maneira como foram distribuídas e em seguida congeladas em freezer (-18°C), a fim de serem submetidas à análise química direta em laboratório, para determinação da sua composição centesimal, além dos conteúdos de fibras, fitato, zinco, ferro e cálcio. Todos os alimentos e preparações oferecidas, inclusive as duplicatas, foram pesadas em balança digital (KRATOS[®], capacidade 6Kg e mínimo de 1g) ou medidas com o auxílio de utensílios padronizados.

4.2.5 Administração das doses oral e intravenosa

Às 8:00 horas do oitavo dia do experimento, após jejum de doze horas, o participante foi convocado a comparecer ao Laboratório de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, para a segunda coleta de 20mL de sangue e administração da dose intravenosa de ^{70}Zn . Por meio de um catéter, colocado na veia do braço, a amostra de sangue foi coletada e logo depois injetados 2mL da solução de ^{70}Zn , seguida de 5mL de solução salina, introduzida vagarosamente, com uma segunda seringa, visando a lavagem da cânula e garantia da dose aplicada. Para conhecer com certeza a massa da solução intravenosa administrada, a primeira seringa foi aferida, em balança analítica (0,0001g), antes e após a aplicação da dose.

Tanto o preparo das soluções isotópicas, oral e intravenosa, quanto a administração das mesmas, seguiu orientação pessoal do Dr. Thomas Edgard Fox, da equipe de pesquisadores do Institute of Food Research Norwich Laboratory, Norwich, UK.

Sob o ponto de vista médico, a administração do zinco intravenoso, na situação proposta pelo trabalho, é considerada um procedimento simples e portanto dispensável o ambiente hospitalar. No entanto, esta atividade deve ser executada por pessoal especializado e treinado, em local com condições de higiene, conforto e segurança para o participante da pesquisa. Estas condições foram, perfeitamente, encontradas, no Laboratório de Análises Clínicas, desta Faculdade. Ainda assim, por medida de segurança e questões éticas, todo o processo foi acompanhado por um médico.

Por volta das 12:00 horas, do mesmo dia da administração da dose intravenosa, foi servido o almoço, com quantidades iguais para todos os participantes. Este foi composto de salada de alface com tomate, batata frita, bife acebolado, arroz, feijão, pão, salada de frutas (mamão/laranja/abacaxi) e suco de maracujá, correspondendo às mesmas

preparações servidas no primeiro dia do experimento. Constituída de alimentos e preparações de consumo comum dos brasileiros, esta refeição foi preparada de véspera, ocasião em que foi extrinsecamente marcada. A dose ^{67}Zn foi acrescentada à porção individual de feijão, de maneira a permitir a estabilização do isótopo, com o conteúdo natural de zinco, no alimento. O pão foi servido com o intuito de auxiliar na limpeza dos resíduos alimentares do prato, garantindo assim, a ingestão total da dose oral.

4.2.6 Coleta do material biológico

Todos os participantes da pesquisa foram devidamente instruídos para todas as etapas do trabalho e em especial para as coletas de material biológico, instruções que foram lembradas e enfatizadas a cada coleta.

4.2.6.1 Sangue

Durante o período da pesquisa, utilizando agulha e seringa descartáveis, três volumes de 20 mL de sangue venoso foram retirados da veia antecubital de cada indivíduo, sendo uma no primeiro dia, antes da ingestão da dieta, a segunda sete dias depois, porém, antes da administração das doses com os isótopos, e a terceira no final do experimento, ou seja, sete dias após retorno à dieta habitual de cada indivíduo. Todas as coletas foram realizadas, após jejum de 12 horas. Cada volume de sangue coletado foi imediatamente transferido para tubos de centrífuga, de polipropileno, previamente desmineralizados, contendo citrato de sódio, como anticoagulante, e as amostras transportadas ao Laboratório de Minerais, para separação, imediata das frações de plasma e eritrócitos.

Para a separação das frações sangüíneas, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, a $3000 \times g$ e temperatura de 4°C , em centrífuga refrigerada de marca SORVAL®, com Rotor- SM24. Ao final do processo, o sobrenadante, ou seja, o plasma, foi aspirado em alíquotas de

aproximadamente 1mL e acondicionadas em Eppendorfs, previamente desmineralizados e identificados.

À papa de hemácias, no tubo de centrífuga, foram acrescentados 5mL de solução salina 0,9%, sendo vagarosamente agitada por inversão e novamente, centrifugada por 10 minutos, a 4°C e 10000 x g. Ao término da operação, a solução salina foi aspirada e desprezada. O processo foi repetido por mais duas vezes. Ao final, a papa de hemácias foi cuidadosamente coletada em Eppendorfs, também, desmineralizados e identificados.

Depois de separados, as amostras de plasma e eritrócitos, foram efetivamente armazenadas a -80°C, para análises posteriores.

4.2.6.2 Urina de 24 horas

No total, foram coletadas nove amostras de urina, cada uma correspondente ao volume de um período de 24 horas. A primeira coleta foi iniciada um dia antes de começar o experimento, a segunda, um dia antes da administração dos traçadores e as demais, durante os sete dias seguintes, até o final do experimento.

Cada voluntário recebeu, no dia anterior a cada coleta de urina, dois frascos com capacidade de 2L cada um, previamente desmineralizados. Estes foram entregues, acondicionados em sacos plásticos fechados, após terem sido tarados e identificados com as iniciais do voluntário, número e data da coleta.

Iniciada com a segunda urina de um dia, até a primeira do dia seguinte, cada coleta urinária de 24 horas foi mantida sob refrigeração. A devolução dos frascos com a urina coletada ocorreu pela manhã. A quantidade total excretada foi aferida, pesando-se cada frasco, sem a respectiva tampa. Em seguida, o conteúdo dos frascos foi cuidadosamente homogeneizado, e três alíquotas de aproximadamente 200mL foram separadas em recipientes plásticos com capacidade de 300mL e tampa com

rosca, devidamente desmineralizados e identificados. As amostras foram congeladas à temperatura de -18°C para análises posteriores.

4.2.7 Avaliação do estado nutricional relativo ao zinco

O estado nutricional relativo ao zinco, de cada indivíduo, foi avaliado antes e depois da ingestão das dietas planejadas, bem como sete dias após retorno à dieta habitual de cada um. Para tanto, concentrações de zinco no plasma, eritrócitos e urina foram determinadas pela técnica de espectrofotometria de absorção atômica por chama (FAAS). Os resultados de zinco nos eritrócitos foram expressos em função da concentração de hemoglobina, determinada pelo método de cianometahemoglobina (van ASSENDELFT, 1972).

4.2.8 Rastreamento isotópico do zinco urinário

O rastreamento isotópico do zinco urinário foi realizado utilizando-se a técnica de espectrometria de massa por plasma induzido (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry–ICP-MS). A biodisponibilidade do zinco foi avaliada pela quantificação das mudanças na razão isotópica de ^{67}Zn e ^{70}Zn , em função do enriquecimento dos mesmos, nas amostras de urina de cada indivíduo.

4.2.9 Procedimentos analíticos

4.2.9.1 Limpeza do material

Todo o material e vidraria destinados à análise do zinco ou às coletas de sangue, urina e separação das frações sangüíneas, passaram por processo prévio de lavagem ácida, com imersão em solução de ácido nítrico (HNO_3) P.A a 20%, por um período mínimo de 12 horas. Depois de retirados do ácido, os mesmos foram enxaguados com água bidestilada e tridestilada, respectivamente, em duas etapas de 5 vezes cada uma. Em seguida, foram secos em estufa regulada a 25°C , destinada exclusivamente à secagem de

material desmineralizado. Ao término desta última etapa, o material foi embalado em filme ou sacos plásticos, selados, datados e conservados até o momento de seu uso.

4.2.9.2 Análise química direta das dietas consumidas

Duplicatas das dietas consumidas, por cada participante da pesquisa, tiveram seus conteúdos de macronutrientes, energia, fitato, zinco, cálcio e ferro, determinados por métodos diretos em laboratório.

4.2.9.2.1 Preparo das amostras para análise química

Considerando a grande quantidade de amostras a serem analisadas, optou-se pela composição de um *pool* de dietas para cada voluntário, com resultados correspondentes à média diária de sete dias. As duplicatas da refeição marcada, também, foram transformadas num único *pool*, uma vez que esta foi consumida por todos, nas mesmas quantidades.

Na semana seguinte à distribuição das dietas, suas respectivas duplicatas foram descongeladas, trituradas e liofilizadas. A etapa de trituração foi realizada com o auxílio de dois liqüidificadores, um de porte industrial, em aço inox, com capacidade para 4 litros e o outro de porte doméstico. O maior e mais possante foi utilizado para as preparações de maior volume e consistência, como carnes, arroz, feijão e outras, enquanto o pequeno, para as frutas e saladas. Nesta fase foram excluídas as quantidades equivalentes aos alimentos devolvidos, assim como, acrescentadas as duplicatas daqueles extraordinariamente consumidos. Os líquidos ajudaram no processo de trituração, em ambos os processadores. A mistura foi acondicionada em recipiente de polipropileno, com capacidade para 30 kg, previamente tarado e identificado para cada voluntário e várias vezes homogeneizada, com o auxílio de uma espátula. Depois de aferida em balança digital (KRATOS-CAS®, modelo Linea, cap. 150 kg x 50g), a massa total foi registrada. Alíquotas de aproximadamente 5g do homogeneizado foram, imediatamente, tomadas para determinação da umidade em estufa a

105°C e cerca de 1kg, colocado em bandejas de inox para ser liofilizado. O restante do material foi desprezado.

Concluído o processo de liofilização, com duração média de três dias, parte da amostra ($\pm 20\text{g}$), foi separada em frascos de polipropileno desmineralizados, para determinações posteriores de zinco, ferro e cálcio. O restante foi triturado, peneirado, embalado em saco plástico e armazenado à temperatura ambiente ($\pm 22^\circ\text{C}$), para análise de sua composição centesimal, e fitato.

A composição das dietas foi determinada, em três replicatas, para cada variável analisada.

4.2.9.2.2 Umidade

A umidade foi determinada por método gravimétrico, utilizando-se estufa regulada a 105°C, até peso constante (AOAC, 1995).

4.2.9.2.3 Fração cinza ou resíduo mineral fixo

A fração cinzas foi determinada por método gravimétrico, com incineração da amostra em mufla a 550°C por 12 horas (AOAC, 1995).

4.2.9.2.4 Proteínas

A proteína total da dieta foi determinada pelo método de micro-Kjeldahl, com medida do nitrogênio total e conversão em proteína, utilizando o fator de correção de 6,25. A digestão da amostra foi realizada em bloco digestor a 350°C, por um período aproximado de 3 horas (AOAC, 1995).

4.2.9.2.5 Extrato etéreo

A fração de extrato etéreo foi determinada em extrator de Soxhlet, utilizando éter etílico P.A, como solvente, e evaporação final do mesmo (AOAC, 1995).

4.2.9.2.6 Fração fibras

A fração fibra foi determinada no Laboratório de Bioquímica, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, desta Faculdade, pelo método gravimétrico de hidrólise enzimática (AOAC, 1995) e sua análise, restrita à refeição do almoço, destinada à marcação com os traçadores.

Esta técnica consiste do tratamento da amostra, previamente desengordurada, com alfa-amilase , seguida de digestão com pepsina e pancreatina. O resultado da digestão é precipitado com etanol, evaporado e seco. No resíduo são determinadas proteínas e cinzas remanescentes, cujos valores são subtraídos do resíduo total encontrado, resultando na quantidade de fibra contida na amostra.

O método permitiu quantificar, separadamente, as fibras solúveis e insolúveis, presentes na amostra.

4.2.9.2.7 Fração nifext

A fração nifext foi obtida por diferença, em relação à somatória das determinações realizadas.

4.2.9.2.8 Energia

Para o cálculo do total de energia foram considerados os valores de 9kcal para lipídios e de 4kcal para proteínas e fração "nifext".

4.2.9.2.9 Minerais

As concentrações de zinco, cálcio e ferro, nas dietas, foram determinadas pela técnica de análise por Ativação Atômica de Nêutrons, na Divisão de Radioquímica, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN). Esta técnica permite determinações multielementares de elementos inorgânicos, de interesse nutricional e toxicológico para o organismo humano.

Cada amostra, previamente dessecada, foi triturada em processador com lâmina de tungstênio, para evitar possíveis contaminações. Alíquotas da mistura foram colocadas em envelopes de polipropileno desmineralizados. Igual procedimento foi realizado para padrões multielementares, preparados por grupo de elementos, conforme suas características nucleares (energia de emissão e meia-vida). Em seguida, as amostras e padrões foram submetidas a um fluxo de nêutrons, proveniente de um reator nuclear. Induzidas pela carga de nêutrons, mudanças nas características físicas do núcleo atômico, dos elementos constituintes destas amostras, proporcionaram a formação de radioisótopos. A detecção dos mesmos foi realizada por espectrometria gama, utilizando detectores semicondutores de Ge (hiperpuro), que possuem elevado poder de detecção. Os espectros obtidos foram analisados por programas de computação, especialmente desenvolvidos para essa finalidade. A concentração do analito de interesse foi obtida pelo cálculo da área do fotopico do radioisótopo formado e a do padrão com massa conhecida.

4.2.9.2.10 Fitato

Para quantificação de fitato, nas dietas consumidas, foi utilizado o método de SANDBERG & AHDERINE (1986). A determinação dos isômeros hexa e penta-fosfato foi realizada com a dissolução da amostra dessecada em HCl, extração do fosfato em coluna de troca iônica, e quantificação das frações de interesse, por cromatografia de alta eficiência (High Performance

Liquid Chromatography - HPLC). Estas determinações foram realizadas na Alemanha*.

4.2.9.3 Determinação do zinco no material biológico

As concentrações de zinco nas amostras de plasma, eritrócitos e urina foram medidas usando um espectrofotômetro de marca HITACHI®, Modelo Z-5000, com chama de ar acetileno e lâmpada de catodo oco, calibrado para um comprimento de onda de 213,9 nm e fenda 0,7 nm. As leituras foram feitas em triplicata, com tempo de integração de 3 segundos. A curva de calibração, com concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1,0 µg de Zn/mL da solução, foi preparada a partir de uma solução padrão de Zn (Titrizol solução- Merck), utilizando como solvente uma solução de água destilada a 1% de ácido nítrico e 3% de glicerol. Este último foi usado para acerto da viscosidade, em relação ao plasma e eritrócito. Nas análises de urina não é necessário o glicerol.

4.2.9.3.1 Preparo das amostras de plasma

Depois de descongelado e homogeneizado, três alíquotas do plasma foram colocadas em tubos de polietileno e diluídas com água tridestilada (tipo Milli-Q), numa proporção de 1:4. A solução foi homogeneizada e aspirada diretamente na chama do espectrofotômetro (RODRIGUEZ *et al.*, 1989).

* As análises foram realizadas pelo Dr. Ralf Greiner, do Federal Research Centre for Nutrition- Germany.

4.2.9.3.2 Preparo das amostras de eritrócitos

A exemplo do plasma, as amostras de eritrócitos foram previamente descongeladas e homogeneizadas. Uma alíquota da amostra foi transferida para um tubo de vidro de 5 mL, diluída com água trideionizado (tipo Milli-Q) na proporção de 1:10 e novamente homogeneizada. Esta solução foi denominada "lisado 1". Em seguida, utilizando tubos de vidro de 5 mL, amostras, em duplicata, do "lisado 1" foram diluídas com água trideionizada (tipo Milli-Q) na proporção de 1:4. Após agitação, as referidas duplicatas foram levadas para análise no espectrofotômetro (FAAS), sendo diretamente aspiradas na chama (WHITEHOUSE *et al.*, 1982).

Uma vez que os resultados da concentração de zinco, nos eritrócitos, são expressos em função de sua concentração de hemoglobina, esta foi determinada em amostras, em triplicata, do "lisado 1" contendo 20µL do mesmo e 5mL de solução de Drabkin. Também em triplicata, amostras com 20µL de uma solução padrão de hemoglobina (Labtest®) e 5mL da solução de Drabkin foram utilizadas como referência. A solução de Drabkin foi preparada com 10mL de reagente de cor para determinação de hemoglobina (Labtest Diagnóstica®) e água tipo Milli-Q, para um volume total de 1000mL da solução. A absorbância das amostras e do padrão foram medidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 525nm e foram realizadas três leituras para cada amostra. Somente foram considerados aceitáveis os resultados com desvio padrão de até 5%. Para as amostras que não atingiram este patamar, todos os procedimentos foram repetidos.

4.2.9.3.3 Urina

As amostras de urina analisadas por espectrofotometria de absorção atômica, não sofreram qualquer tratamento prévio. Após totalmente descongeladas, as leituras foram realizadas pela aspiração direta da amostra.

4.2.9.4 Preparo das amostras de urina para medidas da razão isotópica do zinco

O preparo prévio das amostras de urina por meio da digestão das mesmas e purificação do zinco foi testado em condições preliminares, durante o desenvolvimento deste estudo. Este procedimento provou aumentar a precisão analítica da técnica de espectrometria de massa com fonte de plasma induzido de alta resolução (HR-ICP-MS) ("Element" - FINNIGAN MAT®, Bremen, Alemanha), para a determinação das concentrações e razões isotópicas do zinco. Por este motivo, os dois processos foram empregados neste trabalho.

Para cada amostra, porções de urina (± 170 g) em duplicata, foram pesadas em um béquer, contendo cerca de $333\mu\text{L}$ da solução ^{68}Zn , cuja massa foi aferida analiticamente em balança digital (METTLER®-Alemanha, capacidade 200g). As alíquotas foram evaporadas até a secura, em placa aquecida com temperatura média de 60°C . Depois de secas e carbonizadas, cada amostra foi coberta com um vidro relógio e incinerada em mufla, a 450°C , por 48 horas. As cinzas resultantes foram diluídas com 10mL HCl concentrado (30% suprapur-Merck) e este, totalmente evaporado, em placa aquecida a $\pm 80^{\circ}\text{C}$. As cinzas foram novamente diluídas com cerca de 20mL 0,5N HCl. A solução foi filtrada em papel de filtro 41 s/ cinzas (Whatman), e recolhida em frasco de polipropileno, devidamente desmineralizado e identificado.

Para a separação do zinco de outros elementos componentes da matriz, utilizou-se o método de separação por troca iônica, com resina AG1-X8, 200-400 mesh (Bio Rad Laboratories®, California-USA), em meio clorídrico.

Antes de ser utilizada pela primeira vez, a resina foi hidratada por 48 horas, com água tipo Milli-Q, numa proporção de 1:3. Para sua limpeza, a mesma foi submetida a três banhos consecutivos de ultra-som, com duração de 15 minutos cada um, desprezando-se o sobrenadante a cada banho.

Para o processo de separação propriamente dito, pipetas "Pasteur", com pequena porção de lã de vidro depositada em suas extremidades inferiores, foram utilizadas como colunas. Cada coluna teve 2/3 de seu volume ocupado pela resina, em meio aquoso, depositada cuidadosamente. Na coluna, a resina foi lavada com 60mL de ácido 2N HNO₃ (65% suprapur-Merck) e condicionada com 60mL de 0,5N HCl (30% suprapur-Merck). Após a adição da amostra, a coluna foi novamente lavada com 30mL 0,5N HCl. Todos os volumes utilizados foram depositados na coluna em frações de 10 mL, com um fluxo na resina de 1mL/minuto. O zinco foi eluído com 10mL de 0,04N HCl. Depois de desprezados os primeiros 5mL, sete alíquotas do eluído foram recolhidas em microtubos de 1,5mL e colocados numa capela de fluxo laminar, sob o calor de uma lâmpada de 500W, até completa evaporação de seu conteúdo líquido. Ao final do processo, os microtubos foram fechados e mantidos em temperatura ambiente, até reconstituição das amostras para análise no ICP- MS.

4.2.9.5 Medidas da razão isotópica do zinco na urina

As determinações das razões isotópicas do zinco nas amostras de urina foram realizadas com o "Element" (FINNIGAN MAT[®], Bremen, Alemanha), um espectrômetro de massa de alta resolução com fonte de plasma induzido (HR-ICP-MS), equipado com analisador Nier-Johnson. As condições operacionais utilizadas durante as análises estão descritas na tabela que se segue:

Parâmetros operacionais do HR-ICP-MS

Resolução (m/Δm)	300 = baixa
Potência do Rf	1050W
Tocha	Plasma frio
Cone de amostragem	Platina (orifício 1,1mm di)
Cone de separação	Platina (orifício 0,8 mm di)
Câmara de nebulização	Dupla parede refrigerada
Nebulizador concentríco	" Meinhard "
Vazão do gás Plasma	13 –15 L/min.
Auxiliar	0,9 – 1,0 L/min.
Fluxo da amostra	0,6 – 0,7 mL/min.
Tempo de análise	1,30 min.
Número de medidas /amostra	24
Distância da tocha	Ajustado*
Distância da lente	Ajustado*

* ajustado para obtenção do sinal máximo

Para as determinações do enriquecimento dos isótopos ^{67}Zn e ^{70}Zn na urina foram medidas as razões $^{67}\text{Zn} / ^{66}\text{Zn}$ e $^{70}\text{Zn} / ^{66}\text{Zn}$ com níveis de precisão instrumental inferiores a 0,5% do desvio padrão relativo. Como referência para o zinco natural foi utilizada solução padrão de óxido de zinco (SPECPURE - JOHNSON MATTEHEY - ENGLAND)

Os cálculos para obtenção da fração de zinco absorvida da dieta foram realizados conforme a equação descrita abaixo. Para a execução dos cálculos contou-se com auxílio do Software "Stablecalc" , o qual foi desenvolvido pelo Dr. Jack Dainty do Institute of Food Research, Norwich, UK., com o objetivo de fornecer aos pesquisadores usuários de protocolos de estudos com isótopos estáveis, o suporte matemático necessário para o tratamento dos dados encontrados.

$$\% \text{ de absorção} = \frac{\% \text{ natural do } ^{67}\text{Zn}}{\% \text{ natural do } ^{70}\text{Zn}} \times \frac{\text{Dose } ^{70}\text{Zn } (\mu\text{g})}{\text{PM } ^{70}\text{Zn na sol.}} \times \frac{R_{\text{oral}} - R_{\text{nat}}}{R_{\text{nat}}} \times 100$$

$$\frac{\% \text{ natural do } ^{70}\text{Zn}}{\% \text{ natural do } ^{67}\text{Zn}} \times \frac{\text{Dose } ^{67}\text{Zn } (\mu\text{g})}{\text{PM } ^{67}\text{Zn na sol.}} \times \frac{R_{\text{iv}} - R_{\text{nat}}}{R_{\text{nat}}} \times 100$$

Onde:

% natural do ^{67}Zn = percentual de abundância natural do ^{67}Zn (oral);

% natural do ^{70}Zn = percentual de abundância natural do ^{70}Zn (intravenoso);

Dose ^{70}Zn (μg) = dose intravenosa;

Dose ^{67}Zn (μg) = dose oral;

PM ^{70}Zn na sol. = Peso molecular do ^{70}Zn solução intravenosa;

PM ^{67}Zn na sol. = Peso molecular do ^{67}Zn solução oral;

R oral = razão Zn 67/66 na amostra (resultados obtidos no espectrômetro de massa);

R iv = razão Zn 70/66 na amostra (resultados obtidos no espectrômetro de massa);

R nat = razão Zn 67/66 e 70/66 numa solução padrão de Zn (resultados obtidos no espectrômetro de massa);

4.3 Análise estatística

Considerando o tamanho da amostra, foram utilizados os testes não-paramétricos de Wilcoxon para as amostras relacionadas, tendo em vista os três tempos de análises (**Anexos J, L**). Diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 5\%$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso da técnica com isótopos estáveis como traçadores biológicos, permite que cada indivíduo avaliado seja seu próprio controle, uma vez que mudanças na razão isotópica do nutriente de interesse ocorrem no mesmo organismo, em relação à sua abundância natural. Além das vantagens características da técnica, este número aparentemente pequeno, também está relacionado com o custo financeiro para aquisição dos isótopos, considerados elevados (WASTENEY *et al.*, 2000; POKIDYCHEV & POKIDYCHEVA, 1999). Verifica-se na literatura protocolos de pesquisa com média de 12 indivíduos e variações entre 2 e 22 participantes (FAIRWEATHER-TAIT,1992; SANDSTRÖM,1993; KING *et al.* 2001), o que justifica o número de voluntários deste estudo.

As respostas aos objetivos deste trabalho foram obtidas com base nos resultados apresentados nas tabelas e gráficos que se seguem.

5.1 Caracterização dos participantes do estudo

A **Tabela 1** retrata as características de cada voluntário participante desta pesquisa, com relação à idade, sexo, origem, atividade ocupacional e física. Verifica-se a participação de 12 voluntários, todos do sexo masculino, considerados adultos jovens, com idade entre 19 e 42 anos. Os mesmos alegaram, durante o período do recrutamento, não fazer uso de medicamentos, suplementos vitamínicos e/ou minerais.

Dos 12 participantes, apenas um revelou origem estrangeira, nascido na China, porém residente em São Paulo desde os três anos de idade. Os demais apresentaram nacionalidade brasileira, sendo seis deles naturais de São Paulo e os outros cinco, dos Estados do Pará, Pernambuco, Minas Gerais, Bahia e Rio Grande do Sul.

Tabela 1 : Caracterização dos participantes do estudo

Voluntário	Sexo	Idade	Origem	Ocupação	Trabalho Semanal Horas	Uso de álcool	Tipo	Ativ, Física	Dias semana	Minutos dia	Minutos semana
1	M	39	SP	Téc, Laboratório	40	1 cálice de vinho/dia	Corrida		5	60	43
2	M	35	SP	Téc, Laboratório	40	1 cerveja/dia	Futebol		1	120	17
3	M	28	CHINA	Pós-Graduação	40	3 cervejas/mês	Caminhada		7	30	30
4	M	29	SP	Pós-Graduação	36	difficilmente	Não		Não	Não	Não
5	M	25	PE	Pós-Graduação	40	4 latas cerveja/semana	Yoga		2	45	13
6	M	26	RS	Pós-Graduação	40	Não	Corrida		6	60	51
7	M	27	PA	Pós-Graduação	48	2 copos cerveja/semana	Não		Não	Não	Não
8	M	27	SP	Téc, Administrativo	40	Não	Musculação		2	120	34
9	M	34	BA	Pós-Graduação	40	1 cerveja/semana	Não		Não	Não	Não
10	M	19	SP	Aux, Laboratório	40	Não	Musculação		2	180	51
11	M	35	MG	Téc, Administrativo	40	Não	Musculação		3	150	64
12	M	42	SP	Agente de Portaria	40	Não	Caminhada		7	60	60
Medidas Resumo											
Média		30,50			40,33				3,89	91,67	40,48
Mediana		28,50			40,00				3,00	60,00	42,86
DP		6,56			2,67				2,37	52,20	18,20
CV		21,50			6,63				60,91	56,95	44,96
Mínimo		19,00			36,00				1,00	30,00	13,00
Máximo		42,00			48,00				7,00	180,00	64,00

Com quarenta horas semanais de trabalho, todos os membros do grupo mostraram exercer atividade leve, uma vez tratar-se de alunos de pós-graduação, técnicos e auxiliar de laboratório, técnicos administrativos e agente de portaria.

Sete dos indivíduos relataram fazer uso moderado de bebida alcoólica, contudo o consumo de 28,5 mL de álcool ao dia, ou seja, o equivalente a duas latas de cerveja ou de dois cálices de vinho, diariamente, pode ser considerado normal, sem maiores danos à saúde (NRC, 1989b).

Embora a maioria dos voluntários (9) tenha mencionado a prática de exercício físico adicional (corrida, caminhada, yoga ou musculação), observa-se que em uma semana, o tempo destinado a esse tipo de atividade foi igual ou inferior a sessenta minutos/dia, não podendo, portanto, ser caracterizada como modalidade desportiva.

5.2 Perfil alimentar do grupo

As **Tabelas 2, 3 e 4** refletem o perfil alimentar dos componentes do grupo participante deste estudo.

5.2.1 Avaliação antropométrica

Dados da **Tabela 2** permitem informações acerca das medidas de peso, estatura, bem como da distribuição da massa corporal e taxa de metabolismo basal do grupo e de cada um dos indivíduos em particular.

Com média de peso de 68 kg e altura de 1,73 m, o grupo diferiu do padrão americano de 74kg e 1,77m (NRC, 1989a), utilizado como referência em vários países da América Latina, incluindo o Brasil. Todavia, as medidas encontradas retratam o perfil do homem brasileiro (1,63 a 1,70m) neste estágio de vida, conforme constatado em coletâneas de trabalhos realizados no Brasil (JAMES & SCHOFIELD, 1994). Segundo BAY (1979), valores de peso nesta faixa de estatura, podem variar entre 55 e 74kg.

Tabela 2 : Composição corporal e taxa de metabolismo basal dos indivíduos

Voluntário	P, Atual kg	Estatura m	IMC ^a Kg/m ²	Massa magra kg	%	Gordura corporal kg	%	Água corporal Kg	%	TMB ^(b) kcal/dia
1	74,5	1,7	24,6	61,7	82,8	12,8	17,2	43,9	58,9	1877,0
2	72,4	1,8	23,4	59,7	82,5	12,7	17,5	41,8	57,7	1816,0
3	72,9	1,8	23,0	60,0	82,3	12,8	17,6	41,0	56,3	1824,0
4	67,5	1,7	24,7	53,4	79,1	14,1	20,9	36,3	53,8	1623,0
5	62,1	1,7	21,2	52,9	85,2	9,1	14,7	35,9	57,9	1608,0
6	78,0	1,8	23,8	69,3	88,8	8,7	11,2	49,2	63,1	2106,0
7	66,1	1,7	22,6	58,2	88,0	7,8	11,8	40,5	61,4	1769,0
8	66,4	1,7	22,2	52,1	78,5	14,3	21,5	35,4	53,3	1583,0
9	65,4	1,7	22,4	52,8	80,7	12,6	19,3	36,4	55,6	1605,0
10	63,2	1,7	21,6	56,1	88,8	6,9	10,9	37,9	60,2	1707,0
11	67,5	1,7	23,1	56,1	83,1	11,4	16,9	39,1	57,9	1707,0
12	63,9	1,7	21,1	56,0	87,6	7,9	12,4	40,4	63,2	1704,0
Medidas Resumo										
Média	68,32	1,73	22,81	57,36	83,96	10,93	15,98	39,82	58,28	1744,08
Mediana	66,95	1,72	22,81	56,10	82,96	12,00	17,04	39,75	57,90	1707,00
DP	4,98	0,04	1,20	4,90	3,70	2,66	3,74	3,98	3,27	148,83
CV	7,29	2,21	5,25	8,53	4,41	24,39	23,42	9,99	5,62	8,53
Mínimo	62,10	1,66	21,14	52,10	78,46	6,90	10,93	35,40	53,30	1583,00
Máximo	78,00	1,81	24,68	69,30	88,85	14,30	21,54	49,20	63,20	2106,00

A= IMC = Índice de massa corporal = Peso atual(kg)/altura (m)²

B=TMB = Taxa de Metabolismo Basal, fornecido pelo software do aparelho "BIODYNAMIC"

Os resultados relativos ao Índice de Massa Corporal, apontam índices entre 21 e 25, valores compatíveis com os limites aceitáveis de 20 a 24,9, referenciados por GARROW (1981) e adotados pela ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, demonstrando ser satisfatória a relação peso/altura de todos os indivíduos avaliados.

Salienta-se ainda, na **Tabela 2**, o percentual de 17% de gordura corporal apresentado como mediana do grupo, situado dentro dos limites de normalidade, uma vez que este percentual pode variar de 15 a 21%, numa faixa de idade entre 19 e 45 anos (BYODINAMIC, 1995). Também são considerados normais, os percentuais de água na faixa de 50 a 60% em relação ao peso corporal total, conforme encontrados neste estudo $58 \pm 3\%$.

Os valores de taxa metabólica basal, com variações entre 1583 e 2108 kcal, vistos também na **Tabela 2**, foram fornecidos pelo software do equipamento de bioimpedância, tendo como base de dados, a idade e as medidas de peso e estatura, constantes nas colunas **2 e 4**.

5.2.2 Avaliação bioquímica e clínica

Considerando que alterações na absorção, utilização e excreção do zinco podem decorrer de estados patológicos, os valores contidos na **Tabela 3** mostram os resultados de análises bioquímicas em amostras de sangue total, determinadas tanto para avaliação do estado nutricional, quanto para assegurar o estado clínico do voluntários, antes de iniciada a pesquisa. Observados os valores de referência, nenhum dos participantes apresentou anemia, manifestações infecciosas ou parasitológicas, diabetes mellitus, comprometimento renal ou hepático, certificados os dois últimos, pelo nível de creatinina e uréia; transaminase alanina (ALT) e transaminase aspartato (AST), respectivamente. Tais condições foram atestadas por um médico clínico geral, pautadas na análise de sinais clínicos, da história de

Tabela 3 : Resultados de testes bioquímicos¹ de cada indivíduo.

Voluntário	Hemoglobina g/dL	Leucócitos /mm ³	Eosinófilos %	Mm ³	Glicemia mg/dL	Creatinina mg/dL	Uréia mg/dL	ALT/TGP2 U/L	AST/TGO3 U/L
1	14,4	7.000	2	140	87	1,3 *	45	14	19
2	12,9	5.500	1	55	90	1,1	29	10	14
3	15,4	9.500	1	95	100	1,1	39	24	13
4	14,8	6.600	1	66	87	0,9	33	28	27
5	14,7	8.900	6*	534*	82	1,1	31	10	9
6	15,9	7.700	2	154	87	1,2	25	16	21
7	14,8	11.400	4	456	83	1,0	27	10	11
8	13,8	7.800	5*	390	81	0,9	26	18	19
9	13,8	7.700	3	231	83	1,1	39	16	26
10	13,8	6.300	2	126	73	1,0	30	13	10
11	16,0	6.400	2	108	75	1,1	29	16	11
12	15,9	5.200	2	104	81	1,0	21	18	16
Medidas Resumo									
Média	14,55	7.500	2,00	175,00	84,08	1,05	31,17	16,08	16,33
Mediana	14,60	7.350	2,00	126,00	83,00	1,10	29,50	16,00	15,00
DP	1,00	1.770	0,94	132,14	7,04	0,09	6,83	5,53	6,11
CV	6,84	23,56	47,14	75,51	8,37	8,94	21,93	34,41	37,41
Mínimo	12,90	5.200	1,00	55,00	73,00	0,90	21,00	10,00	9,00
Máximo	15,90	11.400	4,00	456,00	100,00	1,20	45,00	28,00	27,00
Valores de referência	>11	5.000- 10.000	1-4	50- 400	70 - 100	0,7-1,2	15-45	7 - 32	10 - 35

1 Exames em amostras de sangue total, realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP

2 ALT/TGP-Alanina transaminase

3 AST/TGO- Aspartato transaminase

* ainda dentro da normalidade

enfermidades na família e dos exames bioquímicos apresentados por cada indivíduo. Valores ligeiramente elevados para leucócitos e eosinófilos com relação aos voluntários de número 5, 7 e 8, respectivamente, foram considerados clinicamente irrelevantes.

Uma vez que a biodisponibilidade de um nutriente pode ser afetada por fatores relacionados tanto à dieta, quanto ao indivíduo, estudos para avaliação do papel da dieta neste processo, devem ter o cuidado de padronizar, tanto quanto possível, variáveis ligadas ao hospedeiro (OMS, 1998; House, 1999). Neste trabalho, os resultados contidos nas **Tabelas 1, 2, e 3** demonstram a homogeneidade do grupo com relação às características de sexo, estágio de vida, nacionalidade, atividade, estatura, composição corporal e estado clínico. Tais variáveis foram controladas neste estudo, na tentativa de minimizar a interferência das mesmas na biodisponibilidade do zinco.

5.2.3 Inquérito Alimentar

Ainda que a análise de ingestão alimentar, isoladamente, seja insuficiente para avaliar o estado nutricional de um indivíduo, este indicador permite estimar o consumo inadequado de nutrientes quando comparado com as recomendações dietéticas, formuladas para fazer face às necessidades da maioria da população, valores estes, normalmente utilizados como padrão de referência (GIBSON, 1990).

A Tabela 4 mostra a composição química teórica da dieta habitual do grupo de indivíduos deste estudo, registrada por eles durante três dias.

Considerando o peso úmido das dietas, com a inclusão dos líquidos, a quantidade média de alimentos consumida por dia pelos voluntários foi de 2 060g, variando entre 1564 a 3386g. Os coeficientes de variação relativos aos nutrientes da dieta, teoricamente analisados indicam diferenças no consumo diário de nutrientes, tanto no que diz respeito ao indivíduo, quanto

ao grupo, verificando-se uma ingestão de zinco entre 5,73 a 13,26 mg, ferro de 11,93 a 20,91mg e cálcio de 225,08 a 811,97mg ao dia.

Tabela 4: Média da composição química da dieta habitual do grupo, analisada teoricamente, considerado o registro de três dias.

Variável	Medidas Resumo				CV
	Média (n=12)	Mínimo	Máximo	DP	
Peso úmido g	2059,77	1564,03	3339,97	527,10	26
Energia kcal	2515,12	1784,03	3386,17	463,58	18
Recomendação kcal	2808,95	2604,16	3183,08	156,16	6
Proteínas g	100,55	70,98	142,63	22,21	22
Carboidratos g	338,11	214,72	443,90	64,44	19
Lipídios g	84,78	59,46	117,73	21,12	25
Fibras g	23,89	12,55	39,59	7,57	32
Zinco mg	9,29	5,73	13,26	2,69	29
Ferro mg	16,52	11,93	20,61	2,73	17
Cálcio mg	498,45	225,08	811,97	225,56	45

DP = Desvio Padrão

CV = Coeficiente de Variação

Análise = Virtual Nutri (PHILIPPI *et al.*, 1996)

Dados por indivíduo: **Anexo M**

Resultados dos percentuais de energia e macronutrientes, decorrentes da avaliação da dieta habitual consumida pelos voluntários, são apresentados na **Figura 1**.

Figura 1 : Percentual de energia e de macronutrientes da dieta habitual de cada indivíduo, considerada a média do registro de três dias.

Verifica-se que a maioria dos indivíduos não alcançou os 100% de sua recomendação de energia. Para dois dos voluntários este percentual foi superado em 16 e 18%.

Quanto ao balanço dos macronutrientes foi observado um consumo de carboidratos inferior a 50% do valor de energia total da dieta para três dos indivíduos ou para seis deles, se levado em conta o mínimo recomendado de 55% (NRC, 1991). Entretanto, mesmo considerando que a recomendação de energia não foi atingida para a maioria dos voluntários, as dietas foram identificadas como hiperprotéicas e hiperlipídicas. Para oito dos doze voluntários, os percentuais energéticos oriundos da gordura

extrapolaram os limites preconizados (30%), enquanto que para proteínas, estes percentuais variaram entre 15 e 21%. Todavia, a quantidade de proteínas por quilo de peso não ultrapassou o dobro da RDA (1989a), ou seja, 1,6g/kg de peso, estimada como limite máximo para consumo diário desse nutriente, independente do estágio de vida (NRC, 1991).

No cômputo geral dos dados apresentados, se adotadas as faixas de 10 a 15% de proteínas, 20-30% de lipídios e valores superiores a 50% de glicídios para distribuição do valor energético total da dieta, conforme se recomenda para um indivíduo saudável (OMS, 1985; NRC, 1989a), apenas 4 voluntários (2, 5, 9 e 11) demonstraram consumir dieta balanceada.

Considerando os resultados apresentados na **Tabela 4** e **Figura 1**, verifica-se que a dieta habitual da maioria dos indivíduos avaliados mostrou-se fora dos parâmetros recomendados (NRC, 1989), com suprimento de energia insuficiente e distribuição inadequada entre os macronutrientes. O consumo de dieta nutricionalmente desequilibrada, parece se configurar como uma realidade brasileira, independente da classe social (INAN, 1997, FÁVARO *et al.*, 2000). Os resultados aqui encontrados confirmam as conclusões de trabalhos de inquéritos alimentares de âmbito nacional que relatam a tendência de aumento no consumo de proteínas e lipídios, em detrimento dos carboidratos (MONDINI & MONTEIRO, 1994, INAN, 1997; MONTEIRO *et al.*, 2000). Um consumo de proteínas acima de 0,75g por quilo de peso corporal/dia, bem como de dietas com 16% de proteínas e 31% de lipídios, também têm sido encontrados em subgrupos da população de nível sócio-econômico baixo e/ou médio, na Argentina (PORTELA & WEISSTAUB, 2000) e no México (ESTRADA & WYATT, 1995).

Dados fornecidos pelos questionários de frequência alimentar utilizados neste estudo, possibilitaram informações a respeito dos alimentos, igualmente aceitos e mais consumidos pelo grupo, em períodos semanal e mensal. Este conhecimento foi essencial para a elaboração dos cardápios e

preparo das dietas oferecidas. Positivamente, ficaram eliminados o temor de rejeição de alimentos ou preparações e a possibilidade de mudanças repentinas nos hábitos alimentares dos participantes, com possíveis repercussões negativas para o organismo e metabolismo do zinco. A descrição dos alimentos semanalmente consumidos, conforme **Anexo N**, confirma a presença dos vários grupos de alimentos na dieta. Dentre os alimentos mais frequentemente consumidos, constata-se no grupo dos energéticos: arroz, feijão, pão francês e de forma, macarrão, bolacha salgada, biscoito recheado e bolo. No grupo das frutas, legumes e hortaliças: laranja, banana, mamão, maçã, pêra, alface, tomate, couve, cenoura, batata inglesa, cebola e pimentão, sendo os dois últimos utilizados preferencialmente como tempero. Como representantes do grupo lácteo encontram-se : o leite, o queijo, além do iogurte e o achocolatado. Como gordura de adição na dieta, verifica-se o uso do óleo, margarina, manteiga e molho de maionese. Finalmente as carnes, sendo as de maior consumo a de frango e de boi. Apesar dos vários grupos de alimentos representados, a dieta habitual dos voluntários mostrou-se desequilibrada. Estes resultados corroboram os achados de outros estudos, quanto aos tipos de alimentos mais frequentemente consumidos pela população brasileira, mostrando que estes não diferem, substancialmente, entre os indivíduos (INAN, 1997; OLIVEIRA & THÉBAUD-MONY, 1998; MATTOS & MARTINS, 2000).

5.3 Planejamento e avaliação das dietas experimentais

A **Figura 2** apresenta os cardápios qualitativos oferecidos aos voluntários na semana do experimento, derivados dos hábitos alimentares do grupo. Foram servidas quatro refeições ao dia, incluindo um lanche para ser consumido no período da tarde, uma vez tratar-se do maior intervalo entre as refeições oferecidas. Todas as preparações foram aceitas, por unanimidade, pelo grupo.

Figura 2 - Cardápios qualitativos oferecidos aos voluntários na semana do experimento

	DESJEJUM	ALMOÇO	LANCHE	JANTAR
Cardápio 1	Laranja Pão francês Queijo, tipo Polengue Leite integral Café Açúcar refinado	Alface / tomate Batata frita Bife acebolado Arroz / Feijão Mamão/laranja/abacaxi Refresco de Maracujá	logurte Pão de forma com requeijão	Alface / cenoura ralada Macarronada simples Almondega acebolada Maçã Refresco de Caju
Cardápio 2	Mamão Pão francês Queijo, tipo Prato Leite integral Café Açúcar refinado	Alface / tomate Polenta frita Carne moída com ovo cozido Arroz / Feijão Pêra Refresco de Limão	Achocolatado Biscoito tipo Waffer	Beterraba /alface Vagem amanteigada Picadinho de carne Arroz /Feijão Doce de leite Refresco de Acerola
Cardápio 3	Banana Pão francês Margarina Presunto Leite integral Café Açúcar refinado	Pepino / tomate Couve refogada Carne de panela Arroz /Feijão Sorvete Refresco de Uva	logurte Bolacha salgada com geléia	Alface/ cenoura ralada Batata acebolada Filé de peixe e molho tomate Arroz Pudim de leite Refresco de Caju
Cardápio 4	Laranja Pão francês Mortadela Leite integral Café Açúcar refinado	Vagem / tomate Abobrinha refogada e f.milho Picadinho de carne Arroz /Feijão Maçã Refresco de Acerola	logurte Pão de forma com requeijão	Alface/ tomate Batata /ovocozido Stroganoff de frango Arroz Brigadeiro Refresco de Uva
Cardápio 5	Mamão Pão francês Requeijão cremoso Leite integral Café Açúcar refinado	Alface / tomate Batata sotê Filé de peixe frito Arroz /Feijão Pera Refresco de Maracujá	Achocolatado Bolo de fubá	Alface / tomate Berinjela refogada Bife à rolê Arroz /Feijão Pêssego / creme de leite Refresco de Caju
Cardápio 6	Banana Pão francês Queijo, tipo Prato Leite integral Café Açúcar refinado	Molho vinagrete Couve refogada Feijoada Arroz Farinha de mandioca Laranja Refresco de Limão	logurte Bolacha salgada com geléia	Alface c/ tomate Purê de batata Picadinho Arroz /Feijão Maçã Refresco de Acerola
Cardápio 7	Mexerica Pão francês Queijo, tipo Polengue Leite integral Café Açúcar refinado	Salada de maionese /alface Peito de frango à milanesa Macarrão ao molho de tomate Chocolate com côco Refresco de Caju	logurte Bolo de cenoura	Beterraba /alface Escarola refogada Almôndega acebolada Arroz /Feijão Pera Refresco de Uva
Cardápio 8	Laranja Pão francês Queijo tipo Polengue Leite integral Café Açúcar refinado	Alface / tomate Batata frita Bife acebolado Arroz / Feijão Mamão/laranja/abacaxi Refresco de Maracujá		

A **Tabela 5** por outro lado, mostra a composição energética e de macronutrientes, bem como os teores de fibras, zinco, cálcio e ferro das dietas, teoricamente planejadas para o período de sete dias, tendo em vista as necessidades em energia, proteínas, lipídios e carboidratos de cada voluntário, segundo recomendação da NRC, (1989a).

Tabela 5: Média da composição das dietas, teoricamente, planejadas para o período de sete dias do experimento, relativa ao grupo.

Variável	Medidas Resumo				
	Média (n=12)	Mínimo	Máximo	DP	CV
Peso úmido g	2585,97	2421,1	2878,2	123,74	5
Energia kcal	2827,76	2622,6	3195,4	156,10	6
Recomendação kcal	2808,95	2604,2	3183,1	156,16	6
Proteínas g	106,62	98,1	123,3	6,98	7
Carboidratos g	410,13	380,3	461	22,03	5
Lipídios g	88,38	82,7	98,8	4,36	5
Fibras g	32,62	28,7	39,5	2,94	9
Zinco mg	6,14	5,4	7,6	0,60	10
Ferro mg	15,35	13	21,2	2,13	14
Cálcio mg	389,60	355,3	478,2	32,15	8

DP = Desvio Padrão

CV = Coeficiente de Variação

Análise = Virtual Nutri (PHILIPPI *et al.*, 1996)

Dados por indivíduo: **Anexo O**

Observa-se entre as dietas, um peso total em torno de 2421g a 2878g, incluindo os líquidos, com média de 2586g. O valor energético encontrado para as mesmas, considerado o grupo, foi de 2828 kcal com limites para valores individuais entre 2623 e 3195 kcal. A distribuição da quantidade de energia total da dieta foi estimada em aproximadamente

15% para proteínas (98 a 123g), 27% para lipídios (83 a 99g) e 58% para carboidratos (380 a 461g).

No entanto, no que diz respeito às concentrações de minerais teoricamente calculadas, foi verificado valores abaixo do recomendado para zinco (EAR=9,4, RDA=11mg/dia) e cálcio (AI=1000mg/dia) e superiores em relação ao ferro (EAR=6mg/dia, RDA= 8mg/dia), segundo os valores atuais de referência (FNB, 2001).

Na **Tabela 6** vista a seguir, é mostrada a composição média das dietas efetivamente consumidas pelos voluntários durante os sete dias do experimento, resultante de análises por métodos diretos, em laboratório.

Tabela 6: Média da composição química das dietas consumidas pelo grupo, no período de sete dias do experimento, analisadas por método direto, em laboratório.

Variável	Medidas Resumo				
	Média (n=12)	Mínimo	Máximo	DP	CV
Peso úmido g	2539,27	2372,19	2848,57	151,91	6
Umidade % ^a	76,47	75,75	76,98	0,44	1
Peso seco g	597,84	558,72	690,88	42,94	7
Cinzas g ^a	24,93	22,45	28,81	2,20	9
Energia kcal ^a	2668,58	2465,92	3103,60	198,54	7
Recomendação kcal	2808,95	2604,16	3183,08	156,16	6
Proteínas g ^a	109,85	98,36	126,55	9,61	9
Carboidratos g ^a	387,68	360,40	443,00	26,09	7
Extrato Etéreo g ^a	75,39	65,32	91,06	7,51	10
Fitato mg ^b	nd	nd	nd	nd	nd
Zinco mg ^c	11,62	9,70	14,20	1,55	13
Ferro mg ^c	10,65	7,5	13,4	1,47	14
Cálcio mg ^c	712,17	561,0	842,0	83,01	12

nd = não detectável <0,01

a = AOAC (1995); b = HPLC; c = Ativação de Nêutrons

DP = Desvio Padrão

CV = Coeficiente de Variação

Dados por indivíduo: **Anexo P**

Examinando os resultados obtidos das análises, chama a atenção o fato de que as quantidades dos isômeros IP5 e IP6 do fitato, acusados de apresentarem elevado potencial quelante para o zinco, com prejuízos à biodisponibilidade do mesmo, não foram detectáveis no *pool* das dietas de sete dias analisadas, a despeito de o método analítico empregado ser, atualmente, o melhor indicado. Este achado vai contra à idéia de que toda dieta baseada tipicamente em cereais e leguminosas, teria quantidade de fitato disponível, capaz de comprometer a absorção do zinco. Embora este trabalho não apresente dados suficientes para discussão sobre os efeitos do processamento culinário sobre o fitato, infere-se que o mesmo possa ter contribuído para os resultados encontrados, uma vez que pesquisas recentes têm demonstrado os benefícios do tratamento culinário na biodisponibilidade do zinco, em dietas onde o fitato se faz presente (HOTZ *et al.* 2001; GIBSON & HOTZ, 2001).

A **Figura 3** permite a comparação dos percentuais de energia e de macronutrientes, apresentados para dietas planejadas e aquelas, efetivamente consumidas pelos voluntários, analisadas por método teórico e direto, respectivamente.

Deve ser salientado que as dietas oferecidas foram planejadas com o limite máximo de 15% de proteínas em relação ao valor calórico total das mesmas, tendo em vista os percentuais para esse nutriente nas dietas habituais mostrarem-se elevados. Contudo, a quantidade de proteína por quilo de peso corporal, não ultrapassou o máximo permitido de duas vezes a RDA (1989a)(NRC, 1991). Na verdade, se considerado 0,8 g/kg de peso corporal conforme recomendado, o percentual de energia oriundo das proteínas seria de, no máximo, 8% para todos os voluntários, quando o mínimo preconizado é de 10%. Quando adotado esse critério para avaliação de consumo, tem sido verificado um superávit quantitativo para a ingestão desse nutriente. Neste caso, o superávit na ingestão protéica não poderia ser considerado como uma extravagância de hábito alimentar, mas sim como uma imposição fisiológica.

Mesmo tendo ocorrido, por parte de alguns voluntários, a devolução de sobras e o consumo extra de alguns alimentos, estas reduções ou acréscimos foram insuficientes para alterar o equilíbrio das dietas oferecidas, mantendo-se os valores para macronutrientes, dentro dos limites recomendados (NRC, 1991).

Figura 3: Percentuais de energia e de macronutrientes obtidos das dietas planejadas e consumidas, analisadas teoricamente e por métodos diretos, respectivamente.

Observando os resultados das análises das duplicatas das dietas consumidas, verifica-se valores muito próximos daqueles teoricamente planejados, embora menores percentuais para gordura e maiores para proteínas e glicídios possam ser identificados em relação às dietas calculadas. As diferenças entre as análises teórica e direta, podem representar o efeito de erros metodológicos, passíveis de terem ocorrido durante a coleta das duplicatas, por imprecisão das medidas padrão, desperdícios durante o processamento da amostra para as análises, e

mesmo, perdas decorrentes do próprio método analítico. No entanto, não devem ser descartadas ainda, a influência do processamento culinário e as deficiências de nossas tabelas de composição de alimentos. Resultados com valores menores para lipídios, também foram encontrados pela autora e colaboradores (Ribeiro *et al.*, 1995), quando da análise direta de refeições coletivas, em trabalho comparativo de tabelas de composição de alimentos. Discrepâncias entre a composição de dietas calculadas e analisadas foram igualmente observadas por ESTRADA & WYATT (1995) e MAFRA (2001). Tais desigualdades são plenamente justificáveis, uma vez tratar-se de análises de dietas processadas, posto que, nas tabelas de composição de alimentos, estes encontram-se analisados, na sua maioria, na forma crua.

Quanto aos minerais, a **Figura 4** permite a comparação das concentrações de zinco, ferro e cálcio encontradas nas dietas habitual, planejada e aquela consumida pelos voluntários.

Os resultados obtidos para as dietas habitual e planejada foram teoricamente calculados, a partir de um mesmo banco de dados. Verifica-se que a concentração de zinco na dieta habitual dos participantes mostrou-se superior à planejada. Uma explicação, seria a possibilidade de uma concentração maior de alimentos protéicos na dieta habitual, todavia a despeito desse tipo de alimento apresentar grande variabilidade nos seus teores de zinco (PEDROSA & COZZOLINO, 2001), o conteúdo de proteínas na dieta habitual não superou os valores planejados. Se observados os resultados do zinco obtidos por análise direta nas dietas consumidas (9,7 a 14,2 mg/d), constata-se concentrações quase que duplicadas, em relação às calculadas nas dietas planejadas, e mostram atender quantitativamente, as necessidades de um indivíduo adulto considerado saudável. Por outro lado, estes resultados permitem pressupor que o consumo de zinco, a partir da dieta habitual, pode ter sido subestimado.

Figura 4 : Comparação entre as concentrações) de zinco, ferro e cálcio nas dietas avaliadas .

Com relação ao ferro, observa-se concentrações na dieta planejada inferiores às apresentadas na dieta habitual, sugerindo um maior consumo de ferro proporcionado por esta última, porém quando diretamente analisadas, as dietas consumidas mostraram valores bem menores que os calculados. Apesar disso, as quantidades fornecidas superaram os valores da EAR = 6mg/d e da RDA = 8mg/d (FNB, 2001). Portanto, a proporção Fe:Zn de 2,5:1, considerada como prejudicial à biodisponibilidade do zinco, não foi verificada neste estudo.

Quanto ao cálcio, verifica-se que nenhuma das três dietas, ou seja, a habitual, a planejada e a consumida apresentaram quantidade suficiente desse elemento, capaz de satisfazer a atual recomendação de 1000 mg/dia, e indicada para indivíduos saudáveis entre 10 e 70 anos (FNB, 2001), certificando os comentários de GIBSON & FERGUNSON (1998) de que a

quantidade de cálcio presente em dietas de países não industrializados não seria suficiente para potencializar possíveis efeitos negativos, na biodisponibilidade do zinco.

Os dados apresentados também confirmam e evidenciam a fragilidade das tabelas de composição de alimentos, as quais são normalmente, utilizadas para avaliação de minerais em dietas brasileiras.

A refeição “marcada” , assim denominada por ter sido utilizada como veículo para a dose oral do traçador (^{67}Zn), teve sua composição química determinada por análise direta, demonstrada na **Tabela 7**.

Tabela 7 : Composição da refeição marcada, analisada por métodos diretos.

Variável			Média + DP	% do VET
Peso úmido		g	1012,65 ± 18,74	
Umidade ^a		%	77,84 ± 0,69	
Peso seco		g	224,2 ± 4,03	
Energia ^a		Kcal	956,5 ± 15,45	
Proteína ^a		g	42,52 ± 0,10	17
Extrato Etéreo ^a		g	20,14 ± 0,12	19
Cinzas g ^a		g	9,63 ± 0,77	
Carboidratos ^a		g	153,04 ± 3,95	64
Fibras	Solúveis	g	3,56 ± 0,12	
	Insolúveis	g	17,22 ± 0,12	
Fitato ^b	IP5	mg	20,14 ± 0,10	
	IP6	mg	42,52 ± 0,10	
Zinco ^c		mg	5,47 ± 0,34	
Ferro ^c		mg	6,01 ± 0,66	
Cálcio ^c		mg	129,62 ± 16,86	

a = AOAC (1995); b = HPLC; c = Ativação de Nêutrons
VET = Valor Energético Total da refeição.

Dos resultados encontrados merece destaque o conteúdo de fibras insolúveis, que embora digam respeito, exclusivamente, a uma refeição de almoço, permite inferir que o consumo de 25 a 35g de fibras por dia, recomendado por guias alimentares (LAUBER *et al.*, 2001), pode ser alcançado com uma dieta que contemple, diariamente, leguminosas, frutas e vegetais folhosos.

5.4 Avaliação do estado nutricional relativo ao zinco

Apesar de não existir, mundialmente, o reconhecimento de um critério bioquímico ou valor referencial indicativo da deficiência de zinco, as concentrações de zinco no plasma, eritrócitos e urina têm sido normalmente utilizadas para identificação do estado nutricional deste nutriente, em humanos.

A **Tabela 8** apresenta as concentrações de zinco no plasma, eritrócitos e urina dos indivíduos avaliados neste estudo, em três condições de ingestão dietética, bem como valores de referência considerados como normais para o homem, citados pela OMS (1998) ou por GIBSON (1990). Diferença estatística entre as três condições avaliadas, somente foi detectada para as concentrações de zinco no plasma em relação à T2 ($p < 0,05$).

Ainda na **Tabela 8** é possível constatar que na média, os resultados encontrados mostram-se de acordo com o mencionado na literatura internacional. Valores semelhantes para zinco no plasma (79 $\mu\text{g/dL}$), no eritrócito (40 $\mu\text{g/gHb}$) e na urina (367 $\mu\text{g/24 horas}$), com variações entre 58-110 $\mu\text{g/dL}$, 24-57 $\mu\text{g/gHb}$ e 69-1123 $\mu\text{g/24 horas}$ respectivamente, foram igualmente descritos por MAFRA (1999), referindo-se à avaliação realizada em indivíduos de um grupo *controle*, constituído por 19 voluntários, com mediana de 42 anos, eutróficos e saudáveis. Trabalho realizado com o intuito de formular valores de referência para a comunidade italiana, também

refere faixas de variabilidade de 58,7 a 121,52µg/dL para zinco no plasma e de 266 a 846µg/24horas para zinco na urina (MINOIA *et al.*, 1990).

Tabela 8 : Concentrações de zinco no plasma, eritrócitos e urina de cada voluntário, antes (T0) e após consumo de dietas planejadas durante sete dias (T1) e uma semana após retorno à dieta habitual (T2).

Voluntário	Concentrações de zinco								
	Plasma			Eritrócito			Urina		
	µg/dL			µg/gHb			µg/ 24horas		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
1	80	80	73	32	44	38	414	484	435
2	57	75	59	44	43	45	230	110	216
3	89	93	68	35	35	38	1016	795	971
4	99	95	64	43	39	33	319	303	262
5	58	72	59	43	45	48	209	110	403
6	79	88	54	43	37	43	389	519	397
7	84	70	70	31	34	36	258	279	336
8	60	70	63	39	42	48	552	541	495
9	84	64	73	47	54	45	130	72	371
10	101	74	81	39	40	52	683	426	515
11	79	65	62	37	32	37	297	544	321
12	62	63	60	41	45	45	182	221	185
Média	78	76	66	40	41	42	380	367	409
DP	15	11	7	5	6	6	242	212	196
Mediana	80	73	64	40	41	44	308	365	384
Mínimo	57	63	54	31	32	33	130	72	185
Máximo	101	95	81	47	54	52	1016	795	971
Referência	80 – 110 ¹			42,2 ± 5,6 ²			300 – 600 ³		

T0 = Nível basal

T1 = Após sete dias de consumo de dieta planejada

T2 = Após sete dias de retorno à dieta habitual

¹ OMS (1998); ² e ³ GIBSON (1990)

O conhecimento acumulado com respeito ao metabolismo do zinco, indica que o conteúdo desse nutriente no organismo é mantido às custas de ajustes homeostáticos, controlados por uma relação inversa entre absorção e excreção endógena, com variações mínimas no plasma ou na excreção urinária, mesmo sob uma ampla faixa de variação dietética (KING *et al.*, 2000; HAMBIDGE, 2000; FBN, 2001).

Os gráficos constantes nas **Figuras 5, 6 e 7** indicam o perfil médio das concentrações de zinco no plasma, eritrócitos e urina dos voluntários deste estudo, nos tempos avaliados.

Figura 5 : Perfil médio das concentrações de zinco no plasma dos indivíduos, antes (T0), depois do consumo de dietas planejadas durante sete dias (T1) e uma semana após retorno à dieta habitual (T2)

Na média, conforme demonstra a **Figura 5**, nota-se uma ligeira redução no nível do zinco plasmático depois do consumo da dieta equilibrada, mantendo-se a tendência decrescente, quando do retorno à dieta habitual.

Investigações sobre o efeito da ingestão alimentar na mudança das concentrações de zinco no plasma mostram que o padrão dietético pode induzir a redução do zinco plasmático, em cerca de 11 a 19%. Este declínio seria consequência da captação do zinco pelo fígado e pâncreas com a finalidade de fazer face à síntese de enzimas, imprescindíveis nos processos de digestão e metabolismo da própria dieta (WALLOCK *et al.*, 1993; KING *et al.*, 1994). No entanto JOHNSON *et al.* (1993) e MILLER *et al.* (1994),

relatam que o zinco no plasma pode ser reduzido temporariamente, quando imposta a restrição desse nutriente na dieta. De acordo com LOWE *et al.* (1998), mudança na concentração plasmática de zinco pode também refletir uma redistribuição desse nutriente nos tecidos, com vista à manutenção das funções normais do organismo. Os gráficos que se seguem permitem esta avaliação.

Figura 6: Perfil médio das concentrações de zinco nos eritrócitos dos indivíduos, antes (T0), depois do consumo de dietas planejadas durante sete dias (T1) e uma semana após retorno à dieta habitual (T2).

Ainda considerando os valores médios, um comportamento inverso ao do zinco no plasma foi observado para a concentração desse elemento nos eritrócitos, conforme demonstra a **Figura 6**. Apesar de apenas uma semana de consumo da dieta equilibrada, o zinco nos eritrócitos mostrou tendência de aumento e contínua elevação durante o período T2, sugerindo um processo ainda em andamento.

Por outro lado, na **Figura 7** é demonstrada uma redução na excreção urinária do zinco na condição T1, indicando uma maior retenção desse nutriente pelo organismo, justificado pelo aumento do zinco nos eritrócitos.

Figura 7: Perfil médio das concentrações de zinco na urina dos indivíduos, antes (T0), depois do consumo de dietas planejadas durante sete dias (T1) e uma semana após retorno à dieta habitual (T2).

Na **Figura 7** é possível atentar para a tendência de retorno do zinco urinário ao nível inicial após a condição de avaliação T1 o que poderia ser explicada por três hipóteses: um provável efeito de adaptação metabólica à dieta, reflexo do retorno à dieta habitual ou ainda, o retorno às condições fisiológicas naturais do organismo.

As **Figuras 8, 9 e 10** descrevem o perfil das concentrações de zinco nas amostras biológicas de cada indivíduo em resposta às condições de consumo dietético avaliadas. Os traços gráficos enfatizam a diversidade de comportamento do zinco, tanto no plasma, quanto nos eritrócitos e urina quando comparados os resultados individualmente. Nitidamente é possível serem identificadas situações bastante heterogêneas, razão pela qual estes parâmetros, embora amplamente utilizados, são considerados pouco sensíveis para prever o estado nutricional do indivíduo.

Figura 8 : Perfis individuais das concentrações de zinco no plasma dos indivíduos, antes (T0), depois do consumo de dietas planejadas durante sete dias (T1) e uma semana após retorno à dieta habitual (T2).

Na **Figura 8** verifica-se valores crescentes das concentrações de zinco no plasma para cinco dos voluntários, sugerindo terem sido favorecidos pela condição T1, uma vez que na condição basal, quatro destes voluntários apresentavam valores inferiores a 70 µg/dL, considerado por GIBSON (1990), um ponto de corte para a identificação de risco de deficiência nutricional relativo ao zinco, em humanos. No entanto, um declínio do zinco no plasma, também pode ser observado para cinco outros voluntários, dois deles inclusive, abaixo do patamar de 70 µg/dL.

A rápida mudança na concentração de zinco no plasma num curto espaço de tempo, apresentada pela maioria dos indivíduos, levando inclusive a valores abaixo daquele considerado crítico, parece uma demonstração de busca e capacidade adaptativa do organismo, o que justifica a dificuldade de serem avaliadas situações sub-clínicas de deficiência de zinco. Ao contrário do que foi observado neste estudo, PINNA *et al.* (2001), relatam em seu trabalho que a concentração de zinco no

plasma foi mantida com uma ingestão de zinco de 4,6mg/dia, por dez semanas e concluíram não existir relação entre a quantidade de zinco no plasma e a ingestão dietética.

Estes dados permitem inferir que valores de concentração de zinco no plasma, podem ser insuficientes para concluir, com segurança, sobre o estado nutricional relativo ao zinco, de indivíduos e ou populações.

Considerando que a ingestão de zinco da dieta habitual possa ter sido subestimada por consequência de sua análise teórica, é lícito pensar que a dieta oferecida foi a causa da redução do zinco plasmático de alguns voluntários. Diante desta hipótese, os resultados de zinco no plasma avaliados na condição T1 sugerem que uma dieta balanceada, apenas em energia e macronutrientes, pode não evitar o risco de deficiência de zinco, quando considerado o ponto de corte (70 ug /dL) proposto por GIBSON (1990).

Figura 9 : Perfis individual concentrações de zinco nos eritrócitos dos indivíduos, antes (T0), depois do consumo de dietas planejadas durante sete dias (T1) e uma semana após retorno á dieta habitual (T2).

Conforme identifica-se na **Figura 9**, embora o aumento do zinco nos eritrócitos possa ser visto como uma tendência para a maioria dos indivíduos na condição T1, esse comportamento não se mostrou uniforme, sendo que três dos indivíduos tiveram a concentração de zinco reduzida nos eritrócitos, se comparados os valores nas condições T0 e T1.

Figura 10 : Perfis individuais das concentrações de zinco na urina dos indivíduos, antes (T0), depois do consumo de dietas planejadas durante sete dias (T1) e uma semana após retorno à dieta habitual (T2).

Quanto ao comportamento das concentrações do zinco urinário, mostradas na **Figura 10**, observa-se que sob a condição T1, 4 dos voluntários praticamente mantiveram os níveis iniciais de excreção urinária. Em contra partida, 3 dos voluntários apresentaram níveis aumentados e os demais uma nítida redução. Nota-se ainda, indivíduos com valores abaixo do limite mínimo de $300 \mu\text{g}/24\text{horas}$, embora a literatura considere como constante a excreção urinária de zinco na faixa entre 300 e $600 \mu\text{g}/24\text{horas}$. SANDSTROM (1997), comenta que as perdas de zinco urinário contribuem para a manutenção homeostática. Mudanças na excreção de zinco seriam

constatadas apenas, quando diante de um consumo dietético de zinco abaixo de 4,5mg/dia ou acima de 25mg/dia (FNB, 2001). No entanto as concentrações de zinco consumidas a partir das dietas equilibradas, mostraram-se compatíveis com os padrões de consumo recomendados para zinco, indicadas para adultos do sexo masculino considerados saudáveis (FNB, 2001).

Quando comparados os valores de energia e nutrientes da dieta consumida com as variações de zinco no plasma, eritrócitos e urina, não foram verificadas correlações.

Considerando os padrões de referência (OMS, 1998; GIBSON, 1990), a **Figura 11** permite avaliar as conseqüências da dieta equilibrada para o conjunto dos indivíduos, apresentando a distribuição dos mesmos em relação às concentrações de zinco no plasma, eritrócitos e urina, nas três condições de ingestão dietética.

Figura 11: Distribuição dos indivíduos em relação às concentrações de zinco no plasma, eritrócitos e urina, determinadas em três condições de ingestão dietética.

Analizando a **Figura 11** é possível verificar uma redução do percentual de indivíduos com nível plasmático $< 70 \mu\text{g/dL}$ na condição T1, sugerindo o benefício da dieta equilibrada. No entanto, em relação aos eritrócitos, o número de indivíduos apresentando valores de zinco abaixo de $37 \mu\text{g/gHb}$ permaneceu o mesmo em T1. Porém, como os eritrócitos são considerados um *pool de zinco* de troca mais lenta do que o plasma, os resultados vistos em T1 podem ter sido decorrentes da quantificação do zinco nos eritrócitos imediatamente após o consumo da dieta planejada. Os resultados em T2, mostrando aumentado no percentual de indivíduos com concentração de zinco eritrocitário entre 37 e $47 \mu\text{g/gHb}$, podem indicar, na verdade, a necessidade de um maior tempo para ser avaliada a concentração de zinco neste compartimento do organismo, tendo em vista a meia vida do eritrócito ser de 120 dias.

Com respeito às concentrações de zinco na urina, observa-se que uma quantidade maior de indivíduos tiveram suas excreções de zinco aumentadas, com mudanças para o patamar entre 300 e $600 \mu\text{g}/24\text{horas}$, considerado normal, sugerindo ter sido satisfeita a necessidade de zinco no organismo.

5.5 Biodisponibilidade do zinco na dieta

Ao que tudo indica, há duas razões para que um indivíduo considerado saudável possa apresentar deficiência de zinco: uma ingestão inadequada desse nutriente ou uma baixa biodisponibilidade do zinco na dieta.

Por definição o termo *biodisponibilidade* envolve tanto a absorção quanto a utilização de uma substância ou nutriente. No entanto o maior determinante da biodisponibilidade é, reconhecidamente, a proporção do nutriente absorvido no trato gastrointestinal, tendo em vista sua estreita relação com a dieta, principal veículo de suplemento de nutrientes para o organismo (FAIRWEATHER-TAIT, 1988; JACKSON, 1997; HOUSE, 1999).

Para resposta aos objetivos deste estudo, a biodisponibilidade do zinco foi expressa como a porcentagem do zinco oral consumido que foi absorvido, medido por meio do enriquecimento isotópico do zinco na urina, após a última refeição oferecida no experimento.

A classificação da dieta a partir dos resultados encontrados foi realizada segundo critérios adotados pela Organização Mundial da Saúde (1998), definidos conforme descrição abaixo:

Classificação da biodisponibilidade do zinco de dietas

Categoria da dieta	Biodisponibilidade	% de absorção
A	Alta	> 30 até 50
B	Moderada	15 – 30
C	Baixa	<15

Fonte: OMS, 1998

Tabela 9 mostra as doses intravenosa e oral administradas a cada voluntário, bem como os percentuais de absorção do zinco da refeição marcada e consumida no oitavo dia do experimento, cujo concentração de zinco foi de 5,5mg.

Tabela 9: Doses intravenosa e oral de zinco administradas a cada voluntário e percentuais de absorção de zinco da refeição marcada, após uma semana de consumo da dieta equilibrada.

Voluntário	Dose Intravenosa ⁷⁰ Zn mg	Dose Oral ⁶⁷ Zn mg	Zn na dieta mg	Absorção %
1	1,15734	3,03452	5,5	31
2	1,15188	3,00042	5,5	32
3	1,15536	3,00930	5,5	15
4	1,17846	2,98926	5,5	26
5	1,19256	3,00002	5,5	29
6	1,16850	2,98634	5,5	12
7	1,20048	2,99292	5,5	37
8	1,18848	3,00666	5,5	11
9	1,12956	3,01462	5,5	35
10	1,21926	2,98044	5,5	40
11	1,15716	2,98936	5,5	47
12	1,20384	2,99024	5,5	41

Conforme se verifica, os resultados das frações de zinco absorvidas da dieta, indicam apenas dois voluntários com percentuais de absorção abaixo de 15%, o que significa dizer que os valores de absorção desse nutriente para 83% dos indivíduos do grupo podem ser considerados satisfatórios, tendo em vista a classificação preconizada pela OMS. A média de absorção de zinco observada para o grupo foi de 30%, com variações entre 11 e 47%. No entanto, se considerados os valores apresentados por 80% do grupo, ou seja, 15 a 47%, essa média se eleva para 34%.

Os resultados encontrados neste estudo, mostram-se condizentes com as características das dietas experimentais, as quais são compatíveis com aquelas categorizadas como A e B, pela OMS(1998). Na categoria A, a dieta é constituída basicamente de pouca fibra proveniente de cereais, baixo conteúdo de ácido fítico (proporção molar fitato/zinco <5) e conteúdo

protéico adequado, principalmente de fontes não vegetais, tal como carnes e peixes. A dieta da categoria B, por sua vez, compreende uma dieta mista, contendo proteínas de origem animal (carnes ou peixe), moderada quantidade de cereais não refinado com inclusão de fonte de leite.

De acordo com os critérios definidos pela OMS (1998), a dieta brasileira, nas condições avaliadas neste estudo, pode ser incluída nas categorias entre A e B, ou seja, nas faixas de biodisponibilidade de zinco moderada e alta, demonstrando que os alimentos típicos e de consumo nacional no Brasil, apresentam potencial de biodisponibilidade de zinco considerável e similar àquele de países desenvolvidos.

A grande variabilidade nos percentuais de absorção observada entre os indivíduos deste estudo (15 a 47%), também tem sido constatada por outros autores (TURNLUND *et al.*, 1984; MASON *et al.*, 1990; FAIRWEATHER-TAIT, 1992a; COUZY *et al.*, 1993; TRAMONTE, 1994).

COUZY *et al.* (1993), ao avaliar jovens do sexo masculino com características semelhantes aos voluntários deste estudo, encontraram percentuais de absorção de 22,6 a 54,2% (média = 38,9%) e de 9,7 a 44,1% (média = 23,4%), para os grupos de indivíduos que consumiram dieta com alta e baixa biodisponibilidade de zinco, respectivamente.

TURLUND *et al.* (1994) em trabalho de avaliação da absorção do zinco de dieta básica, verificaram valores médios de absorção de 34%, com variações entre 21,9 e 51,3%, apesar de terem controlado a ingestão de nutrientes e as variáveis de sexo e idade dos voluntários. Infere-se portanto, que outros estudos ainda necessitam ser realizados para que os mecanismos homeostáticos do zinco, um nutriente com características tão particulares, possam ser esclarecidos.

Neste estudo não foram identificadas correlações positivas entre as concentrações de nutrientes na dieta consumida, os parâmetros de zinco avaliados no organismo e os valores de absorção de zinco apresentados.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Dos resultados apresentados, é possível concluir que:

- 1 – A biodisponibilidade do zinco em dieta brasileira, avaliada por meio da técnica com isótopos estáveis, encontra-se na faixa entre moderada e alta, segundo critérios da Organização Mundial da Saúde;
- 2 – O padrão usual da dieta brasileira não apresenta fatores considerados negativos para a biodisponibilidade do zinco, como altos teores de fitato, fibras e cálcio;
- 3 – A dieta habitual dos participantes deste estudo, deficiente em energia, embora com percentuais elevados de proteínas e lipídios, comprova o perfil de consumo alimentar apresentado pela população brasileira;
- 4 – O estado nutricional dos participantes desta pesquisa relativo ao zinco, pode ser considerado adequado;
- 5 – A dieta planejada, apesar da curta duração, modificou o padrão alimentar do grupo avaliado, com repercussões nos parâmetros bioquímicos dos indivíduos relativos ao zinco.

7 ANEXOS

Desenho metodológico do estudo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS
E NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL

FICHA DE CADASTRAMENTO

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Peso atual : _____ Altura: _____ Naturalidade: _____

Ocupação: _____ Horas/semana: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Tel: (____) _____

OUTRAS INFORMAÇÕES

1 - Fuma? _____

2 - Faz uso de bebidas alcoólicas? _____

Quando? _____

3- Faz uso de medicamentos? _____

Especifique: _____

4 - Faz uso de suplementos de vitaminas e minerais? _____

5 - Possui alguma enfermidade congênita ou não? _____

Qual (is): _____

6 - Possui distúrbios gastrointestinais? _____

Qual (is): _____

7- Pratica alguma atividade física? _____

Qual a frequência (vezes/semana)? _____

Quantas horas/dia? _____

São Paulo, ____/____/____

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Voluntário:

.....
Documento de Identidade Nº :.....Sexo: (X)M ()F...

Data de Nascimento:.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....

Cidade:.....

CEP :.....Telefone:.....

2. Responsável Legal:.....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....

Documento de Identidade Nº:.....Sexo: ()M ()F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....

Apto:.....Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....Tel:.....

.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título da Pesquisa: "Avaliação da biodisponibilidade de zinco em uma dieta adequada em energia e macronutrientes preparada com alimentos popularmente consumidos no Brasil".

2. Pesquisador: Marisilda de Almeida Ribeiro
Cargo/Função: : Doutoranda Inscrição Conselho Regional de Nutrição (6ª Região) Nº: 479
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco ()	Risco Mínimo (x)	Risco Médio ()
Risco Baixo ()	Risco Maior ()	

4. Duração da Pesquisa: 04 anos

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. Justificativa e objetivo do estudo

Desequilíbrio quantitativo e qualitativo de nutrientes na dieta, modificações químicas decorrentes de técnicas de processamento e estado nutricional do indivíduo, em relação ao zinco, podem interferir na biodisponibilidade deste mineral, contribuindo para sua deficiência orgânica. Este trabalho tem por objetivo avaliar a biodisponibilidade de zinco em uma dieta representativa da população brasileira, adequada em energia e macronutrientes.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos

Os voluntários da pesquisa serão submetidos à:

- exames laboratoriais: hemograma completo, glicemia, creatinina, TGP e TGO, e posterior avaliação clínica e física realizada por profissional médico, visando identificar anemia, infecções, Diabetes Mellitus, comprometimento renal ou hepático, assim como processos alérgicos, visando a inconveniência da pesquisa ao voluntário e/ou interferências nos resultados do trabalho;
- exames antropométricos com medidas de peso, altura e pregas cutâneas, com vista à avaliação do estado nutricional;
- registro de frequência alimentar e de todos os alimentos consumidos por três dias, para avaliação do perfil alimentar;
- Ingestão de dieta equilibrada em energia e macronutrientes, compreendendo 4 refeições, durante 7 dias consecutivos;
- Ingestão da dieta teste marcada com isótopo estável ^{67}Zn e aplicação intravenosa do ^{70}Zn , no oitavo dia do experimento;
- Três (3) colheitas de sangue venoso (20 mL por colheita), sendo uma no primeiro dia da dieta equilibrada, a outra antes da administração dos isótopos e a terceira no final do experimento, visando a determinação do estado de zinco no organismo;
- nove (9) colheitas de urina de 24 horas, sendo uma no primeiro dia da dieta equilibrada, a outra antes da administração dos isótopos e mais sete colheitas consecutivas, para avaliação da absorção do zinco da dieta.

3- Desconfortos e riscos esperados

- os isótopos estáveis apresentam-se naturalmente no organismo humano e têm sido utilizados como traçadores em trabalhos com gestantes e recém-nascidos, dado o nível de segurança da técnica, considerada de risco mínimo. Contudo, eventualmente, a pessoa pode sentir tontura e/ou fraqueza durante ou imediatamente após a colheita de sangue, podendo também eventualmente, ocorrer edema e/ou hematoma na região da punção.

4- Benefícios que poderão ser obtidos

- maior conhecimento sobre o consumo e biodisponibilidade do zinco em dietas mistas e balanceadas, preparadas com alimentos de consumo popular;
- utilização de técnicas para identificação e prevenção dos riscos de deficiência nutricional de zinco e de outros minerais traço.

5- Procedimentos alternativos que poderão ser vantajosos para o indivíduo

- Recebimento de refeições balanceadas por sete dias, além de avaliações clínica, antropométrica e do estado nutricional de zinco.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. a pesquisa será imediatamente suspensa se detectadas intercorrências clínicas e psicológicas que possam ser atribuídas à conduta da pesquisa ;
2. os colaboradores poderão desistir da pesquisa, em qualquer momento, se motivos superiores assim determinarem;
3. a identidade dos resultados obtidos em análises serão mantidos em absoluto sigilo, conforme preceitos;
4. será garantida aos voluntários e familiares, resposta a qualquer pergunta e esclarecimento de qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados ao estudo;
5. haverá disponibilidade de assistência no caso de complicações e danos, comprovadamente, atribuídos à pesquisa.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Marisilda de Almeida Ribeiro

Av. Prof. Lineu Prestes, 580- Bl. 14- Butantã - SP
CEP 05508-900 Fone: 3818 - 3625 - Laboratório de Minerais

Dr. Issao Yanaguizawa- CRM - 13.799

Praça Mário Batiston, 71- V. Bussocaba- Osasco-SP
CEP: 060018-120 Fone: 3682-3655

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Segundo Normas Técnicas destinadas a disciplinar a coleta, processamento e a transfusão de sangue total, componentes e derivados, em todo o território nacional (Port. 1.376/GM-19/11/93, DOU 229-02.12.93) são permitidas as coletas de até 30 ml de sangue para exames laboratoriais e a doação até o máximo de 500 mL, por doação ,com intervalo mínimo de 60 dias, para indivíduos com mais de 50 kg de peso.

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
Marisilda de Almeida Ribeiro
No. USP – 2 920 772

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa

Av. Prof. Lineu Prestes 589 - Bloco 13^a - Cidade Universitária
CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone (011) 818-3677 - Fax 818-5093

Assistência Acadêmica
Of. nº 05/99

São Paulo, 15 de março de 1999

Prezada Senhora

Pelo presente vimos comunicar que o Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, em reunião de 08/03/99, tomou ciência dos esclarecimentos encaminhados por Vossa Senhoria referente ao desenvolvimento do projeto: "Avaliação de biodisponibilidade do zinco em dieta adequada em energia e macronutrientes preparada com alimentos popularmente consumidos no Brasil", considerando os mesmos satisfatórios.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Silvia Storpilas
Coordenadora do CEP/FCF

Ilma. Sra.
Pós-Graduanda Marisilda de Almeida Ribeiro
FRA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Av. Pádua Lima Freire, 550 - B. 17
CEP: 05508-900 - Tel.: 818-3648 / 818-3666

Data: 7 / 1

Nº 7061 B

Paciente:

Médico:

EXAME HEMATOLOGICO

SÉRIE ERITROCITÁRIA			(ERITROGRAMA)		
Eritrócitos	mm ³		Vol. Corpuscular Média (VCM)	83	%
Hemoglobina	g/dl		Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)	32	%
Hematócrito	%		Conc. de Hemog. Corpusc. Média	34	%
SÉRIE PLAQUETÁRIA					
Plaquetas	mm ³		Met. Automatizado - Normal: 150.000 a 300.000/mm ³		
SÉRIE LEUCOCITÁRIA			(LEUCOGRAMA)		
Leucócitos		mm ³	V. Normal: 5.000 a 10.000 / mm ³		
Contagem Diferencial		%	mm ³	%	mm ³
Neutrófilos	Mielócit				
	Metamielócit				
	Banófilos		2-8		100-300
	Segmentados		50-62		2700-6200
	Eosinófilos		1-4		50-400
	Basófilos		0-1		0-100
	Linfócitos		22-33		1100-3300
	Monócitos		3-7		150-700
V.H.S. =		mm/h hora	Valor Normal: até		mm/h hora
Método: Wintrobe					
Reticulócitos		%	Valor Normal: de 0,5 a 1,5%		
Observações:					
Nada além de nota.					

Modelo 141

Resposta 200

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICASAv. Prof. Lineu Prestes 590 - B. 12 - São Paulo
CEP: 05508-900 - São Paulo - SP - 015-3850 / 015-3855

Data 31 / 8 / 2000

Nº 7061 B

Paciente:

Médico:

DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS NO SORO

DETERMINAÇÕES		RESULTADOS	VALORES DE REFERÊNCIA
1	Ácido Úrico	mg/dL	HOMENS 3,4 a 7,0 MULHERES 2,4 a 5,7
2	Bilirrubina direta	mg/dL	0,1 a 0,4
3	Bilirrubina indireta	mg/dL	0,1 a 0,5
4	Bilirrubina total	mg/dL	0,2 a 1,0
5	Calcio	mg/dL	ADULTOS 9,0 a 10,8
6	Cloreto	mEq/dL	95,0 a 105,0
7	Creatinina	mg/dL	HOMENS 0,7 a 1,3 MULHERES 0,5 a 1,0
8	Ferro	mcg/dL	HOMENS 39,0 a 158,0 MULHERES 37,0 a 145,0
9	Cap. Fosfat. Livre do Ferro	mcg/dL	HOMENS 200,0 a 300,0 MULHERES 150,0 a 250,0
10	Cap. Fosfat. Total do Ferro	mcg/dL	HOMENS 300,0 a 400,0 MULHERES 250,0 a 350,0
11	Fosforo	mg/dL	ADULTOS 2,7 a 5,8 CRIANÇAS 4,0 a 7,0
12	Glicose (jejum)	mg/dL	70,0 a 100,0
13	Hemoglobina glicosilada *	%	4,3 a 7,7
14	Magnésio	mg/dL	1,9 a 2,5
15	Mucoproteínas	mg/dL	TIFOSINA 2,5 a 4,5 MUCO 38,5 a 107,0
16	Potássio	mEq/dL	3,5 a 5,1
17	Sódio	mEq/dL	135,0 a 145,0
18	Ureia	mg/dL	15,0 a 45,0
* Determinação realizada no sangue total			
OBS:			

Responsável

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS - LAC-FCF-USP/SP
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 17 - Jd. Pirene - Cidade Universitária
CEP 05508-900 - São Paulo - SP Fonefax (011) 818-3666 / 818-3640
site: <http://www.usp.br/> e-mail: lacfcf@cfb.usp.br

Data: / /

n.º 7051 E

Paciente:

Médico:

ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO SORO

DETERMINAÇÕES		RESULTADOS	VALORES DE REFERÊNCIA	MÉTODOS
1	Aldolase (ALS)	U/L	até 9 U/L	Cinético (UV)
2	Amilase (AMS)	USC	50-160 USC	Shott-alco (fotométrico)
3	Cotilina esterase (CHS)	U/L	1200-3600 U/L	Cinético (UV)
4	Creatina quinase (CK)	U/L	mulher 10 a 70 U/L homem 10 a 50 U/L	Cinético (UV)
5	Lactato desidrogenase (LD)	U/L	120-240 U/L	Cinético (UV)
6	Fosfatase ácida total (ACP)	U/L	criança 7-8 a 21,2 U/L adulto 4-8 a 13,5 U/L	Colorimétrico (p-nitrofenil fosfato)
7	Fosfatase ácida prostática (ACP)	U/L	até 3,7 U/L	Colorimétrico (p-nitrofenil fosfato)
8	Fosfatase alcalina (ALP)	U/L	até 160 U/L	Cinético (p-nitrofenil fosfato)
9	Aspartato transaminase (AST/ASG)	U/L	mulher 7 a 21 U/L homem 7 a 24 U/L	Cinético (UV)
10	Alanina transaminase (ALT/TGP)	U/L	mulher 7 a 26 U/L homem 7 a 32 U/L	Cinético (UV)
11	Glutâmico transferase (Gama-GT)	U/L	mulher 4 a 18 U/L homem 5 a 28 U/L	Cinético (visível)
Obs.:				

Responsável

EXAME MÉDICO

Nome:			
D.N.:	Sexo:	Estado civil:	C.I.:
End.:		Bairro:	
Cidade:	CEP:

ANTECEDENTES PESSOAIS

	SIM	NAO
Faz uso de bebidas alcoólicas ?		
Já foi operado?		
Faz uso de drogas?		
Toma alguma medicação?		
Tem crises convulsivas?		
Tem bronquite?		
Tem problemas renais?		
Tem problemas gástricos?		
Tem diabetes?		
Tem problemas alérgicos?		

ANTECEDENTES FAMILIARES

Tem havido na família casos de: TUBERCULOSE, DIABETES, ASMA, CÂNCER, HIPERTENSÃO ARTERIAL, EPILEPSIA, ALCOOLISMO, DOENÇAS MENTAIS?

EXAME FÍSICO

Estado geral:	Peso:	Kg
Oícos:	Altura:	m
Devies:	Pulso:	
Orofaringe:	P.A.:	
Aparelho circulatório:		
Sistema ósseo-articular:		
Aparelho respiratório:		
Abdome:		

LABORATÓRIO

HEMOGRAMA: _____

GLUCEMIA: _____

UREIA: _____ CREATININA: _____

TGO: _____ TGP: _____

PARECER MÉDICO em: / / 2000.

APTO: SIM () NÃO ()

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E
NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL

AVALIAÇÃO DE CONSUMO E FREQUÊNCIA ALIMENTAR

Sua colaboração é muito importante, **leia atentamente** as instruções de como preencher este formulário.

1 A aplicação deste questionário tem por objetivo a coleta de informações sobre hábitos alimentares do participante da pesquisa.

2 Este questionário é composto de três etapas:

Etapa I - Utilizando a relação de alimentos e preparações apresentada, o entrevistado deverá assinalar os alimentos que não gosta, se gosta muito ou não muito, em que refeição costuma consumi-lo: café da manhã, almoço, jantar e/ou lanches, e quantas vezes na semana o consome.

Etapa II - O entrevistado deverá relacionar os alimentos que costuma consumir em cada refeição: desjejum, lanche, almoço, lanche, jantar e ceia, mencionando a quantidade e quantas vezes na semana são consumidos.

Etapa III - Utilizando a relação de alimentos e preparações apresentada, o entrevistado deverá assinalar de que forma que costuma consumi-los ou se não consome.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E
NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL**

Etapa I

Utilizando a relação de alimentos e preparações apresentada, assinale em cada linha, nas colunas correspondentes os alimentos que: 1 não gosta, 2 se gosta muito ou não muito, 3 em que refeição costuma consumi-lo : café da manhã, almoço, jantar e/ou lanches, 4 quantas vezes na semana o consome.

Lista de alimentos e preparações

Alimento (a)	Não Gosto	Gosto		Costumo comer no:				Quantas vezes na semana?
		muito	Não muito	Desjejum	Almoço	Jantar	Ceia	
Pão francês								
Pão de forma								
Pão Integral								
Pão doce								
Bolacha recheada								
Bolacha amanteigada								
Bolacha maizena								
Bolacha maria								
Bolacha waffer.								
Bol. Cream cracker,								
Bolacha água e sal								
Granola								
Flocos de milho matinal								
Farinha de milho								
Farinha de mandioca								
Arroz								
Macarrão								
Polenta								
Milho verde								
Batata inglesa								
Batata doce								
Mandioca								
Mandioquinha								
Cará								
Inhame								
Tortas								
Pizzas								
Salgados								

Alimento	Não Gosto	Gosto		Costumo comer no:				Quantas vezes na semana?
		muito	Não muito	Desjejum	Almoço	Jantar	Ceia	
Acelga								
Agrião								
Alface								
Cebola								
Escarola								
Pepino								
Pimentão								
Rabanete								
Repolho								
Salsa								
Tomate								
Cebolinha								
Coentro								
Berinjela								
Brócolos								
Couve								
Couve-flor								
Espinafre								
Jiló								
Maxixe,								
Mostarda em folha,								
Palmito								
Abobrinha								
Abóbora madura								
Beterraba								
Cenoura								
Chuchu								
Ervilha em vagem								
Nabo								
Quiabo								
Vagem								
Abacaxi								
Caju								
Carambola								
Goiaba								
Jaca								
Jambo								
Laranja								
Limão								
Melancia								
Melão								
Maracujá								
Morango								
Pêssego								
Pitanga								
Tangerina								
Cajá								
Ameixa vermelha								

Alimento	Não Gosto	Gosto		Costumo comer no:				Quantas vezes na semana?
		muito	Não muito	Desjejum	Almoço	Jantar	Ceia	
Pinha								
Mamão								
Manga								
Maçã								
Pêra								
Kiwi								
Banana prata								
Banana nanica								
Banana maçã								
Caqui								
Uva								
Ovo de galinha								
Ovo codorna								
Carne de Boi								
Frango								
Carne de porco								
Peixes								
Fígado								
Bucho								
Coração de galinha								
Camarão								
Carne de caranguejo								
Salsicha								
Lingüiça								
Presunto								
Mortadela								
Salame								
Fiambre								
Sardinha em lata								
Atum em lata								
Leite tipo B,								
Leite tipo C								
Leite em pó								
Leite desnatado.								
Natural								
Iogurte com frutas								
Coalhada								
Leite condensado								
Queijo prato								
Mussarela								
Parmeson								
Requeijão								
Tipo minas								

Alimento	Não Gosto	Gosto		Costumo comer no:				Quantas vezes na semana?
		muito	Não muito	Desjejum	Almoço	Jantar	Ceia	
Feijão preto								
F. branco								
F. carioquinha								
Feijão fradinho								
Ervilha verde seca								
Lentilha								
grão de bico								
Óleo de soja								
Banha								
Margarina								
Manteiga								
Creme de leite								
molho de maionese								
Açúcar refinado								
Açúcar cristal								
Mel								
Glicose de milho								
Doces: de leite								
de abóbora								
de mamão								
De coco								
Paçoquinha								
pé de moleque								
Goiabada								
Marmelada								
Cravo								
Canela								
Pimenta do reino								
Colorau								
Mostarda								
Sal								
molhos preparados								
Carne moída								
Hambúrguer								
Feijoada								
Pirão de peixe								
Pirão de carne								
Achocolatado								
Bolo								
Sopa								
Pastel								

2.4- No lanche, entre o almoço e o jantar

Alimento ou preparação	Quantidade	Quantas vezes na semana	Observações

2.5- No jantar

Alimento ou preparação	Quantidade	Quantas vezes na semana	Observações

2.6- Na ceia

Alimento ou preparação	Quantidade	Quantas vezes na semana	Observações

Etapa III

Utilizando a relação de alimentos e preparações apresentada, assinale de que forma costuma consumi-los.

Arroz:	Outra preparação?	Batata inglesa:	Outra preparação?
Refogado _____	Quais? _____	Frita _____	Quais? _____
C/legumes _____	_____	Purê _____	_____
Risoto _____	_____	Cozida _____	_____
Canja _____			
Macarrão:	Outra preparação?	Mandioca:	Outra preparação?
Macarronada _____	Quais? _____	Cozida _____	Quais? _____
Ao alho/óleo _____	_____	Frita _____	_____
C/ sardinha _____	_____	Purê _____	_____
C/atum _____	_____		_____
C/frango _____			
Sopa _____			
Escarola:	Outra preparação?	Repolho:	Outra preparação?
Salada crua _____	Quais? _____	Cru/Salada _____	Quais? _____
Refogada _____	_____	Refogado _____	_____
Sopa _____	_____	Sopa _____	_____
Cebola:	Outra preparação?	Berinjela:	Outra preparação?
Crua _____	Quais? _____	Salada _____	Quais? _____
Frita _____	_____	Refogada _____	_____
Cozida _____	_____		_____
Couve:	Outra preparação?	Couve-flor:	Outra preparação?
'a mineira _____	Quais? _____	Salada _____	Quais? _____
sopa _____	_____	'a milaneza _____	_____
	_____		_____
Abobrinha:	Outra preparação?	Abóbora madura:	Outra preparação?
Salada _____	Quais? _____	Salada _____	Quais? _____
Refogada _____	_____	Refogada _____	_____
Sopa _____	_____	Sopa _____	_____

Beterraba:	Outra preparação?	Cenoura:	Outra preparação?
Crua/salada _____	Quais? _____	Crua _____	Quais? _____
Cozida _____	_____	Cozida/salada _____	_____
		Refogada _____	_____
		Sopa _____	_____
Chuchu:	Outra preparação?	Vagem:	Outra preparação?
Salada _____	Quais? _____	Salada _____	Quais? _____
Refogado _____	_____	Refogada _____	_____
Sopa _____	_____	Sopa _____	_____
Banana:	Outra preparação?	Carne moída:	Outra preparação?
Ao natural _____	Quais? _____	Bolinho _____	Quais? _____
Frita _____	_____	Almôndegas _____	_____
Doce/Torta _____	_____	Recheios _____	_____
Ovo de galinha:	Outra preparação?	Carne de boi:	Outra preparação?
Frito _____	Quais? _____	Bife simples _____	Quais? _____
Mexido _____	_____	Picadinho _____	_____
Cozido _____	_____	'A milaneza _____	_____
		rolê _____	_____
		Churrasco _____	_____
Frango:	Outra preparação?	Carne de porco:	Outra preparação?
Assado _____	Quais? _____	Frita _____	Quais? _____
Frito _____	_____	Assada _____	_____
Ensopado _____	_____	Na feijoada _____	_____
Peixe:	Outra preparação?	Fígado de boi:	Outra preparação?
Frito _____	Quais? _____	Iscas/frito _____	Quais? _____
Ensopado _____	_____	Bife/frito _____	_____
Bucho:	Outra preparação?	Coração de	Outra preparação?
C/feijão branco _____	Quais? _____	galinha:	Quais? _____
Ensopado _____	_____	Frito _____	_____
		Assado _____	_____
		Sopa _____	_____

Salsicha /molho C/pão _____ Macarrão _____ Arroz _____	Outra preparação? Quais? _____	Lingüiça: Frita _____ Na feijoada _____ Farofa _____	Outra preparação? Quais? _____
Sardinha em lata: _____ Salada _____ C/macarrão _____	Outra preparação? Quais? _____	Atum em lata: Salada _____ C/macarrão _____	Outra preparação? Quais? _____
Leite: Ao natural _____ C/ chocolate _____ Vitaminas _____	Outra preparação? Quais? _____	Lentilha: Salada _____ Ensopada _____ Sopa _____	Outra preparação? Quais? _____
Grão de bico: Salada _____ Ensopado _____ Sopa _____	Outra preparação? Quais? _____	Creme de leite: Sobremesa _____ Pratos salgados _____	Outra preparação? Quais? _____
Pizza: Sabores? Quais? _____ _____		Pastel: Sabores? Quais? _____ _____	
Bolo: Sabores? Quais? _____ _____		Suco ou refresco de frutas: Sabores? Quais? _____ _____	

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E
NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL**

AVALIAÇÃO DO PERFIL ALIMENTAR - DIÁRIO ALIMENTAR

INSTRUÇÕES DE COMO PREENCHER O FORMULÁRIO ANEXO

LEIA ATENTAMENTE FRENTE E VERSO DESTA FOLHA,

1 - O Diário Alimentar tem por objetivo, fornecer informações sobre hábitos alimentares do participante da pesquisa bem como, seu consumo de alimentos qualitativo e quantitativo;

2 - O DIÁRIO ALIMENTAR será preenchido durante 3 dias da semana, sendo 2 dias durante a semana (2ª e 3ª feira) e 1 dia no fim de semana (sábado ou domingo, a critério do participante da pesquisa);

3 - Para **evitar esquecimentos**, durante os 3 dias, o registro dos alimentos qualitativo e quantitativo deverá ser feito imediatamente ou logo após seu consumo;

4 - Na coluna **HORA**, será anotada a **hora exata** do consumo, seja desjejum, almoço, jantar ou lanches (chocolate, sorvete, pipocas etc..);

5 - Na coluna **ALIMENTOS** será anotado o tipo de alimento ou preparação consumida. Exemplo:

Anotação correta	Anotação errada
leite desnatado	leite
suco de laranja natural c/ açúcar	suco
filé de peixe ensopado c/ batata inglesa	peixe ensopado
peixe em posta frito	peixe frito
batata doce amanteigada	batata doce
sopa de feijão c/macarrão, cenoura e batata	sopa de feijão
salada de maionese c/ batata, cenoura e vagem	maionese

6 - Na coluna QUANTIDADE e SOBRAS, o registro deverá ser feito em medidas caseiras. Exemplos: colher de chá; colher de sobremesa; colher de sopa; concha; copo americano; copo de requeijão; xícara de café; xícara de chá.

No caso de alimentos ou preparações que não possibilitam o uso destes utensílios, usar o termo unidade ou porção e o tamanho destas, se pequena, média ou grande. Exemplo: uma unidade pequena, uma porção grande, etc..

7 - Exemplo de preenchimento correto

HORA	ALIMENTO	QUANTIDADE	SOBRAS
7 :00	Suco de laranja ao natural c/ açúcar	1 copo cheio	1/2 copo
	Pão francês	1 unidade pequena	-----
	manteiga	1 colher de chá	-----
	Leite com café	1 xícara de chá	-----
12:00	Salada de alface c/ tomate	2 folhas	-----
	Bife na chapa	1 porção média	-----
	Arroz refogado	3 colheres de sopa	-----
	Feijão simples	1 concha pequena	-----
	goiabada	1 porção pequena	-----
15 :00	Sorvete de morango	2 bolas	-----
18 :00	Canja de galinha c/ mandioquinha e cenoura	2 conchas média	-----
	Bolinho de carne c/ molho de tomate	2 unidades pequenas c/ 1 colher de sopa de molho	-----
	Arroz refogado	3 colheres de sopa	1 colher sopa
	Suco de maracujá ao natural c/ açúcar	1/2 copo americano	-----
22:00	logurte de morango diet	1 unidade	-----

Dia: _____

Data: _____

[illegible]

Modelo 3000 kcal

	DESJEJUM	ALMOÇO	LANCHE	JANTAR
1	Laranja -150	Alface c/ tomate -30/70g	iogurte	Alface/ Cen. ralada -30/50g
	Pão -1 unid	Batata frita - 60g	200 mL	Macarronada 280/100g
	Requeijão 20g	Bife acebolado - 110g	+	Almondegas aceboladas-110g
	Leite -150 mL	Arroz - 230g	Pão- 2fat	Maçã- 1 unid.
	Café - 50 mL	Feijão - 200g	Req. Colh.sb	Refr. Caju.- 200 mL 50/20g
	Açúcar - 15 g	Mamão/laranja/abacaxi 50/50/50g		
		Refr. Maracujá - 200 mL (50/20g)		
2	Mamão - 180g	Alface /tomate -30/70	iogurte	Beterraba /alface-60/30g
	Pão - 1 unid.	Polenta frita-80g	200mL	Vagem amanteigada- 60g
	Queijo prato - 30g	C. moída c/ ovo - 110g	+	Picadinho de carne -110g
	Leite -150 mL	Arroz -230g	C. Cracker - 4u	Arroz -230g
	Café- 50 mL	Feijão - 200g	Geléia-20g	Feijão- 200g
	Açúcar - 15 g	Pêra- 1 u 130g		Doce de leite- 40g
		Refr. limão - 200 mL (50/20g)		Refr. Acer. 200mL 50/20g
3	Banana - 80g	Pepino / tomate - 40/70g	Achocolatado	Alface/ Cen. ralada -30/50g
	Pão - 1 unid.	Couve refogada-40g	200 mL	Batata acebolada-120/20g
	Margarina - 5g	Lombo de panela- 100g	+	F. peixe / m.tomate-120/50g
	Presunto- 25g	Arroz -230g	Waffer-35	Arroz - 260g
	Leite -150 mL	Feijão - 200g		Pudim de leite. 90g
	Café - 50 mL	Sorvete - 1unid.		Refr. Caju 200mL 50/20g
	Açúcar - 15 g	Refr. Uva- 200 mL (50/20g)		
4	Laranja 150 mL	Vagem c/ tomate- 60/70g	iogurte	Alface/tomate- 30/70g
	Pão - 1 unid.	Abobr.refogada/f.milho - 70g	200 mL	Batata/ovoco.- 120/25g
	Mortadela - 25g	Picadinho de carne -110g	+	Stroganoff de frango-150g
	Leite -150 mL	Arroz -230g	Pão- 2fat	Arroz - 260g
	Café - 50 mL	Feijão - 200g	Req. C sb	Brigadeiro -40g
	Açúcar - 15 g	Maçã - 1 unid/130g		Refr. Uva 200mL 50/20g
		Refr. Acerola 200 mL 50/20g		
5	Mamão - 180g	Alface c/ tomate - 30/70g	Achocolatado	Alface c/ tomate - 30/70g
	Pão - 1 unid.	Batata sotê - 120 g	200 mL	Berinjela refogada- 70g
	Requeijão - 30g	Filé de peixe frito - 120g	+	Bife à rolê - 110g
	Leite -150 mL	Arroz -230g	Bolo fubá	Arroz- 230g
	Café - 50 mL	Feijão - 200g	50g	Feijão-200g
	Açúcar - 15g	Pêra- 01 unid.- 150g		D. calda e C.de leite-120/28
		Refr. Maracujá - 200 mL 50/20g		Refr. Caju- 200mL 50/20g
6	Banana - 80g	M.vinagrete - Tom.ceb.- 40/20	iogurte/200mL	Alface c/ tomate-30/70g
	Pão - 1 unid.	Couve refogada- 40g	+	Purê de batata - 100g
	Queijo prato- 30 g	Feijoada - 210g	C.Cracker/4u	Picadinho- 100 g
	Leite -150 mL	Carnes - 110g	Geléia-20g	Arroz - 230g
	Café - 50 mL	Arroz- 210g		Feijão- 200g
	Açúcar - 15 g	Farinha de mandioca- 20g		Maçã - 1 unid. 130g
		Laranja - 150 g		Refr. Acerola- 200mL
7		Refr. limão - 200 mL 50/20g		
	Mexerica- 1 unid. (150g)	Sal.de maionese/alface- 140/15g	iogurte 200mL	Beterraba /alface -60/30g
	Pão - 1 unid.	Peito de Frango à milanesa 100g		Escarola refogada- 60g
	Requeijão- 20g	Mac. ao sumo - 280/200g	+	Almôndega acebolada-110g
	Leite -150 mL	Prestígio- 1 unid.	Bolo de	Arroz -230g
	Café - 50 mL	Refr. Caju 200mL 50/20g	Cenoura	Feijão - 200g
	Açúcar - 15 g		50g	Pêra - 1 unid/130g
				Refr.Uva- 200mL

Composição química teórica da dieta habitual de cada voluntário, em três dias de registro.

Voluntário	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Variável												
Peso úmido g	1608,10	1582,67	2165,13	2042,33	1854,74	1863,73	1564,03	2780,90	3339,97	1795,00	1890,29	2230,37
DP	360,72	128,90	198,25	262,72	478,16	202,47	345,47	602,67	1588,74	628,47	299,30	712,37
CV	22	8	9	13	26	11	22	22	48	35	16	32
Energia kcal	1784,03	2087,89	2690,60	2389,33	2081,66	2785,20	2104,68	3386,17	3046,28	2748,49	2345,46	2731,67
DP	141,10	467,91	548,79	511,56	701,49	407,96	212,33	459,22	949,20	916,31	360,22	857,59
CV	8	22	20	21	34	15	10	14	31	33	15	31
Recomendado	2963,44	2752,00	2873,44	2751,04	2604,16	3183,08	2714,32	2870,96	2620,22	2792,93	2825,40	2756,38
% de adequação	60	76	95	87	80	88	78	118	116	98	83	99
Proteínas g	93,44	80,48	114,35	119,20	80,30	93,79	70,98	142,63	108,54	130,03	85,76	87,07
DP	4,00	14,68	7,90	26,98	40,58	35,12	9,99	45,64	40,15	91,25	8,16	39,14
CV	4	18	7	23	51	37	14	32	37	70	10	45
% de adequação	21	15	17	20	15	13	13	17	14	19	15	13
Carboidratos	214,72	301,86	314,30	300,22	301,48	363,02	296,78	443,90	436,38	337,54	366,23	380,83
DP	14,32	35,43	25,24	59,91	101,24	29,15	38,55	35,60	169,23	94,46	98,18	113,86
CV	7	12	8	20	34	8	13	8	39	28	27	30
% de adequação	48	58	47	50	58	52	56	52	57	49	62	56
Lípidios g	59,47	64,98	112,71	82,36	67,73	104,22	73,35	117,73	75,46	102,61	59,46	97,30
DP	11,61	31,62	63,43	26,16	31,89	16,78	8,17	20,00	23,41	32,54	8,99	27,39
CV	19,52	48,66	56,27	31,77	47,08	16,10	11,14	16,99	31,02	31,71	15,12	28,15
% de adequação	30	28	38	31	29	34	31	31	22	34	23	32
Fibras	16,91	18,20	25,20	19,34	39,59	34,26	27,41	19,56	26,01	12,55	21,81	25,80
DP	4,32	3,44	5,63	7,01	39,87	42,12	23,58	3,02	16,36	5,73	1,30	15,17
CV	26	19	22	36	101	123	86	15	63	46	6	59
Zinco mg	8,50	9,46	13,26	10,05	7,53	7,89	5,97	6,56	11,73	13,10	5,73	11,67
DP	6,01	0,82	1,65	6,36	4,03	4,14	3,51	3,95	4,67	14,63	1,26	6,39
CV	71	9	12	63	53	52	59	60	40	112	22	55
Cálcio mg	225,08	240,75	277,55	289,25	425,33	624,66	738,89	811,97	745,64	767,95	445,57	388,74
DP	81,14	2,60	76,32	45,03	190,55	473,22	380,89	853,46	307,13	183,17	237,57	133,96
CV	36	1	27	16	45	76	52	105	41	24	53	34
Ferro mg	12,69	17,81	17,41	15,29	14,11	16,96	15,06	20,61	18,41	18,16	11,93	19,84
DP	5,78	0,81	1,38	3,41	4,02	5,05	3,17	2,48	12,49	13,99	2,08	6,98
CV	46	5	8	22	28	30	21	12	68	77	17	35

Análise pelo software "Virtual Nutri" (PHILIPPI et al. 1996)

Resultados da frequência de consumo alimentar semanal do Grupo

Alimento	Média Semanal de Consumo (vezes/semana)	Alimento	Média Semanal de Consumo (vezes/semana)	Alimento	Média Semanal de Consumo (vezes/semana)
Cereais		Leguminosas		B. Lácteas	
arroz	6	feijão	7	leite integral B	5
açúcar refinado	5	feijão preto	1	leite desnatado	4
pão de forma	4	Gorduras		leite integral C	3
bolacha água e sal	3	óleo de soja	6	iogurte com frutas	3
bol. Cream cracker	2	margarina	5	achocolatado	3
bolacha recheada	2	manteiga	4	leite em pó	1
macarrão	2	Doces		Queijos	
bolacha waffer	2	leite condensado	2	mussarula	3
bolacha maria	2	pé de moleque	2	tipo minas	2
farinha de mandiococa	2	creme de leite	1	queijo prato	2
pão integral	2	doces: de leite	1	parmeson	2
polenta	1	paçoquinha	1	requeijão	2
bolacha maizena	1	goiabada	1	Ovos	
farinha de milho	1	Hortalíças e legumes		ovo codoma	2
pão doce	1	alface	4	ovo de galinha	2
Carnes		tomate	4	Frutas	
carne de boi	3	cebola	4	laranja	4
frango	3	reponho	3	pêssego	3
carne de porco	2	pimentão	3	pêra	3
coração de galinha	2	espinafre	3	kiwi	3
linguiça	2	pepino	3	melancia	3
peixes	2	couve	3	tangerina	3
presunto	2	couve-flor	3	mamão	3
salame	2	escarola	2	melão	3
figado	2	acelga	2	maçã	3
mortadela	2	ervilha em vagem	2	carambola	3
salsicha	2	batata inglesa	2	abacaxi	2
sardinha em lata	2	salsa	2	ameixa vermelha	2
atum em lata	1	berinjela	2	banana nanina	2
camarão	1	cenoura	2	banana prata	2
Preparações		agrião	2	caqui	2
salgados	4	cebolinha	2	goiaba	2
sopa	4	chuchu	2	manga	2
molhos preparados	3	abobrinha	1	morango	2
lasanha	2	brócolos	1	banana maçã	2
salada c/ maionese	2	abóbora madura	1	uva	2
macarronada	1	beterraba	1	Sucos	
pastel	1	quiabo	1	maracujá	3
carne moída	1	coentro	1	limão	3
bolo	1	vagem	1	carambola	3
tortas	1	mandioca	1	pitanga	3
pizzas	1	manidoquinha	1	acerola	2
feijoada	1	Outros		caju	2
hambúrguer	1	azeitona	2		
pirão de peixe	1	palmito	2		
		milho verde	1		

Composição média das dietas teóricamente planejadas, para cada voluntário, para um período de sete dias.

Voluntário	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Variável												
Peso úmido g	2713,66	2535,80	2637,66	2533,23	2421,09	2878,23	2522,23	2645,80	2442,80	2566,44	2601,44	2533,23
DP	114,02	114,38	119,03	114,45	108,46	115,05	110,17	120,87	87,75	117,01	119,84	114,45
CV	4	5	5	5	4	4	4	5	4	5	5	5
Energia kcal	2987,49	2764,56	2897,18	2765,52	2622,61	3195,44	2741,78	2905,46	2642,60	2803,70	2842,71	2764,03
DP	62,11	58,54	60,97	57,69	59,18	46,17	60,40	57,45	46,59	60,09	60,91	58,35
CV	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2
Recomendado	2963,44	2752,00	2873,44	2751,04	2604,16	3183,08	2714,32	2870,96	2620,22	2792,93	2825,40	2756,38
% de adequação	101	100	101	101	101	100	101	101	101	100	101	100
Proteínas g	113,68	103,80	110,13	103,83	98,07	123,29	103,34	110,30	98,12	104,95	106,09	103,79
DP	3,86	3,94	3,86	4,03	3,59	5,12	4,06	3,85	4,23	3,95	3,86	4,01
CV	3	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4
% de adequação	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Carboidratos	433,40	401,09	419,27	401,37	380,31	460,98	397,11	420,96	384,00	407,72	414,37	400,97
DP	16,51	16,19	17,56	15,69	14,98	15,66	15,69	16,99	12,02	16,70	16,95	16,16
CV	4	4	4	4	4	3	4	4	3	4	4	4
% de adequação	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58
Lípidos g	92,62	86,67	90,46	86,64	82,74	98,84	86,15	90,60	83,26	87,52	88,35	86,67
DP	4,67	4,55	4,48	4,54	4,25	5,19	4,69	4,39	4,24	4,42	4,35	4,54
CV	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
% de adequação	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
Fibras	35,69	31,40	33,81	31,34	28,70	39,52	31,06	33,95	29,21	32,22	33,14	31,36
DP	7,67	7,00	7,42	7,02	6,53	7,74	6,90	7,34	6,18	7,25	7,46	7,01
CV	21	22	22	22	23	20	22	22	21	23	23	22
Zinco mg	6,75	5,88	6,40	5,88	5,37	7,59	5,83	6,43	5,46	6,04	6,21	5,87
DP	2,17	1,93	2,11	1,93	1,83	2,33	1,88	2,11	1,78	1,97	2,00	1,92
CV	32	33	33	33	34	31	32	33	33	33	32	33
Ferro mg	14,90	13,84	14,71	13,84	13,03	21,16	13,75	14,71	15,56	16,32	16,54	15,84
DP	6,05	5,21	5,75	5,21	4,68	3,23	5,14	5,75	2,81	3,38	3,73	3,53
CV	41	38	39	38	36	15	37	39	18	21	23	22
Cálcio mg	388,59	367,63	379,89	365,25	355,33	478,23	367,91	379,89	394,78	403,27	408,90	385,58
DP	115,84	109,51	112,36	111,40	105,99	146,61	105,67	112,36	136,98	143,79	144,63	148,36
CV	30	30	30	30	30	31	29	30	35	36	35	38

Análise pelo software "Virtual Nutri" (PHILIPPI et al. 1996)

**Composição média de dietas consumidas por cada voluntário, no período de sete dias, analisadas
por método direto em laboratório**

Voluntário	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Variável												
Peso úmido g	2748,56	2536,34	2629,27	2409,01	2377,13	2848,57	2459,06	2643,59	2409,07	2372,19	2523,36	2515,06
Umidade %^a	76,00	76,76	76,64	76,71	76,50	75,75	76,64	75,98	76,61	75,93	76,98	77,11
DP	0,03	0,06	0,04	0,26	0,46	0,01	0,17	0,18	0,03	0,07	0,06	0,15
CV	0,0	0,1	0,1	0,3	0,6	0,0	0,2	0,2	0,0	0,1	0,1	0,2
Peso seco g	659,54	589,55	614,09	561,07	558,72	690,88	574,47	634,89	563,49	571,01	580,78	575,63
Cinzas g^a	28,68	25,59	26,25	23,90	23,89	28,81	24,61	26,19	23,00	23,02	22,77	22,45
DP	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,01	0,01	0,07	0,01	0,01	0,01	0,12
CV	0,5	0,9	0,5	0,7	0,7	0,3	0,1	1,8	0,1	0,2	0,3	3,2
Energia kcal^a	2937,08	2615,02	2716,19	2503,09	2465,92	3103,60	2552,11	2867,33	2521,25	2572,40	2600,42	2568,59
Recomendado	2963,44	2752,00	2873,44	2751,04	2604,16	3183,08	2714,32	2870,96	2620,22	2792,93	2825,40	2756,38
% de adequação	99	95	95	91	95	98	94	100	96	92	92	93
Proteínas g^a	126,55	113,61	117,07	105,88	105,47	128,01	104,06	108,34	100,33	106,83	103,70	98,36
DP	0,04	0,11	0,15	0,17	0,60	0,18	0,14	0,09	0,32	0,32	0,09	0,09
CV	0,3	0,6	0,9	1,0	3,6	1,1	0,9	0,6	2,0	2,0	0,5	0,5
% de adequação	17	17	16	15	16	16	16	15	16	17	16	15
Carboidratos (g)^a	421,58	378,52	397,80	360,40	364,05	443,00	375,27	413,85	368,30	365,08	380,64	383,65
% de adequação	57	55	55	52	56	57	59	58	58	57	59	60
Extrato Etéreo (g)^a	82,73	71,84	72,97	70,88	65,32	91,06	70,53	86,51	71,86	76,09	73,67	71,17
DP	0,09	0,18	0,35	0,56	0,90	0,43	0,55	0,28	0,35	1,40	0,22	0,96
CV	0,8	1,7	3,4	5,2	8,8	3,7	5,2	2,3	3,0	12,4	1,9	7,8
% de adequação	25	23	23	23	23	26	25	27	26	27	25	25
Fítato(mg)^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Zinco mg^c	14,20	13,10	12,60	11,20	10,70	13,00	13,50	10,40	9,70	10,30	10,60	10,10
DP	0,1	0,1	0,1	0,5	0,3	0,7	0,6	0,3	0,3	0,2	0,3	0,7
Ferro mg^c	11,7	10,6	10,4	7,5	9	13,4	10,8	11,1	11,8	10,5	9,9	11,1
DP	0,9	0,5	0,2	0,5	1,5	0,7	0,5	1,0	1,0	1,0	0,6	0,6
Cálcio mg^c	770,0	735,0	582,0	561,0	692,0	842,0	691,0	742,0	818,0	689,0	742,0	682,0

nd = não detectável <0,01

a AOAC (1995) ; b HPLC; c Ativação de Nêutrons

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, S.A. Using stable isotopes to assess mineral absorption and utilization by children. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.70, n.6, p.955-64, 1999.
- ANDERSEN, O. The sixth Nordic symposium on trace elements in human health and disease. **Analyst**, Cambridge, v.123, p.1-2, 1998.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1995. v.2, 474p.
- BARNES, R.M. Advances in inductively coupled plasma mass spectrometry: human nutrition and toxicology. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.283, p.115-130, 1993.
- BARRETO, A.S.J., CYRILLO, D.C.L., COZZOLINO, S.M.F. Análise nutricional e complementação alimentar de cesta básica derivada do consumo. **Rev. Saude Publica**, São Paulo, v.32, n.1, p.29-35, 1998.
- BECKER, J.S., DIETZE, H.J. Inorganic trace analysis by mass spectrometry. **Spectrochim. Acta, Part B**, Amsterdam, p.1475-1506, 1998.
- BIDLACK, W.R. Interrelationships of food, nutrition, diet and health: the national association of state universities and land grant colleges white paper. **J. Am. Coll. Nutr.**, New York, v.15, n.5, p.422-433, 1996.

De acordo com a norma NBR6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) e adaptada pela Biblioteca de Química-USP. As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSIS) 1994.

- BIODYNAMICS. **Monitor de composição corporal**: biodinamics, modelo 310. s.l.: s.n., 1995. 25p. [Manual].
- BORON, B., HUPERT, J., BARCH, D.H., FOX, C.C., FRIEDMAN, H., LAYDEN, T.J., MOBARHAN, S. Effect of zinc deficiency on hepatic enzymes regulating vitamin A status. **J. Nutr.**, Bethesda, v.118, p.995-1001, 1988.
- BRAY, G.A. Obesity in America: In: _____. Actas de la Segunda Conferência del Centro Internacional Forgarty sobre la Obesidad. Washington: Department of Health, Education and Welfare, 1979. (Informe, 79). Apud: SILVA, M.R., NAVES, M.M.V. **Manual de nutrição e dietética**. 2.ed. Goiania: UFG, 1999. 173p.
- CHRISTIAN, P., WEST Jr., K.P. Interactions between zinc and vitamin A: an update. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.68, suppl., p.435S-441S, 1998.
- CONNELL, P., YOUNG, V.M., TOBOREK, M., COHEN, D.A., BARVE, S., McCLAIN, C.J., HENNIG, B. Zinc attenuates tumor necrosis factor-mediated activation of transcription factors in endothelial cells. **J. Am. Nutr.**, Bethesda, v.16, n.5, p.411-417, 1997.
- COUSINS, R.J., HEMPE, J.M. Cinc. In: ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. **Conocimientos actuales sobre nutrición**. 6.ed. Washington: OPS, 1991. p.289-300. (Publicación científica, n.532).
- COUSINS, R.J. A role of zinc in the regulation of gene expression. **Proc. Nutr. Soc.**, Wallingford, v.57, p.307-311, 1998.
- COUZY, F., KASTENMAYER, P., MANSOURIAN, R., GUINCHARD, S., MUNOZ-BOX, R. Zinc absorption in healthy elderly humans and the effect of diet. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.58, p.690-694, 1993.
- COUZY, F., KEE, C., GERSHWIN, M.E., MARESCHI, J.P. Nutritional implications of the integrations between minerals. **Prog. Food Nutr. Sci.**, Oxford, v.17, p.65-87, 1993.

- COZZOLINO, S.M.F., PEDROSA, L.F.C. Grupo de trabalho: biodisponibilidade de nutrientes. **Bol. Soc. Bras. Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.29, p.53-56, 1995.
- COZZOLINO, S.F. Biodisponibilidade de minerais. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.10, n.2, p.87-98, 1997.
- CREWS, H.M., DUCROS, V., EAGLES, J., MELLON, F.A., KASTENMAYER, P., LUTEN, J.B., McGAW, B.A. Mass spectrometric methods for studying nutrient mineral and trace element absorption and metabolism in humans using stable isotopes. **Analyst**, Cambridge, v.119, p.2491-2514, 1994.
- CREWS, H.M., LUTEM, J.B., McGAW, B.A. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). In: MELLON, F.A., SANDSTROM, B. **Stable isotopes in human nutrition, inorganic nutrient metabolism**. London: Harcourt Brace, 1996. p.97-115.
- DAYNTY, J. Calculo de percentual de absorção com isótopos estáveis do programa Stablecalc [Mensagem eletrônica]. Mensagem recebida por marisild@hotmail.com em 25 jun. 2002.
- De ANGELIS, R.C. Biodisponibilidade de minerais: significado para a saúde nutricional. In: _____, ed. **Fome oculta: impacto para a população do Brasil**. São Paulo: Atheneu, 1999. p.32-39.
- DEPARTAMENTO INTERSINDICAL DE ESTATÍSTICA E ESTUDOS SOCIOECONÔMICOS. **Metodologia de pesquisa cesta básica DIEESE & PROCON**. São Paulo: DIEESE, 1994.
- EGAN, C.B., SMITH, F.G., HOWK, R.S., SERFASS, R.E. Zinc absorption in women: comparison of intrinsic and extrinsic stable-isotope labels. **J. Clin. Nutr.**, Philadelphia, v.53, p.547-553, 1991.
- EL, S.N., KAVAS, A. Available lysine in dried milk after processing. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, London, v.48, p.109-111, 1997.

- ELLIS, R., KELSAY, J.L., REYMOLDS, R.D., MORRIS, E.R., MOSER, P.B., FRAZIER, C.W. Phytate: zinc and phytate x calcium: zinc millimolar ratios in self-selected diets of Americans, Asian Indians and Nepalese. **J. Am. Diet Assoc.**, Chicago, v.87, n.8, p.1043-1047, 1987.
- ESTRADA, R.O.M., WYATT, C.J. Comparacion entre los valores analizados y calculados del contenido de energía, grasa, proteína, fibra dietética, hierro y zinc em dietas del noroeste de México de diferentes niveles socioeconómicos. **Arch. Latinoam. Nutr.**, Caracas, v.45, n.2, p.151-158, 1995.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Zinc in human nutrition. **Nutr. Res. Rev.**, Wallingford, v.1, p.23-37, 1988.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Bioavailability of trace elements. **Food Chem.**, Oxford, v.43, p.213-217, 1992.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J., FOX, T.E., WHARF, S.G., EAGLES, J., ROGHAN, P.C., KENNEDY, H. Zinc absorption in adult men from a chicken sandwich made with white or wholemeal bread, measured by a double-label stable-isotope technique. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.67, p.411-419, 1992a.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J., JACKSON, M.J., FOX, T.E., WHARF, S.G., EAGLES, J., ROGHAN, P.C. The measurement of exchangeable pools of zinc using the stable isotope ^{70}Zn . **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.70, p.221-234, 1993.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J., HURRELL, R.F. Bioavailability of minerals and trace elements. **Nutr. Res. Rev.**, Wallingford, v.9, p.295-324, 1996.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Minerals and trace elements-summary. **Eur. J. Clin. Nutr.**, Basingstoke, v.51, suppl.1, S3, 1997.
- FÁVARO, D.I.T., AFONSO, C., VASCONCELLOS, M.B.A., COZZOLINO, S.F. Determinação de elementos minerais e traços por ativação neutrônica, em

- refeições servidas no restaurante da Faculdade de Saude Publica/USP. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.20, n.2, p.176-182, 2000.
- FINLEY, J.W., JOHNSON, P.E., REEVES, P.G., VANDERPOOL, R.A., BRISKE-ANDERSON, M. Effect of bile/pancreatic secretions on absorption of radioactive or stable zinc: *in vivo* and *in vitro* studies. **Biol. Trace Elem. Res.**, Totowa, n.42, p.81-96, 1994.
- INSTITUTE OF MEDICINE. Food and Nutrition Board. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, zinc, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium**. Washington: National Academy Press, 2001. 800p.
- FORTES, C., FORASTIERE, F., AGABITI, N., FANO, V., PACIFICI, R., VIRGILI, F., PIRAS, G., GUILDI, L., BARTOLONI, C., TRICERRI, A., ZUCCARO, P., EBRAHIM, S., PERUCCI, C.A. The effect of zinc in vitamin A supplementation on immune response in an older population. **J. Am. Geriatr. Soc.**, Baltimore, v.46, n.1, p.19-26, 1998.
- FOX, T.E., EAGLES, J., FAIRWEATHER-TAIT, S.J., WHARF, S.G. Intrinsic labelling of different foods with stable isotope of zinc (^{67}Zn) for use in bioavailability studies. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.66, p.57-63, 1991.
- FRIEL, J.K., NAAKE Jr., V.L., MILLER, L.V., FENNESSEY, P.V., HAMBIDGE, K.M. The analysis of stable isotopes in urine to determine the fractional absorption of zinc. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.55, p.473-477, 1992.
- GARDNER, J.M.M., WITTER, M.M., RAMDATH, D.D. Zinc supplementation: effects on the growth and morbidity of undernourished Jamaican children. **Eur. J. Clin. Nutr.**, Basingstoke, v.52, p.34-39, 1998.
- GARROW, J.S. **Treat obesity seriously**: a clinical manual. Edmburg: Churchill Livingstone, 1981. 329p.
- GEROTTO, M., DELL ANDREA, E., BORTOLI, A., MARCHIORI, M., PALONTA, M., TRONCON, A. Interference effects and their control in ICP-MS analysis

- of serum and saline solutions. **Microchem. J.**, Amsterdam, v.51, p.73-87, 1995.
- GIBSON, R.S. **Principles of nutrition assessment**. New York: Oxford University Press, 1990. p.542-553.
- GIBSON, R.G., FERGUSON, E.L. Assessment of dietary zinc in a population. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.68, suppl., p.430S-434S, 1998.
- GIBSON, R.S., HOTZ, C. Dietary diversification/modification strategies to enhance micronutrient content and bioavailability of diets in developing countries. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.2, suppl., p.159S-166S, 2001.
- HAMBIDGE, K.M., KREBS, N.F., MILLER, L. Evaluation of zinc metabolism use of stable-isotope techniques: implications for the assessment of zinc status. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.68, p.410S-413S, 1998.
- HAMBIDGE, M. Human zinc deficiency. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.1344S-1349S, 2000.
- HARDY, J., PARMENTIER, M., FANNI, J. Functionality of nutrients and thermal treatments of food. **Proc. Nutr. Soc.**, Wallingford, v.58, p.579-585, 1999.
- HEUMANN, K.G., GALLUS, S.M., RÄDLINGER, G., VOGL, J. Precision and accuracy in isotope ratio measurements by plasma source mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, Letchworth, v.13, p.1001-1008, 1998.
- HORVATIC, M., GUTERMAN, M. Available lysine content during cereal flake production. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.74, p.354-358, 1997.
- HOTZ, C., GIBSON, R.S., TEMPLE, L. A home-based method to reduce phytate content and increase Zn bioavailability in maize-based complementary diets. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, London, v.52, n.2, p.133-142, 2001.

- HOUSE, W.A. Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc. **Field Crops Res.**, Amsterdam, v.60, p.115-141, 1999.
- HWANG, T., JIANG, S. Determination of trace amounts of zinc in water sample by flow injection isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analyst**, Cambridge, v.122, p.233-237, 1997.
- INSTITUTO NACIONAL DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO (MS/NEPA). Estudo multicêntrico sobre consumo alimentar. **Cad. Debate**, São Paulo, v.esp., 1997, 62p.
- JACKSON, M.J., JONES, D.A., EDWARDS, R.H. Tissue zinc levels as an index of body zinc status. **Clin. Physiol.**, v.2, n.4, p.333-343, 1982.
- JACKSON, M.J., JONES, D.A., EDWARDS, R.H.T. Zinc homeostase in man: studies using a new stable isotope-dilution technique. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.51, p.199-208, 1984.
- JACKSON, M.J., GUIGLIANO, L.G., OLIVEIRA, E.F., SHRIMPTON, R., SWAINBANK, I.G. Stable isotope metabolic studies of zinc nutrition in slum-dwelling lactating women in the Amazon valley. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.59, 193-203, 1988.
- JACKSON, M.J. Physiology of zinc: general aspects. In: MILLS, C.F. **Zinc in human biology**. London: Springer-Verlag, 1989. p.1-13.
- JACKSON, M.J. The assessment of bioavailability of micronutrients: introduction. **Eur. J. Clin. Nutr.**, Basingstoke, v.51, suppl.1, p.S1-S2, 1997.
- JAMES, W.P.T, SCHOFIELD, E.C. **Necessidades humanas de energia**: um manual para planejadores e nutricionistas. Rio de Janeiro: FAO, 1994. 144p.
- JOHNSON, P.E., HUNT, C.D., MILNR, D.B., MULLEN L.K. Homeostatic control of zinc metabolism in men: zinc excretion and balance in men fed diets low in zinc. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.57, p.557-565, 1993.

- JUNQUEIRA-FRANCO, M.V.M., VANNUCCHI, H., FERRIOLLI, E., PADOVAN, G.J., MARCHINI, J.S. Aplicações clínicas de isótopos estáveis: utilização da técnica de espectrometria de massa. **Cad. Nutrição**, São Paulo, v.18, p.35-54, 1999.
- KING, J.C., KEEN, C.L. Zinc. In: SHILS, M.E., OLSON, J.A., SHIKE, M., ROSS, A.C., eds. **Modern nutrition in health and disease**. 8.ed. Philadelphia: : Lea & Febiger, 1994. p.214-230.
- KING, J.C., HAMBIDGE, K.M., WESTCOTT, J.L., KERN, D.L., MARSHALL, G. Daily variation in plasma zinc concentrations in women fed meals at six-hour intervals. **J. Nutr.**, Bethesda, v.124, p.508-516, 1994.
- KING, J.C., LOWE, N.M., JACKSON, M.J., SHAMES, D.M. The double sotope tracer method is a reliable measure of fractional zinc absorption. **Eur. J. Clin. Nutr.**, Basingstoke, v.51, p.787-788, 1997.
- KING, J.C., SHAMES, D.M., WOODHOUSE, L. Zinc homeostatic in humans. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.1360S-1366S, 2000.
- KING, J.C., SHAMES, D.M., LOWE, N.M., WOODHOUSE, L.R., SUTHERLAND, B., ABRAMS, S.A., TURNLUND, J.R., JACKSON, M.J. Effect of acute zinc depletion on zinc homeostasis and plasma zinc kinetics in men. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.74, n.1, p.116-124, 2001.
- KLUG, A. Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. **J. Mol. Biol.**, Sidcup, v.293, n.2, p.215-218, 1999.
- KRAUSE, M.V., MAHAN, L.K. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 6.ed. São Paulo: Roca, 1994. 1052p.
- KREBS, N.F., MILLER, L.V., NAAKE, V.L., LEI, S., WESTCOTT, J.E., FENNESSEY, P.V., HAMBIDGE, K.M. The use of stable isotope techniques to assess zinc metabolism. **J. Nutr. Biochem.**, New York, v.6, p.292-301, 1995.

- KREBS, N.F. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.1374S-1377S, 2000.
- KUBENA, K.S., McMURRAY, D.N. Nutrition and immune-system: a review of nutrient-nutrient interactions. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v.96, p.1156-1164, 1996.
- LAUBER, R.P., SHEARD, N.F., AMERICAN HEART ASSOCIATION. The American Heart Association dietary guidelines for 2000: a summary report. **Nutr. Rev.**, New York, v.59, n. 9, p. 298-306, 2001.
- LEE, D., PRASAD, A.S., HIDRICH-ADAIR, C., BRENER, G., JOHNSON, P.E. Homeostasis of zinc in marginal human zinc deficiency: role of absorption and endogenous excretion of zinc. **J. Lab. Clin. Med.**, Saint Louis, v.122, p.549-556, 1993.
- LEMMANN II. A study of the type of infantilism in hookworm disease. *Arch. Intern. Med.*, v.6, p.139-146, 1910. Apud: PRASAD, A.S. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.53, p.403-412, 1991.
- LINDEMAN, R.D., BAXTER, D.J., YUNICE, A., KRAIKITPANITCH S. Serum concentration and urinary excretions of zinc in cirrhosis, nephrotic syndrome and renal insufficiency. **Am. J. Med. Sci.**, Hagerstown, v.275, n.1, p.17-31, 1978.
- LIUZZI, J.P., BLANCHARD, R.K., COSINS, R.J. Differential regulation of zinc transporter 1,2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. **J. Nutr.**, Bethesda, v.131, p.46-52, 2001.
- LÖNNERDAL, B. Dietary factors influencing zinc absorption. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.1378S-1383S, 2000.
- LOWE, N.M., SHAMES, D.M., WOODHOUSE, L.R., MATEL, J.S., ROEHL, R., SACCOMANI, M.P., TOFFOLO, G., COBELLI, C., KING, J. A compartmental model of zinc metabolism in healthy women using oral and

- intravenous stable isotope tracers. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.65, p.1810-1819, 1997.
- LOWE, N.M., WOODHOUSE, L.R., KING, J. A comparison of the short-term kinetics of zinc metabolism in women during fasting and following a breakfast meal. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.80, p.363-370, 1998.
- LOWE, N.M., WOODHOUSE, L.R., MATEL, J.S., KING, J. Comparison of estimates of zinc absorption in humans by using 4 stable isotopic tracer methods and compartmental analysis. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.71, n.2, p.523-529, 2000.
- LOWMAN, J.T., KRIVIT, W. New *in vivo* tracer method with the use of nonradioactive isotopes and activation analysis. **J. Lab. Clin. Med.**, v.61, p.1042-1048, 1963. Apud: TURNLUND, J.R. The use of stable isotopes in mineral nutrition research. **J. Nutr.**, Bethesda, v.119, p.7-9, 1989.
- MAFRA, D. Avaliação do estado nutricional relativo ao zinco de pacientes com insuficiência renal crônica. São Paulo, 1999. 95p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- McMAHON, R.J., COUSINS, R.J. Mammalian zinc transporters. **J. Nutr.**, Bethesda, v.128, n.4, p.667-670, 1998.
- MARÉCHAL, C.N., TÉLOUK, P., ALBARÈDE, F. Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. **Chem. Geol.**, Amsterdam, v.156, p.251-273, 1999.
- MARREIRO, D.N. Estudo nutricional relativo ao zinco de crianças e adolescentes obesos. São Paulo, 1999. 102p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- MASOM, P.M., JUDD, P.A., FAIRWEATHER-TAIT, S.J., EAGLES, J., MINSKI, M.J. The effect of moderately increased intakes of complex carbohydrates (cereals, vegetables and fruit) for 12 weeks on iron and zinc metabolism. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.63, p.597-611, 1990.

- MATTOS, L.L., MARTINS, I.S. Consumo de fibras alimentares em população adulta. **Rev. Saude Publica**, São Paulo, v.34, n.1, p.50-55, 2000.
- MILLER, L.V., HAMBIDGE, K.M, VERNON, L.N., HONG, Z., WESTCOTT, J.L., FENNESSEY, P.V. Size, of the zinc pools that exchange rapidly with plasma zinc in humans: alternative techniques for measuring and relation to dietary zinc intake. **J. Nutr.**, Bethesda, v.124, p.268-276, 1994.
- MINOIA, C., SABBIONI, E., APOSTOLI, P., PIETRA, R., POZZOLI, L., GALLORINI, M., NICOLAOU, G., ALESSIO, L., CAPODAGLIO, E. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the european community. I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of italian subjects. **Sci. Total Environ.**, Shannon, v.95, p.89-105, 1990.
- MOENS, L., VERREP, P., DAMS, R. New high resolution ICP-MS technology applied for the determination of V, Fe, Cu, Zn and Ag in human serum. **J. Anal. At. Spectrom.**, Letchworth, v.9, p.1075-1078, 1994.
- MONDINI, L., MONTEIRO, C.A. Mudanças no padrão de alimentação da população urbana brasileira (1962-1988). **Rev. Saude Publica**, São Paulo, v.28, n.6, p.433-439, 1994.
- MONTEIRO, C.A., MONDINI, L., COSTA, R.B.L. Mudanças na composição e adequação nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil (1988-1996). **Rev. Saude Publica**, São Paulo, v.34, n.3, p.251-258, 2000.
- MULLIGAN, K.J. Feasibility of the direct analysis of urine by inductively coupled argon plasma mass spectrometry for biological monitoring of exposure to metals. **J. Anal. At. Spectrom.**, Letchworth, v.5, p.301-306, 1990.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (United States). **Recommended dietary allowances**. 10.ed. Washington: National Academy Press, 1989a. 284p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (United States). Committee on Diet and Health. Food and Nutrition Board. **Diet and Health**: implication for reducing

- chronic disease risk. Washington: National Academy Sciences, 1989b. 749p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (United States). Food and Nutrition Board. **Committee improving America's diet and health: interpretation and application of the recommendations in the diet and health report.** Washington: National Academy Sciences, 1991. p.84-111.
- NINH, N.X., THISSEN, J., COLLETTE, L., GERARD, G., KHOI, H.H., KETELSLERGERS, J. Zinc supplementation increases growth and circulating insulin-like growth factor I (IGF-I) in growth-retarded Vietnamese children. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.63, p.514-519, 1996.
- NISHI, Y. Zinc and growth. **J. Am. Coll. Nutr.**, New York, v.15, n.4, p.340-344, 1996.
- O'DELL, B.L., SAVAGE, J.E. Effect of phytic acid on zinc availability. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.103, p.304-306, 1960. Apud: PRASAD, A.S. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.53, p.403-412, 1991.
- OHATA, M., ICHINOSE, T., FURUTA, N., SHINOHARA, A., CHIBA, M. Isotope dilution analysis of Se in human blood serum by using high-power nitrogen microwave induced plasma mass spectrometry coupled with a hydride generation technique. **Anal. Chem.**, Columbus, v.70, n.13, p.2726-2730, 1998.
- OLIVEIRA, S.P., THÉBAUD-MONY, A. Hábitos e práticas alimentares em três localidades da cidade de São Paulo (Brasil). **Rev. Nutr.**, Campinas, v.11, n.1, p.37-50, 1998.
- OBERLEAS, D. Mechanism of zinc homeostasis. **J. Inorg. Biochem.**, New York, v.62, p.231-41, 1996.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Elementos traços na nutrição e saúde humana.** São Paulo: Roca, 1998. 297p.

- PATTERSON, D.S. Absorption of zinc from lupin (*Lupinus angustifolius*) - based foods. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.72, p.865-871, 1994.
- PEDROSA, L.F.C., COZZOLINO, S.M.F. Biodisponibilidade de zinco em dieta regional do Nordeste. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo**, São Paulo, v.26, p.123-133, 1990.
- PEDROSA, L.F.C., COZZOLINO, S.M.F. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da cidade de Natal/ RN. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.21, n.2, p.154-157, 2001.
- PEDROSA, L.F.C., FERREIRA, S.R.G., CESARINI, P.R., COZZOLINO, S.M.F. Influence of glycemic control on zinc urinary excretion in patients with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, Alexandria, v.22, n.2, p.362-363, 1999.
- PHILIPPI, S.T., SZARFARC, S.C., LATTERZA, A.R. **Virtual nutri (software) versão 1.0 para windows**. São Paulo: Departamento de Nutrição da FSP/USP, 1996. CD-ROM.
- PHILIPPI, S.T., LORENZANO, C., RIGO, N. Estudo comparativo entre tabelas de composição química dos alimentos para avaliação de dietas. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.8, n.2, p.200-213, 1995.
- PINNA, K., WOODHOUSE, L.R., SUTHERLAND, B., SHAMES, D.M., KING, J.C. Exchangeable zinc pool masses and turnover are maintained in healthy men with low zinc intakes. **J. Nutr.**, Bethesda, v.131, p.2288-2294, 2001.
- POKIDYCHEV, A., POKIDYCHEVA, M. Development of stable isotope manufacturing in Russia. **Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.**, Amsterdam, v.A 438, p.7-10, 1999.
- PORTELA, M.L., WEISSTAUB, A.R. Basal urine zinc/creatinine ratio as an indicator of dietary zinc intake in healthy adult women. **J. Am. Coll. Nutr.**, New York, v.19, n.3, p.413-417, 2000.

- PRASAD, A.S. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.53, p.403-412, 1991.
- PRASAD, A.S. Zinc deficiency in humans: a neglected problem. **J. Am. Coll. Nutr.**, New York, v.17, n.6, p.542-543, 1998.
- PRASAD, A.S. Discovery of human zinc deficiency: impact on human health. **Nutrition**, New York, v.17, n.7/8, p.685-687, 2001.
- RAUSCHER, A.M., FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Can a double isotope method be used to measure fractional zinc absorption from urinary samples? **Eur. J. Clin. Nutr.**, Basingstoke, v.51, p.69-73, 1997.
- RIBEIRO, M.A., STAMFORD, T.L., CABRAL FILHO, J.E. Valor nutritivo e refeições coletivas: tabelas versus análise em laboratório. **Rev. Saude Publica**, São Paulo, v.20, n.2, p.120-126, 1995.
- RIVERA, J.A., RUEL, M.T., SANTIZO, M.C., LÖNNERDAL, B., BROWN, K.H. Zinc supplementation improves the growth of stunted rural Guatemalan infants. **J. Nutr.**, Bethesda, v.128, n.3, p.556-562, 1998.
- RODRIGUES, M.P., NARIZANO, A., DEMCZYLO, V., CID, A. A simpler method for the determination of zinc human plasma levels by flame atomic absorption spectrophotometry. **At. Spectrosc.**, v.10, n.2, p.68-70, 1989.
- ROSADO, L., LÓPEZ, P., MUÑOZ, E., MARTINEZ, H., ALLEN, L.H. Zinc supplementation reduced morbidity, but neither zinc nor iron supplementation affected growth or body composition of Mexican preschoolers. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.65, p.13-19, 1997.
- SALGUEIRO, M.J., ZUBILLAGA, M., LYSIONEK, A., SARABIA, M.I., CARO, R., DE PAOLI, T., HAGER, A., WEILL, R., BOCCIO, J. Zinc as an essential micronutrient: a review. **Nutr. Res.**, New York, v.20, n.5, p.737-755, 2000.

- SANDBERG, S.A., AHDERINNE, R. HPLC method for determination of inositol ti-,tetra-,penta-, and hexaphosphates in foods and intestinal contents. **J. Food Sci.**, Chicago, v.51, n.3, p.547-550, 1986.
- SANDSTEAD, H.H. Is zinc deficiency a public health problem? **Nutrition**, New York, v.11, n.1, suppl., p.87-92, 1995.
- SANDSTRÖM, B., DAVIDSSON, L. KEVISTO, B. HASSELBLAD, C., CEDERBLAD, A. The effect of vegetables and beet fibre on the absorption of zinco in humans from composite meals. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.58, p.49-57, 1987.
- SANDSTRÖM, B. Methods for studying mineral and trace element absorption humans using stable isotopes. **Nutr. Res. Rev.**, Wallingford, v.6, p.71-95, 1993.
- SANDSTRÖM, B. Considerations in estimates of requeriments and critical intake of zinc. Adaption, availability and interactions. **Analyst**, Cambridge, v.120, p.913-915, 1995.
- SANDSTRÖM, B. Overview of isotopes methods and inorganic nutrient metabolism. In: MELLON, F.A., SANDSTRÖM, B. **Stable isotopes in human nutrition, inorganic nutrient metabolism**. London: Harcourt Brace, 1996. p.2-9.
- SANDSTRÖM, B. Bioavailability of zinc. **Eur. J. Clin. Nutr.**, Basingstoke, v.51, suppl.1, p.17S-19S, 1997.
- SANDSTRÖM, B., BUGEL,S., McGAW, B., PRICE, J., REID, M.D. A high oat-bran intake does not impair zinc absoption in humans when added to a low fiber animal protein based diet. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, n.3, p.594-599, 2000.
- SARKIS, J.E., KAKAZU. M. H., RIBEIRO, M.A., COZZOLINO, S.M.F. Determination of zinc isotope ratio in human urine by HR-ICP-MS. In: RIO

SYMPOSIUM ON ATOMIC SPECTROMETRY, 7, Florianópolis, 2002.

Resumos. Florianópolis: s.n., 2002.

SAZAWAL, S., BLACK, R.E., BHAN, M.K., JALLA, S., SINHA, A., BHANDARI, N. Efficacy of zinc supplementation in reducing the incidence and prevalence of acute diarrhea: a community-based, double-blind, controlled trial. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.66, p.413-418, 1997.

SCHOENHEIMER, R., RITTENBERG, D. deuterium as indicator of intermediary metabolism, I-IV. **J. Biol. Chem.**, v.111, p.163-192, 1935. Apud: TURNLUND, J.R. The use of stable isotopes in mineral nutrition research. **J. Nutr.**, Bethesda, v.119, p.7-14, 1989.

SCHRAM, D.C., VANDER MULLEN, J.A.M., DE REGT, J.M., BENOY, D.A., FEY, F.H.A.G., DE GROOTTE, F., JONKERS, J. Fundamental description of spectrochemical inductively coupled plasmas. **J. Anal. At. Spectrom.**, Letchworth, v.11, p.623-632, 1996.

SHANKAR, A.H., PRASAD, A.A.S. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.68, suppl., p.447S-463S, 1998.

SIAN, L., MINGYAN, X., MILLER, L.V., TONG, L., KREBS, N.F., HAMBIDGE, K.M. Zinc absorption and intestinal losses of endogenous zinc in young Chinese women with marginal zinc intakes. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.63. n.3, p.348-353, 1996.

SILVA, M.R. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.12. n.21, p.21-32, 1999.

STALLARD, L., REEVES, P.G. Zinc deficiency in adult rats reduces the relative abundance of testis-specific angiotensin-converting enzyme mRNA. **J. Nutr.**, Bethesda, v.127, p.25-29, 1997.

STEEN, S.N. Nutrition for young athletes. Especial considerations. **Sports Med.**, Baltimore, v.17, n.3, p.152-162, 1994.

- TIRAPEGUI, J., MENDES, R.R. Introdução à nutrição. In: TIRAPEGUI, J. **Nutrição: fundamentos e aspectos atuais**. São Paulo: Atheneu, 2000. 284p.
- TORRE, M., RODRIGUES, R.A., SAURA-CALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Lauderdale, v.30, n.1, p.1-22, 1991.
- TRAMONTE, V.L.C.G. Biodisponibilidade de ferro e zinco de dieta típica da população brasileira de baixa renda. Estudo com isótopos estáveis em humanos. São Paulo, 1994. 143p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- TURNLUND, J.R., KING, J.C., KEYES, W.R., GONG, B., MICHEL, M.C. A stable isotope study of zinc absorption in young men: effects of phytate and α -cellulose. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.40, p.1071-1077, 1984.
- TURNLUND, J.R. The use of stable isotopes in mineral nutrition research. **J. Nutr.**, Bethesda, v.119, p.7-14, 1989.
- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Tabela brasileira de composição de alimentos. Disponível em: <http://www.fcf/TABELA>. Acesso em: 05 maio 2000.
- VALLEE, B.L., GALDES, A. The metallobiochemistry of zinc enzymes. **Adv. Enzymol.**, v. 56, p.283-429, 1984.
- van ASSENDELFT, O.W. Measurement of hemoglobine. In: IZAK, G., LEWIS, S.M., eds. **Modern concepts in hemology**. New York. Academic Press, 1972. p.14-25.
- van DOKKUM, W, FAIRWEATHER-TAIT, S.J., HURRELL, R., SANDSTROM, B. Study techniques. In: MELLON, F.A., SANDSTROM, B., eds. **Stable isotopes in human nutrition: inorganic nutrient metabolism**. London: Harcourt Brace, 1996. p.23-42.

- van HEUZEN, A.A., HOEKSTRA, T., VAN WINGERDEN, B. Precision and accuracy attainable with isotope dilution analysis applied to inductively coupled plasma mass spectrometry: theory and experiments. **J. Anal. At. Spectrom.**, Letchworth, v.4, p.483-489, 1989.
- VANDECASTEELE, C., BLOCK, C.B. **Modern methods for trace element determination**. Chichester: John Wiley, 1993. 330p.
- VANHAECKE, F., MOENS, L., DAMS, R. Applicability of high-resolution ICP-mass spectrometry for isotope ratio measurements. **Anal. Chem.**, Columbus, v.69, n.2, p.268-273, 1997.
- VANHOE, H., DAMS, R., VERSIECK, J. Use of inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of ultra-trace elements in human serum. **J. Anal. At. Spectrom.**, Letchworth, v.9, p.23-31, 1994.
- WALLOCK, L.M., KING, J.C., HAMBIDGE, K.M., WESTCOTT, J.E., PRITTS, J. Meal-induced changes in plasma, erythrocyte, and urinary zinc concentrations in adult women. **J. Clin. Nutr.**, Philadelphia, v.58, p.695-701, 1993.
- WAPNIR, R.A. Zinc deficiency, malnutrition and the gastrointestinal tract. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.1388S-92S, 2000.
- WASTENEY, M.E., HOUSE, W.A., BARNES, R.M. Kinetics of zinc metabolism: variation with diet, genetics and disease. **J. Nutr.**, Bethesda, n.130, p.1355S-1359S, 2000.
- WHITTAKER, P. Iron and zinc interactions in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.68, suppl., p.442S-446S, 1998.
- WOOD, R.J. Assessment of marginal zinc status in humans. **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, p.1350S-1354S, 2000.

- YATES, A.A. National nutrition and public health policies: issues related to bioavailability of nutrients when developing dietary reference intakes **J. Nutr.**, Bethesda, v.131, p.1331S-1334S, 2001.
- YERGEY, A.L., VIEIRA, S.A., COVELL, D.G. Direct measurement of dietary fractional absorption using calcium isotopic tracers. **Biomed. Env. Mass Spectrom.**, v.14, p.603-607, 1987.