

**DESIRRÊ MORAIS DIAS**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTEICA, DA BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E DA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE FERRO DE ALIMENTOS INSERIDOS NO PROGRAMA DE BIOFORTIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

D541a            Dias, Desirrê Moraes, 1990-  
                    Avaliação da qualidade proteica, da biodisponibilidade de  
2015 ferro e da modulação da expressão gênica de proteínas  
envolvidas no metabolismo de ferro de alimentos inseridos no  
Programa de Biofortificação / Desirrê Moraes Dias. – Viçosa, MG,  
2015.  
                    xiii, 77f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Hércia Stampini Duarte Martino. Dissertação  
(mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Inclui  
bibliografia.

1. Nutrição. 2. Alimentos - Teor proteico. 3. Proteína - Análise. 4.  
Deficiência de ferro. 5. Vitamina A. 6. Antioxidante. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de  
Pós-graduação em Ciência da Nutrição.  
II. Título.

CDD 22. ed. 572.639

**DESIRRÊ MORAIS DIAS**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTEICA, DA BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E DA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE FERRO DE ALIMENTOS INSERIDOS NO PROGRAMA DE BIOFORTIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2015.

---

Frederico Augusto Ribeiro de Barros

---

Neuza Maria Brunoro Costa

---

Maria Eliza de Castro Moreira  
(Coorientadora)

---

Maria Inês Dantas Bastiani

---

Hércia Stampini Duarte Martino  
(Orientadora)

*“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria...”*  
**Provérbios 1:7**

*Dedico esta dissertação aos meus amados pais Nilza e Luiz Carlos, às minhas irmãs Bianka e Franciely e aos meus avós, com muito amor e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela maravilhosa benção de chegar até aqui, e porque sem Ele eu nada seria.

Aos meus pais Nilza e Luiz Carlos, pelo amor incondicional, incentivo, apoio e compreensão em todos os momentos.

Às minhas irmãs Franciely e Bianka e pelo carinho, amor e amizade.

Aos meus avós M<sup>a</sup>Aparecida, Cleudinéia e Adilon pelo imenso amor, exemplo, carinho e participação efetiva na minha vida.

Às minha querida orientadora professora Hércia, pela atenção, ensinamentos, orientação e amizade.

À minha co-orientadora Maria Eliza, pela amizade e pelo apoio no desenvolvimento do projeto.

À professora Sônia pela contribuição para o desenvolvimento do projeto.

Aos meus colegas do Laboratório de Nutrição Experimental, Renata, Ana, Mariana Milião, Rufino, Natália e Priscila pelo companheirismo.

Aos meus amigos da Primeira Igreja Batista de Viçosa pela amizade e carinho.

Às minhas queridas amigas Mariana Juste, Nathália e Dorina pela maravilhosa amizade, carinho, companheirismo, e por fazer parte da minha vida.

À Camila, Isabela, Thaiss e Keila pela amizade e apoio em todos os momentos.

A todos os meus colegas de mestrado e doutorado do Departamento de Nutrição e Saúde.

Aos funcionários, membros e parceiros Laboratório de Nutrição Experimental (DNS), Laboratório de Análise de Alimentos (DNS) e Desenvolvimento de Novos Produtos (DNS) pela atenção e apoio.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição científica.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde, pela amizade e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e à Embrapa pelo financiamento do projeto.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 Qualidade Proteica .....	3
2.2 Deficiência de ferro .....	4
2.3 Transição Nutricional e Fome Oculta .....	5
2.4 Metabolismo e homeostase de ferro .....	7
2.4.1 Metabolismo .....	8
2.4.2 Homeostase .....	10
2.5 Vitamina A e sua interação com o metabolismo de ferro .....	12
2.6 Estratégias para o combate da fome oculta .....	14
2.7 Biodisponibilidade de ferro .....	17
2.8 Alimentos biofortificados e hábitos alimentares .....	20
2.9 Referências .....	22
3. OBJETIVOS .....	29
3.1 Objetivo Geral .....	29
3.2 Objetivos Específicos .....	29
4. ARTIGO I .....	30
4.1 Introdução .....	31
4.2 Metodologia .....	32
4.2.1 Matéria prima .....	32
4.2.1.1 Preparo das farinhas dos alimentos .....	32
4.2.2 Composição química dos alimentos .....	33
4.2.3 Preparo e composição das dietas .....	36
4.2.4 Ensaio Biológico .....	36
4.2.6 Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) nas fezes .....	40
4.2.7 Lipídios nas fezes .....	40
4.2.8 Análises bioquímicas .....	40
4.2.9 Análise estatística .....	41
4.3 Resultados .....	41
4.3.1. Composição química dos alimentos biofortificados .....	41
4.3.2 Efeito das combinações alimentares sobre a qualidade proteica .....	42

4.3.3 Efeito da ingestão dos alimentos inseridos no programa de biofortificação de micronutrientes sobre as variáveis bioquímica. ....	44
4.3.4 Efeito da ingestão dos alimentos inseridos no programa de biofortificação de micronutrientes sobre a excreção fecal de lipídeos e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). ....	45
4.4 Discussão .....	47
4. 5 Conclusão.....	50
4.6 Referências.....	51
5. ARTIGO II.....	55
5.1 Introduction.....	55
5.2 Experimental Section .....	57
5.2.1 Setting and Sample.....	57
5.2.5 Animals and diets.....	59
5.2.6 Blood tests.....	61
5.2.7 Iron bioavailability .....	61
5.2.8 Extraction of mRNA and expression of proteins involved in iron metabolism.....	61
5.2.9 Antioxidant Capacity total plasma.....	63
5.2.10 Statistical Analysis .....	64
5.3 Results.....	64
5.3.2 Gene expression of proteins involved in iron metabolism.....	65
5.3.3 Effect of the ingestion of food placed in nutrient biofortifying program on total plasma antioxidant capacity .....	67
5.4 Discussion .....	68
5.5 Conclusions.....	71
5.6 References .....	71
6. CONCLUSÃO GERAL.....	75
ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética 1 .....	76
ANEXO 2: Aprovação do Comitê de Ética 2 .....	77



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Excreção de gordura fecal dos animais alimentados com caseína e combinações de alimentos inseridos no Programa de Biofortificação.....
- Figura 2: Concentração de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes dos animais alimentados com caseína e dietas contendo alimentos inseridos no Programa de Biofortificação.....
- Figura 3: Efeito da ingestão de diferentes combinações de alimentos inseridos no Programa de Biofortificação e sulfato ferroso sobre a expressão gênica de proteínas no tecido hepático.....
- Figura 4: Efeito da ingestão de diferentes combinações de alimentos inseridos no Programa de Biofortificação e sulfato ferroso sobre a expressão gênica de proteínas no tecido duodenal.....
- Figura 5: Capacidade antioxidante total do plasma.....

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais proteínas envolvidas no metabolismo de ferro e suas funções.....	
Tabela 2: Composição alimentar e densidade calórica das dietas experimentais (g.100g <sup>-1</sup> ).....	
Tabela 3: Composição nutricional da farinha dos alimentos inseridos no programa de biofortificação de micronutrientes, em base seca.....	
Tabela 4: Consumo alimentar total, ganho de peso e coeficiente de eficiência alimentar.....	
Tabela 5: Efeito das combinações de alimentos inseridos no programa de biofortificação de micronutrientes sobre os índices de qualidade proteica.....	
Tabela 6: Efeito das combinações de alimentos inseridos no programa de biofortificação de micronutrientes sobre a ingestão e excreção de nitrogênio, e digestibilidade verdadeira.	
Tabela 7: Efeito das combinações de alimentos inseridos no programa de biofortificação de micronutrientes sobre as variáveis bioquímicas de ratos Wista.....	
Tabela 8: Composição química e razão molar fitato:ferro e zinco:ferro das farinhas dos alimentos inseridos no programa de biofortificação de micronutrientes, em base seca.....	
Tabela 9: Composição alimentar e nutricional das dietas experimentais.....	
Tabela 10: Sequência de oligonucleotídeos empregada na análise de RT-PCR.....	
Tabela 11: Efeito da ingestão de alimentos inseridos no programa de biofortificação de micronutrientes sobre o ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar.....	
Tabela 12: Efeito da ingestão de alimentos inseridos no programa de biofortificação de micronutrientes sobre a ingestão total de ferro e vitamina A e índices de avaliação da biodisponibilidade de ferro (n=7).....	

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DMT-1.....	<i>Proteína transportadora de metal divalente</i>
Dcytb.....	<i>Citocromo duodenal B</i>
HCP1.....	<i>Proteína transportadora do heme-1</i>
FPT.....	<i>Ferroportina</i>
EROs.....	<i>Espécies reativas de oxigênio</i>
LDL.....	<i>Lipoproteína de baixa densidade</i>
FAO.....	<i>Food and Agriculture Organization</i>
IBGE.....	<i>Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística</i>
AGCC.....	<i>Ácidos graxos de cadeia curta</i>
CEA.....	<i>Coefficiente de eficiência alimentar</i>
PER.....	<i>Coefficiente de eficiência protéica</i>
NPR.....	<i>Razão protéica líquida</i>
DV.....	<i>Digestibilidade verdadeira</i>
GHb.....	<i>Ganho de hemoglobina</i>
HRE.....	<i>Hemoglobin maintenance efficiency (Eficiência de regeneração da hemoglobina)</i>
RBV.....	<i>Relative biological value of HRE (Valor biológico relativo da HRE)</i>
GAPDH.....	<i>Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase</i>

## RESUMO

DIAS, Desirrê Morais, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2015. **Avaliação da qualidade proteica, da biodisponibilidade de ferro e da modulação da expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro de alimentos inseridos no programa de biofortificação.** Orientadora: Hércia Stampini Duarte Martino. Coorientadores: Maria Eliza de Castro Moreira e Sônia Machado Rocha Ribeiro.

A deficiência de ferro é um problema nutricional que atinge milhares de pessoas no mundo e pode estar associada ao baixo consumo de vitamina A. Os alimentos biofortificados com ferro e vitamina A podem contribuir para aumentar o consumo desses nutrientes pela população, sem alterar seu hábito alimentar e o custo da alimentação. O objetivo do estudo foi avaliar a qualidade proteica e biodisponibilidade de ferro das combinações alimentares do arroz e feijão, e destes com a batata doce e abóbora biofortificadas, que fazem parte do programa de Biofortificação de micronutrientes promovido pelo Programa de Melhoramento Genético da EMBRAPA (BioFORT e *HarvestPlus*), bem como avaliar a expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro e atividade antioxidante. O arroz e os feijões foram submetidos à cocção úmida e secos em estufa a 60°C por 17h. A abóbora e a batata doce foram secas *in natura* em estufa a 60°C por 18h. Foram analisados a composição centesimal, carotenoides totais, fitato, fenólicos totais e os minerais ferro e zinco, das farinhas dos alimentos. Foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento avaliou-se a qualidade proteica *in vivo* (período de 14 dias), o perfil de lipídios e de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e a glicemia (período de 28 dias) de animais alimentados com as seguintes combinações (n=6): arroz+feijão caupi (AFC), arroz+feijão pontal (AFP), arroz+feijão caupi+abóbora (AFCA), arroz+feijão pontal+abóbora (AFPA), arroz+feijão caupi+ batata doce (AFCB) e arroz+feijão pontal+batata doce (AFPB), um controle negativo (aproteico) e um controle positivo (caseína). Foram calculados os índices de qualidade proteica: coeficiente de eficiência proteica (PER), razão proteica líquida (NPR) e digestibilidade verdadeira (DV). Os índices PER e NPR dos grupos testes não diferiram ( $p \geq 0,05$ ) do grupo caseína, indicando elevada qualidade proteica. A DV dos grupos teste foi inferior ( $p < 0,05$ ) à caseína, no entanto os grupos contendo feijão caupi AFC, AFCA e AFCB apresentaram DV superior ( $p \geq 0,05$ ) aos demais grupos testes contendo feijão pontal em suas dietas. Os grupos AFPA e AFPB reduziram ( $p < 0,05$ ) a glicemia de jejum em comparação ao padrão caseína. Não houve alteração no perfil de lipídios séricos ( $p \geq 0,05$ ). As combinações alimentares apresentaram maior ( $p < 0,05$ ) excreção de lipídios fecal. A excreção de ácido propiônico foi maior ( $p \geq 0,05$ ) no grupo AFCB e a

concentração de ácido butírico maior ( $p \geq 0,05$ ) nos grupos AFCA e AFCA, ambos contendo feijão caupi. A excreção de ácido acético foi maior ( $p \geq 0,05$ ) no grupo caseína. A combinação de alimentos previstos no programa de biofortificação de micronutrientes mostrou-se tão eficiente quanto à caseína para promover o crescimento e desenvolvimento dos animais, além dos efeitos hipoglicemiantes das combinações alimentares com feijão pontal. No segundo experimento foi avaliada a biodisponibilidade de ferro, a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro e o efeito antioxidante. A biodisponibilidade do ferro foi avaliada por bioensaio pelo método de depleção/repleção (período de 36 dias). Foram testados sete grupos experimentais ( $n=7$ ): Feijão Pontal (FP); Arroz+Feijão Pontal (AFP); Feijão Pontal+Batata Doce (FPBD); Feijão Pontal+Abóbora (FPA); Feijão Pontal+Arroz+Batata Doce (FPABD); Feijão Pontal+Arroz+Batata Doce (FPAA); Controle Positivo (Sulfato Ferroso). Foram avaliados os índices: ganho de hemoglobina (GHB), Eficiência de Regeneração da Hemoglobina (HRE) e Valor Biológico Relativo do HRE (RBV-HRE). A expressão gênica das proteínas DMT-1, DcytB, ferroportina, hephaestina, transferrina e ferritina, foi avaliada por meio de RT-PCR. Avaliou-se a capacidade antioxidante total do plasma (CAT). O GHB dos grupos experimentais foi semelhante ao controle ( $p \geq 0,05$ ), exceto para os grupos FP e A+FP. Os grupos teste apresentaram níveis similares ( $p \geq 0,05$ ) de HRE, sendo superior ( $p < 0,05$ ) o controle, exceto para o grupo FP. Os animais que receberam dietas contendo alimentos biofortificados com carotenoides apresentaram maior ( $p < 0,05$ ) expressão da DMT-1, DcytB e ferroportina. Todos os grupos, exceto o FP, apresentaram CAT semelhante ( $p \geq 0,05$ ). A associação de arroz e feijão, e estes alimentos ricos em carotenoides favoreceu a expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, favorecendo a biodisponibilidade de ferro e a capacidade antioxidante.

## ABSTRACT

DIAS, Desirrê Morais, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Evaluation of protein quality, of iron bioavailability and of the modulation of gene expression of proteins involved in iron metabolism of food inserted in the biofortification program.** Adviser: Hércia Stampini Duarte Martino Co-Advisers: Maria Eliza de Castro Moreira and Sônia Machado Rocha Ribeiro

Iron deficiency is a nutritional problem that affects thousands of people in the worldwide and may be associated with low intake of vitamin A. Biofortified foods with iron and carotenoids is a promising strategy to overcome these nutrient deficiencies, without changing food habit and costs. The objective of the study was to evaluate the protein quality and bioavailability of iron from food combinations of rice and beans, and those with sweet potato and pumpkin biofortified, which are part of Biofortification program of micronutrients promoted by the Genetic Improvement Program of EMBRAPA (BioFORT and HarvestPlus), and to assess the gene expression of proteins involved in iron metabolism and antioxidant activity. The rice and beans were cooked and dried moist and dry in oven at 60 ° C for 17h. The pumpkin and sweet potatoes were dried *in natura* in oven at 60°C for 18h. We analyzed the chemical composition, carotenoids, phytate, total phenolic, iron and zinc. Two experiments were conducted. In the first experiment it was evaluated the *in vivo* protein quality (14 days), the profile of lipids, short chain fatty acids (SCFA) and blood glucose (28 days) from animals fed with the following combinations (n = 6): Rice + Caupi Bean (RCB), Rice + Pontal Bean (RPB), Rice + Caupi Bean + Pumpkin (RCBP), Rice + Pontal Bean + Pumpkin (RPBP), Rice + Caupi Bean + Sweet potato (RCBS) and Rice + Pontal Bean + Sweet potato (RPBS), and a negative control (protein-free) and a positive control (casein). The protein quality indices were calculated: protein efficiency ratio (PER), net protein ratio (NPR) and true digestibility (TD). The PER and NPR of the experimental groups did not differ ( $p \geq 0.05$ ) from the casein group, indicating high protein quality. The TD of the test groups was lower ( $p < 0.05$ ) than casein, however the groups containing Caupi bean resented TD higher ( $p \geq 0.05$ ) than the other test groups containing Pontal bean. The RPBP and RPBS groups reduced ( $p < 0.05$ ) fasting plasma glucose compared to casein. No change in serum lipid profile ( $p \geq 0.05$ ). No difference was found for lipid profile among experimental groups ( $p > 0.05$ ). Animals feed food combinations had higher ( $p < 0.05$ ) fecal lipid excretion. The acetic acid excretion was higher ( $p \geq 0.05$ ) in the casein group. The combination of food provided for in micronutrient biofortification program presented high protein quality, and the combinations with pontal beans presented hypoglycemic effect. In the second experiment

it was evaluated iron bioavailability, the gene expression of proteins involved in iron metabolism and antioxidant activity. The iron bioavailability was assessed by bioassay by the method of depletion-repletion (36 days). It were tested seven experimental groups (n=7): Pontal Bean (B); Rice + Pontal Bean (RB); Pontal Bean + Pumpkin (BP); Pontal Bean + Sweet Potato (BS); Rice + Pontal Bean + Pumpkin (RBP); Rice + Pontal Beans + Sweet Potato (RBS), Positive Control (ferrous sulfate). We evaluated hemoglobin gain (HG), Hb regeneration efficiency (HRE) and relative biological value of HRE (HRE of RBV). The gene expression of proteins DMT-1, Dcytb, ferroportin, hephaestin, transferrin and ferritin was evaluated by RT-PCR. It was evaluated the plasma total antioxidant capacity. The experimental groups showed values of GHb similar to the control, except for the groups B and RB. The test groups showed similar levels of HRE, which were higher than the control, except for the group B. The animals fed with biofortified foods with carotenoids had higher ( $p < 0.05$ ) expression of DMT-1, DcytB and ferroportin. All groups except the FP showed similar plasma total antioxidant capacity ( $p \geq 0.05$ ). The combination of rice and beans, and those with foods rich in carotenoids favored the gene expression of proteins involved in iron metabolism, and hence the bioavailability of iron and the antioxidant capacity.

## 1. INTRODUÇÃO

É estimado que dois bilhões de pessoas no mundo sejam afetadas pela deficiência crônica de vitaminas e minerais essenciais, coletivamente conhecida como fome oculta (MUTHAYYA, *et al.*, 2013). A deficiência de ferro é a carência nutricional mais prevalente no mundo, acometendo cerca de 40% da população mundial, em particular mulheres e crianças nos países em desenvolvimento (MUTHAYYA *et al.*, 2013; WHO, 2008). Existem vários fatores que contribuem para a deficiência de ferro, mas o principal fator é a baixa biodisponibilidade deste mineral na dieta (MAHLERA; SHULERB; GLAHNC, 2009).

Os esforços globais para reduzir a incidência dessas carências nutricionais têm sido amplamente direcionados para o consumo crescente de suplementação de micronutrientes por meio da fortificação e biofortificação de alimentos (KENNEDY *et al.*, 2007). A biofortificação de culturas de alimentos básicos é uma nova abordagem de saúde pública para controlar a deficiência de vitamina A, ferro e zinco em países pobres. Esse processo consiste no desenvolvimento de alimentos com maiores concentrações de micronutrientes utilizando as melhores práticas tradicionais de reprodução e biotecnologia moderna (BOUIS *et al.*, 2011; FRANO *et al.*, 2014).

A fortificação de ferro, entretanto, muitas vezes não é efetiva devido à deficiência concomitante de vitamina A. A hipovitaminose A e a anemia parecem coexistir, particularmente em crianças em vulnerabilidade social. Alguns estudos, em animais e humanos, têm mostrado uma relação entre deficiência de vitamina A e anemia ferropriva (OATES, 2007; MEHDAD *et al.*, 2010).

A relação entre o consumo de vitamina A e o estado nutricional de ferro tem levado ao desenvolvimento de alimentos biofortificados com ferro e com carotenoides, que possam contribuir para aumentar o conteúdo desses nutrientes da dieta e melhorar a saúde da população. Contudo, existe a necessidade de se avaliar o efeito das interações entre alimentos biofortificados consumidos na mesma dieta (CASGRAIN *et al.*, 2010), uma vez que o consumo concomitante de alimentos influencia a biodisponibilidade dos nutrientes. Além disso, o aumento do consumo de ferro (ALFÉREZ *et al.*, 2011) e de vitamina A (DRAGSTED, 2008; AITKEN; RONAN, 2008) podem influenciar o conteúdo e a atividade de enzimas antioxidantes.

O aumento da concentração de ferro em culturas alimentares pode não necessariamente se traduzir em um aumento proporcional do ferro absorvido, pois variedades de culturas com altas concentrações de ferro podem ter concentrações aumentadas ou diminuídas de inibidores ou potenciadores da absorção de ferro. Assim, é



necessário analisar a concentração de ferro e sua biodisponibilidade em novas culturas com concentrações elevadas desse mineral. Alguns estudos avaliaram a disponibilidade de ferro de culturas biofortificadas, como o feijão (MOURA; CANNIATTI-BRAZACA, 2006; ARIZA-NIETO *et al.*, 2007) e a biodisponibilidade do ferro do arroz fortificado com ferro (PROM-U-THAI *et al.*, 2009). Entretanto, são escassos os estudos que avaliam a biodisponibilidade do ferro quando alimentos biofortificados com ferro, zinco e carotenoides encontram-se combinados.

Apesar de não serem fonte de proteína de alta qualidade, os produtos de origem vegetal contribuem consideravelmente para a ingestão proteica total da população, pois representam as fontes proteicas de menor custo e, portanto de maior consumo (MENDES *et al.*, 2009). A combinação de diferentes fontes pode melhorar o balanço de aminoácidos essenciais e, portanto, melhorar a qualidade proteica. Existem estudos que avaliaram a qualidade proteica do feijão (CRUZ *et al.*, 2005; LUJÁN *et al.*, 2008) e também a combinação de arroz e feijão (CINTRA *et al.*, 2007; KANNA; NIELSEN; MASON, 2001). No entanto, estudos que avaliem as combinações de alimento biofortificados com ferro, zinco e carotenoides, como o feijão, arroz, abóbora e batata doce são escassos.

Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a qualidade proteica e a biodisponibilidade do ferro do arroz e feijão, e destes com a batata doce e abóbora biofortificadas, bem como a avaliar a expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro e atividade antioxidante. A hipótese do estudo baseia-se na premissa de que a combinação de alimentos biofortificados com ferro e carotenoides proporcionará fontes proteicas de origem vegetal de boa qualidade, mesmo na presença de fitoquímicos; a biodisponibilidade de ferro diferir-se-á entre as combinações alimentares e será maior nas misturas com alimentos biofortificados com carotenoides; a concentração de fitato e de polifenóis, e a razão molar fitato:ferro não reduzirá a biodisponibilidade de minerais das combinações alimentares; ocorrerá aumento da expressão das proteínas envolvidas no metabolismo de ferro no tecido duodenal e hepático de animais após a ingestão do feijão biofortificado adicionado de arroz e/ou batata doce e abóbora biofortificados com carotenoides. Espera-se também que a capacidade antioxidante total do plasma seja maior nos animais que receberam alimentos biofortificados com carotenoides.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Qualidade Proteica

As proteínas são compostos orgânicos complexos, essenciais aos organismos animal e humano. Apresentam funções importantes no organismo humano, como carreadores de íons e moléculas. São indispensáveis para a síntese de hormônios, células de defesa, além de serem uma fonte energética e estrutural. Também fornecem ao organismo quantidades adequadas de aminoácidos para a síntese e manutenção dos tecidos corporais (HERNÁNDEZ; HERNÁNDEZ; MATÍNEZ, 1996).

A qualidade de uma proteína está relacionada à sua capacidade de suprir as exigências do organismo. E seu valor nutricional é afetado pela composição, digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, da fonte proteica, de efeitos do processamento e armazenamento, além da presença ou ausência de toxicidade e fatores antinutricionais (proteases, ácido fítico e taninos) (CINTRA et AL., 2007; FRIEDMAN, 1996). A digestibilidade indica a porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácidos ou qualquer outra forma nitrogenada, pelo organismo, constituindo o primeiro fator que afeta a eficiência da utilização proteica da dieta (BRESSANI; ELIAS, 1983).

A qualidade proteica é um aspecto importante de qualquer consideração da necessidade proteica humana, tornando importante, não somente a quantidade, como também o tipo de proteína ingerida, a matriz alimentar em que a proteína é consumida e o estado fisiológico do indivíduo que a recebe (MILLWARD *et al.*, 2008).

As proteínas de origem animal são, em sua maioria, consideradas de boa qualidade, sendo as melhores fontes de aminoácidos essenciais para o organismo. Em contrapartida, os alimentos de origem vegetal são também fontes de proteína, porém, muitas vezes apresentam quantidades insuficientes de aminoácidos essenciais e baixa digestibilidade, reduzindo o seu valor nutricional em relação as proteínas de origem animal (MENDES *et al.*, 2009; CARBONARO, MASELLI, NUCARA, 2012). Apesar disso, os alimentos de origem vegetal contribuem consideravelmente para a ingestão total de proteína da população, por serem de menor custo (MENDES *et al.*, 2009).

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa amplamente consumida em alguns países latino-americanos, constituindo uma importante fonte de proteína na alimentação da maioria da população desses países. Embora seu consumo tenha diminuído nas últimas décadas, ainda constitui um alimento básico na dieta do

brasileiro. A proteína do feijão é deficiente em aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína), além de apresentarem baixa digestibilidade, acarretando em menor valor nutricional (FERNANDES, SOUZA, NAVES, 2011). A baixa digestibilidade do feijão é devido à conformação e estrutura primária das proteínas e pela presença de inibidores de proteases termoestáveis e polifenóis, que interagem com as enzimas digestivas ou formam complexos com as proteínas do feijão diminuindo a sua suscetibilidade à hidrólise (CARBONARO, MASELLI, NUCARA, 2012).

Já em relação ao arroz beneficiado polido, seu valor nutritivo está relacionado, principalmente, ao seu conteúdo protéico. Esse conteúdo é superior ao esperado pensar e fica em torno de 7% no grão polido e 8-9% no integral, para a maioria das cultivares em uso no País. A proteína do arroz é de boa qualidade, pois contém os oito dos aminoácidos essenciais ou indispensáveis ao homem e, combinada com leguminosas como o feijão, proporciona uma combinação com valor protéico mais valiosa. O consumo per capita de arroz no Brasil é alto, correspondendo a 160,3g/dia para o produto beneficiado polido e 8,1g/dia para o integral (POF, 2008-2009). Dessa forma, este cereal contribui de forma significativa para o total de proteína ingerido pela população, representando importante fonte protéica na dieta alimentar brasileira.

A combinação de diferentes fontes alimentares pode melhorar a qualidade da proteína, por proporcionar um balanço de aminoácidos adequado (MENDES *et al.*, 2009). Assim, combinações de vegetais, como de um cereal e de uma leguminosa, pode resultar em misturas protéicas de alto valor biológico, semelhante a uma fonte animal. No Brasil, a principal fonte protéica da alimentação é derivada da ingestão de arroz e feijão. Esta combinação tem adequado teor nitrogenado, supre os aminoácidos essenciais e tem digestibilidade ao redor de 80% (OLIVEIRA; VANNUCCHI, 1983).

## **2.2 Deficiência de ferro**

A deficiência de ferro ocorre em etapas, começando com o esgotamento das reservas de ferro, seguindo-se o transporte de ferro reduzido, e, finalmente, a depleção de proteínas e enzimas que contêm ferro, incluindo a hemoglobina, o que resulta em anemia por deficiência de ferro (GARDNER *et al.*, 1977).

O diagnóstico de anemia ferropriva é feito quando ocorre um decréscimo no nível de hemoglobina a valores inferiores a 13 g/dL para homens, 12 g/dL para mulheres e crianças de 6 a 14 anos, e 11 g/dl para gestantes e crianças de 6 meses a 6 anos (WHO, 2008).

A anemia é um problema de saúde pública, afetando cerca de 1,62 bilhões de pessoas no mundo, o que corresponde a 24,8% da população. Dentre os grupos populacionais, as crianças em idade pré-escolar (0 a 4,99 anos) são as mais afetadas com uma prevalência de 47,4% (WHO, 2008).

Os sintomas de deficiência de ferro são sutis e inespecíficos e, muitas vezes só se tornam aparentes com a anemia grave. Bebês e crianças com deficiência de ferro, com ou sem anemia, foram caracterizados com deficiência do desenvolvimento neural (SCHNEIDER *et al.*, 2005). Um estado de deficiência de ferro, que persiste durante o período crítico de desenvolvimento cerebral na infância, pode ter efeitos duradouros sobre o funcionamento cognitivo (PALTÍ; MEIJER; ADLER, 1985). Além disso, o risco de retardo mental, leve ou moderado, aumenta a cada decréscimo no nível de hemoglobina, sugerindo, assim, a existência de associação entre a deficiência de ferro e o risco de retardo mental leve ou moderado (HURTADO, CLAUSSEN E SCOTT, 1999).

A anemia por deficiência de ferro torna as crianças mais hesitantes, e facilmente cansadas, também ficam menos ativas, menos atentas às instruções e demonstrações. Tem sido sugerido que esses comportamentos podem contribuir para o prejuízo no desenvolvimento devido ao isolamento funcional (SCHNEIDER *et al.*, 2005). Além disso, tem sido associada ao prejuízo no desenvolvimento da linguagem, coordenação motora e no desempenho escolar (WHO, 2008), anormalidades no epitélio do trato gastrointestinal e dificuldade de cicatrização. A sua forma grave e moderada está associada ao aumento da mortalidade e suscetibilidade a infecções (SHILS *et al.*, 2003).

Outras características da deficiência de ferro são: palidez cutânea, da conjuntiva, dos lábios, da língua e das palmas das mãos, respiração ofegante, disfagia (dificuldade na deglutição) e astenia (fraqueza orgânica) (ANDREWS, 2002)

Nos países desenvolvidos, a deficiência de ferro e a anemia por deficiência de ferro tendem a afetar mulheres na pré-menopausa, principalmente devido à ingestão de ferro abaixo do ideal e as perdas de ferro menstruais. Em contraste, nos países em desenvolvimento, o estado de deficiência de ferro ocorre, na maioria da população, normalmente devido à falta de alimentos que contenham ferro biodisponível (LOOKER; COGSWELL; GUNTER, 2000).

### **2.3 Transição Nutricional e Fome Oculta**

A presença da desnutrição, deficiência de micronutrientes, excesso de peso e outras doenças crônicas não transmissíveis coexistindo na mesma comunidade e, muitas

vezes, no mesmo domicílio, caracteriza a transição nutricional. Esse fenômeno é traduzido em um dos maiores desafios para a saúde pública, exigindo um modelo de atenção à saúde pautado na integralidade do indivíduo com uma abordagem centrada na promoção da saúde (COUTINHO; GENTIL; TORAL, 2008).

Estima-se que mais de 840 milhões de pessoas no mundo não consumam alimentos em quantidades suficientes para suprir suas necessidades diárias básicas de energia. E um número maior, cerca de 2 bilhões de pessoas, são acometidas por uma ou mais deficiências de micronutrientes (KENNEDY *et al.*, 2003; GRAHAM, *et al.*, 2007).

As carências de micronutrientes mais difundidas são de ferro, zinco, vitamina A, iodo e folato, embora deficiências de vitamina B12 e outras do complexo B também ocorram. Em países em desenvolvimento, é frequentemente encontrada deficiência de múltiplos micronutrientes em uma mesma população. Essas carências nutricionais impactam negativamente, não só a saúde mundial, como também o crescimento econômico (ALLEN; PEERSON; OLNEY, 2009; MUTHAYYA, *et al.*, 2013).

Dados da literatura indicam que no Brasil a ingestão de alguns elementos, como ferro, cálcio, zinco e selênio encontra-se abaixo do recomendado ou possuem baixa biodisponibilidade nas dietas (NUTTI; CARVALHO; WATANABE, 2006). A falta dessas vitaminas e minerais essenciais, muitas vezes resulta em fome oculta, em que os sinais de desnutrição e fome são menos visíveis. Uma pessoa pode ter acesso a uma quantidade suficiente de calorias, mas carecer de micronutrientes adequados (KENNEDY *et al.*, 2003). Este fenômeno foi denominado de fome oculta, pois seus sintomas nem sempre são óbvios e as pessoas podem não ter conhecimento deles. Além disso, distúrbios da homeostase do ferro são frequentemente encontrados em pacientes obesos, podendo ser um contribuinte fundamental para as comorbidades encontradas. A obesidade está frequentemente associada à deficiência de ferro, o que provoca fadiga, diminuição da capacidade de trabalho e anemia (MCCLUNG; KARL, 2009).

Acredita-se que esse fenômeno deva-se a volatilidade dos preços dos alimentos e às mudanças climáticas, ocorridos nos últimos anos, que levaram a uma alteração da ingestão alimentar. Assim, houve uma redução do consumo de alimentos ricos em micronutrientes, e, concomitantemente um aumento do consumo de alimentos pobres em micronutrientes, relativamente mais baratos. Assim ocorreu uma redução na diversificação da dieta (BLOEM, 2010).

A falta de diversidade é uma questão crítica particularmente nos países em desenvolvimento, aonde as dietas consistem principalmente de alimentos básicos ricos em amido, com menos acesso a alimentos ricos em nutrientes, como proteínas animais,

frutas e hortaliças. É evidenciado que o consumo de uma variedade de alimentos dentro dos diversos grupos alimentares, é necessário para assegurar a ingestão adequada de nutrientes essenciais.

A deficiência de micronutrientes pode gerar consequências negativas sobre a saúde e produtividade do indivíduo ao longo da vida (BURCHI; FANZO; FRISON, 2011). Os micronutrientes são nutrientes (predominantemente vitaminas e minerais) exigidos pelos seres humanos, ao longo da vida, a fim de realizar uma gama de funções fisiológicas. A deficiência de minerais e vitaminas pode interferir em todo desenvolvimento do indivíduo, com consequências tanto do ponto de vista físico como social e econômico, interferindo até mesmo no próprio desenvolvimento do país. Dentre os micronutrientes mais estudados, o ferro, a vitamina A e o iodo continuam sendo apontados como os de maior problema de saúde pública, no Brasil e no mundo (KENNEDY *et al.*, 2003; GRAHAM, *et al.*, 2007; NUTTI; CARVALHO; WATANABE, 2006).

#### **2.4 Metabolismo e homeostase de ferro**

O ferro é o quarto elemento mais abundante na natureza, compreendendo cerca de 4,7% da superfície terrestre. Apesar dessa abundância a deficiência de ferro constitui a carência nutricional mais prevalente no mundo, atingindo todas as camadas sociais e sendo mais presente em países menos desenvolvidos (SILVA; MURA, 2011).

No organismo humano a quantidade de ferro varia com o peso, a concentração de hemoglobina, sexo e o tamanho do compartimento de reserva. O ferro dito essencial encontra-se sob a forma de hemoglobina (60 a 70%), mioglobina e enzimas (15%) e na transferrina (0,08%). O ferro de reservas constitui o ferro não essencial, encontrado sob a forma de ferritina e hemossiderina (15 a 35%) (SILVA; MURA, 2011)

Devido à sua capacidade de receber e doar elétrons, este mineral é imprescindível para diversas reações biológicas. É componente essencial na formação da molécula heme, sintetizada em todas as células nucleadas, sendo que a maior quantidade é produzida pelo tecido eritróide, além disso, participa da formação de diversas proteínas. Na forma de hemoproteína, é fundamental para o transporte de oxigênio, geração de energia celular e detoxificação. Sua síntese é controlada por mecanismos enzimáticos e de degradação, e esse controle tem que ser rigoroso, uma vez que o excesso de ferro irá reagir com o oxigênio gerando radicais hidroxil e ânions superóxidos (reação de Fenton). A ação desses radicais sobre proteínas, lipídeos e DNA causa graves lesões celulares e teciduais

(DUNN; RAHMANTO; RICHARDSON, 2007; WIJAYANTI; KATZ, IMMENSCHUH, 2004)

O ferro é um mineral essencial para a expansão da massa de glóbulos vermelhos e tecidos de crescimento de bebês, crianças e adolescentes. Uma criança normal no nascimento possui cerca de 75 mg de ferro por quilo de peso corporal, dois terços desse valor estão presentes nas células vermelhas do sangue. Durante os primeiros dois meses de vida, há uma diminuição acentuada na concentração de hemoglobina com consequente aumento dos depósitos de ferro. Estes depósitos são posteriormente mobilizados para fornecimento de ferro para as necessidades de crescimento e para repor as perdas, portanto, durante este período há uma exigência mínima de ferro da dieta. Nos primeiros 4 a 6 meses de vida, no entanto, os estoques de ferro diminuem significativamente e a criança precisa de um ingestão dietética generosa de ferro. Durante o primeiro ano de vida, uma criança triplica o peso do seu corpo e dobra seus depósitos de ferro (WHO, 1989).

#### 2.4.1 Metabolismo

O ferro utilizado pelo organismo pode ser obtido de duas fontes principais: dieta e reciclagem de hemácias senescentes. Uma dieta normal contém de 13 a 18 mg de ferro, dos quais somente 1 a 2 mg serão absorvidos na forma inorgânica ou na forma heme. Esta absorção pode ocorrer em qualquer local do intestino delgado, porém é mais eficiente no duodeno, que apresenta estruturas vilosas para ampliar a superfície de absorção (SILVA; MURA, 2011). Alguns fatores podem favorecer a absorção intestinal do ferro, como a acidez e a presença de agentes solubilizantes, como açúcares. Além disso, a quantidade de ferro absorvida é regulada pela necessidade do organismo. Desta forma, em situações em que há falta de ferro ou aumento da necessidade, como por exemplo, na gravidez, puberdade ou hemólise, ocorre maior absorção de ferro. Para responder a essa maior demanda, há uma maior expressão das proteínas envolvidas na absorção do ferro, como a proteína transportadora de metal divalente (DMT-1) e a ferroportina (FPT) (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2006).

A captação do ferro solúvel no lúmen intestinal é feita pela membrana apical do enterócito, e é mediada pela DMT-1, no caso de ferro não-heme (MAHLERA; SHULERB; GLAHNC, 2009). A DMT-1, também conhecida como Nramp2, é composta por 12 segmentos transmembrana e, além do ferro, transporta  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ . Para exercer sua função, a DMT-1 necessita que o ferro tenha sido convertido de  $Fe^{3+}$

para  $\text{Fe}^{2+}$ , este processo é mediado pela redutase citocromo b duodenal (Dcytb) (GROTTO, 2010).

A absorção de ferro heme ocorre por um mecanismo diferente do ferro não heme, mecanismo este ainda não bem esclarecido. No entanto, aparentemente, a internalização é feita pela proteína transportadora do heme-1 (HCP1), localizada na membrana apical das células do duodeno (GROTTO, 2010).

O heme liga-se à proteína transportadora presente na membrana da borda em escova dos enterócitos duodenais e então, essa proteína atravessa intacta a membrana plasmática, importando o heme extracelular. Em seguida, o heme encontra-se ligado à membrana de vesículas no citoplasma da célula. A HCP1 pode também ser expressa em outros locais como o fígado e rins e sua regulação é feita de acordo com o nível de ferro intracelular. Assim, na deficiência de ferro, a HCP1 se redistribui do citoplasma para a membrana plasmática das células duodenais. Ao passo que, em condições de excesso de ferro a redistribuição se dá a partir da borda em escova da célula para o seu citoplasma. Esse mecanismo regulador pós-tradução da proteína é importante, pois, de um lado, aproveita o heme da dieta antes que ele seja eliminado pelo peristaltismo do intestino e, por outro, evita a captação desnecessária de ferro e o seu acúmulo iminente. A hipóxia também induz a síntese da HCP1, facilitando a captação de heme quando há maior necessidade do organismo (KRISHNAMURTHY; XIE; SCHUETZ, 2007).

Ao chegar ao interior da célula, o ferro é liberado da protoporfirina pela heme oxigenase, e após ser liberado, fará parte do mesmo pool de ferro não heme, sendo armazenado na forma de ferritina ou liberado do enterócito para o sangue. O ferro é exportado da célula para o plasma pela FPT, também conhecida como IREG1 (PIETRANGELO, 2004). Assim como a DMT-1, a FPT também é seletiva para o ferro na forma  $\text{Fe}^{2+}$ , porém como a transferrina sérica tem grande afinidade pelo ferro na forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ), o  $\text{Fe}^{2+}$  externalizado pela FPT deve ser oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$ . A hefaestina, uma oxidase semelhante à ceruloplasmina sérica, promove essa conversão. Assim, mutações que inativem a FPT ou a hefaestina podem levar a um prejuízo na absorção e acúmulo de ferro no enterócito e nos macrófagos (GROTTO, 2010).

O ferro é estocado nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e medula óssea, nas formas de ferritina (forma solúvel de armazenamento) e hemossiderina. A ferritina livre de ferro é chamada de apoferritina. Seu núcleo central pode abrigar até 4.500 átomos de ferro na forma de hidroxifosfato férrico. Assim, a ferritina contém e mantém os átomos de ferro que poderiam formar agregados de precipitados tóxicos. As quantidades de ferritina no sangue estão fortemente relacionadas aos estoques de ferro do organismo, o



que torna esta medida uma ferramenta importante para a avaliação clínica do estado nutricional de ferro (FAIRBANKS; BEUTLER, 2001; KRAUSE, 2010).

Devido à associação da ferritina com os estoques de ferro, muitos estudos de biodisponibilidade de ferro tem utilizado esta proteína, com o intuito de prever o acúmulo de ferro pelo organismo. Assim, esses estudos têm encontrado concentrações maiores de ferritina hepática em animais que recebem dietas com maiores concentrações de ferro ou que possuem alimentos com maior quantidade de ferro biodisponível (TAKO *et al.*, 2013; SONNWEBER *et al.*, 2012; TAKO; BLAIR; GLAHN, 2011).

A ferritina degradada corresponde à hemossiderina, nesta a concha proteica está parcialmente desintegrada, permitindo que o ferro forme agregados. Pode ser visualizada à microscopia óptica após a coloração com azul da Prússia ou reação de Perl, em que a hemossiderina é corada com ferrocianeto de potássio na presença de ácido clorídrico (FAIRBANKS; BEUTLER, 2001). Este método pode ser utilizado para avaliar a presença de ferro em tecidos, como o do fígado e baço (SONNWEBER *et al.*, 2012).

#### 2.4.2 Homeostase

A homeostase do ferro é promovida por dois mecanismos principais, um intracelular, de acordo com a quantidade de ferro que a célula dispõe, e o outro sistêmico, em que a hepcidina tem papel essencial (GROTTO, 2010).

A eficiência da absorção do ferro não heme parece ser controlada pela mucosa intestinal, que permite que certas quantidades de ferro entrem no sangue, através do *pool* de ferritina citosólica, em resposta a necessidade do organismo. A hepcidina, um pequeno hormônio peptídeo produzido pelo fígado, atua na célula mucosa, inibindo a absorção de ferro pelos enterócitos e a liberação de ferro pelos macrófagos. Isso é possível, pois este hormônio se liga à ferroportina, o que resulta na degradação desta proteína e consequente bloqueio da exportação de ferro para a corrente sanguínea. A quantidade de hepcidina produzida pelo fígado está relacionada com a quantidade de ferro armazenada nesse órgão. Desta forma, a síntese de hepcidina é induzida por uma sobrecarga de ferro (FRAZER; ANDERSON, 2005; NEMETH *et al.*, 2004).

Nicolas e colaboradores (2002) avaliaram a ligação da hepcidina com o metabolismo do ferro e verificaram que camundongos deficientes de hepcidina desenvolviam sobrecarga de ferro, especialmente no fígado, pâncreas e coração, no entanto apresentavam depleção de ferro nos macrófagos. Por outro lado, animais que superexpressavam a hepcidina apresentavam anemia microcítica-hipocrômica ao nascimento e morriam rapidamente. De forma complementar, Sonnweber e colaboradores

(2012) encontraram níveis de mRNA de hepcidina no fígado mais elevados em ratos que receberam suplementação de ferro em comparação com ratos que recebiam doses normais desse mineral, indicando uma homeostase do metabolismo do ferro, a fim de reduzir a absorção intestinal do ferro.

O efeito da hepcidina sobre o estado de ferro também foi avaliada em um estudo de Rivera e colaboradores (2005), que verificou que a ativação da expressão de hepcidina reduziu os níveis plasmáticos de ferro em um prazo de cerca de 6 horas. Uma resposta ainda mais rápida foi vista após a administração parenteral de hepcidina-25 (forma bioativa) recombinante em camundongos. A diferença de tempo de resposta representa o tempo necessário para ativar a transcrição, tradução e modificações pós-traducionais do peptídeo, e sua secreção, antes de produzir algum efeito.

A síntese de diversas proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro pode sofrer modulação da transcrição, estabilidade do mRNA, tradução e modificações pós-traducionais. Tais alterações estão diretamente ligadas a quantidade de ferro intracelular. Assim, a regulação da síntese dessas proteínas é responsável pela habilidade do intestino adaptar a absorção de ferro de acordo com a demanda e o estado de ferro intracelular (HENTZE *et al.*, 2004).

Desta forma, muitos estudos que avaliam a biodisponibilidade de ferro tem utilizado a expressão de mRNA dessas proteínas - especialmente da DMT-1, Dcytb, Ferroportina - nos enterócitos do duodeno (principal local de absorção do ferro), a fim de avaliar a absorção de ferro pelo organismo. Esses estudos encontram menores níveis de mRNA dessas proteínas no duodeno de animais que recebem dietas com suplementação com ferro ou com alimentos com maior concentração de ferro biodisponível. Isso ocorre como uma forma do organismo aumentar a captação celular de ferro e, sua subsequente exportação para a circulação, em situação de deficiência de ferro dietético (SONNWEBER *et al.*, 2012; TAKO *et al.*, 2013; TAKO; BLAIR; GLAHN, 2011).

Na tabela abaixo encontram-se as principais proteínas envolvidas no metabolismo do ferro e suas funções.

**Tabela 1:** Principais proteínas envolvidas no metabolismo de ferro e suas funções.

PROTEÍNA	FUNÇÃO
DMT-1 (Transportador de metal divalente-1)	Importa Fe reduzido ( $Fe^{2+}$ ) para o citoplasma
Dcytb (Citocromo duodenal B)	Ferorredutase
Ferritina	Armazena Fe oxidado ( $Fe^{3+}$ )
Ferroportina	Exporta Fe reduzido ( $Fe^{2+}$ )
Hefaestina	Ferroxidase
Transferrina (Tf)	Transporte plasmático de Fe oxidado ( $Fe^{3+}$ )
Receptor de transferrina (TfR)	Liga-se à HFE e Tf diférrica; modula a captação de ferro
HFE (Proteína alterada na hemocromatose)	Liga-se ao TfR; modula síntese de hepcidina
Hepcidina	Hormônio regulador

Fonte: Adaptado de Oates, 2007.

## 2.5 Vitamina A e sua interação com o metabolismo de ferro

A vitamina A tem atuação em diversas áreas do organismo, participando no processo de crescimento e desenvolvimento, assim como na manutenção de tecidos epiteliais, reprodução, participação no sistema imunológico e principalmente no funcionamento do sistema visual. A deficiência de vitamina A desencadeia a xeroftalmia, que consiste na dificuldade na visão noturna, podendo levar à cegueira (AMBRÓSIO *et al.*, 2006).

A interação entre ferro e vitamina A foi primeiramente demonstrada em um estudo que verificou que a deficiência da vitamina A resulta em anemia moderada, resposta imune fraca e dificuldade no reparo a danos epiteliais, tanto em animais quanto em humanos (AMENY *et al.*, 2002). Além disso, estudos têm mostrado que em indivíduos que sofrem de deficiência de vitamina A o ferro não é adequadamente incorporado pelas células vermelhas do sangue como em indivíduos saudáveis (WALCZYK *et al.*, 2003). Em ratos com deficiência de vitamina A, a absorção de ferro pela medula óssea e a incorporação de eritrócitos, regulada pelo ácido retinóico, são prejudicados (SIJTSMA, 1993).

Gondim e colaboradores (2012) evidenciaram uma maior vulnerabilidade à anemia nas crianças que apresentaram menores níveis de retinol sérico. Embora sejam fortes as evidências da associação entre ferro e vitamina A, os mecanismos para explicá-

la ainda são obscuros. Há evidências de que essa correlação deva-se ao benefício causado pela vitamina A sobre a eritropoese, além da prevenção de infecções e aumento da absorção de ferro (THURNHAM *et al.*, 2003; SEMBA, 1998). É provável, ainda, que a vitamina A atue na mobilização do ferro dos estoques dos tecidos orgânicos, favorecendo a disponibilidade do ferro na hematopoiese e na síntese de hemoglobina (SEMBA, 2002).

No que diz respeito à redução na frequência de infecções promovida pela vitamina A, esta redução poderia permitir um aumento na concentração da transferrina e melhoria do estado nutricional do ferro (NORTHROP-CLEWES, 1996). A outra hipótese é que a vitamina A aumente a absorção de ferro. Esta ideia é reforçada por um estudo de Garcia-Casal e colaboradores (1998) que demonstrou aumento da absorção de ferro não heme de cereais em adultos anêmicos, utilizando-se doses de vitamina A ou betacaroteno. Os autores apontam que esse resultado poderia ser decorrente da prevenção dos efeitos inibitórios dos fitatos e polifenóis sobre a absorção do ferro.

Em consonância com esses resultados, Mwanri e colaboradores (2000), em um estudo duplo-cego, realizado em 136 escolares anêmicos, revelaram que a suplementação com ferro e vitamina A, administrados isoladamente ou em combinação, proporcionou efeitos benéficos sobre o estado anêmico dos escolares, comprovado pelo aumento dos níveis de hemoglobina. Os possíveis mecanismos para essa melhoria incluem aumento da absorção do ferro, redução de infecções e aumento da eritropoiese. Além destes, os autores sugerem a formação de um complexo de vitamina A e ferro não-heme, mantendo-o solúvel no lúmen intestinal e prevenção dos efeitos inibidores da absorção de ferro.

Resultados semelhantes também foram encontrados em um estudo duplo-cego, randomizado, realizado em 81 escolares, aos quais foram administradas uma suplementação de vitamina A (200000 UI), ou placebo. Houve aumento dos níveis de hemoglobina e redução da anemia, de 54% dos escolares para 38%. Além disso, aumentou o volume corpuscular médio e reduziram os receptores de transferrina, o que indica maior eritropoiese dependente do ferro. A suplementação com vitamina A reduziu a ferritina sérica, sugerindo uma mobilização dos estoques de ferro hepático (ZIMMERMANN *et al.*, 2006).

Alternativamente, foi sugerido que a alta prevalência de infecções, frequentemente detectadas durante a deficiência de vitamina A, seja indiretamente responsável pela baixa concentração de hemoglobina, uma vez que o organismo sequestra o ferro durante o processo de infecção (THURNHAM, 1993).

Arruda e colaboradores (2009), avaliaram ratos deficientes em vitamina A e ratos deficientes em vitamina A e ferro. Os animais deficientes em vitamina A apresentaram

aumento do mRNA de hepcidina no fígado e aumento das concentrações de ferro no baço. Ao passo que, nos ratos deficientes em ambos, vitamina A e ferro, apresentaram inibição da expressão de hepcidina hepática e aumento significativo dos níveis de mRNA da proteína DMT-1, sugerindo, que a vitamina A mantém a homeostase de ferro por meio da modulação da expressão de hepcidina hepática.

A deficiência de vitamina A promove o acúmulo do ferro nos tecidos e, conseqüentemente, aumenta a sua disponibilidade para a catálise de reações de oxidação, como a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Assim, o fenótipo apresentado na deficiência de vitamina A é similar ao de indivíduos portadores de hemocromatose (acúmulo de ferro em tecidos) (ARRUDA *et al.*, 2009).

A vitamina A e o  $\beta$ -caroteno aumentam a absorção do ferro não-heme por formar complexos solúveis e prevenir o efeito inibidor dos fitatos e polifenóis durante a absorção do ferro (GARCIA-CASAL *et al.*, 1998). Machado, Canniatti-Brazaca e Piedade (2006), estudando mistura com ovos, cenoura e couve, constataram que houve aumento na disponibilidade de ferro, principalmente devido ao maior teor de  $\beta$ -caroteno, que influencia positivamente para esse aumento, considerando os alimentos utilizados no estudo.

## **2.6 Estratégias para o combate da fome oculta**

Esforços globais para reduzir a incidência dessas carências nutricionais têm sido amplamente direcionados para o consumo crescente de suplementação de micronutrientes por meio da fortificação e biofortificação de alimentos. Acredita-se que, a ação conjunta da comunidade científica, industrial e governo seja uma solução viável para minimizar este problema, buscando alternativas para sua implementação (NUTTI; CARVALHO; WATANABE, 2006).

Programas de fortificação de alimentos são muitas vezes referidos como intervenções baseadas em alimentos a fim de reduzir a fome. Esta técnica consiste na adição de vitaminas e minerais (fortificantes) em alimentos comuns (veículos alimentares), como a farinha de trigo, farinha de milho, arroz, açúcar e óleo. Para esta intervenção ser eficaz, é importante escolher o veículo alimentar com cuidado de forma a garantir que o alimento seja consumido localmente por grande parte da população deficiente. A fortificação pode ser parte de uma estratégia baseada em alimentos, mas deve ser complementada com a educação nutricional para aumentar a demanda de alimentos fortificados em conjunto com outras intervenções que visem o aumento da diversidade e qualidade da dieta (BURCHI; FANZO; FRISON, 2011).

As políticas destinadas a diminuir a ocorrência de deficiência de ferro compreendem principalmente o uso de aditivos alimentares de ferro para as populações em situação de risco, a fortificação de alimentos e a diversificação da dieta. No entanto, estas estratégias tiveram um sucesso limitado, principalmente em países pobres. Entretanto, há limites para a fortificação e o fornecimento de suplementos comerciais. É possível que alimentos fortificados não alcancem uma grande parte da população necessitada devido à insuficiente infraestrutura de distribuição. Do mesmo modo, a suplementação depende de um sistema de saúde com infraestrutura altamente funcional, raramente encontrada em países em desenvolvimento. Assim a biofortificação é uma alternativa atraente para a fortificação ou diversificação da dieta (TAKO; BLAIR; GLAHN, 2011).

A introdução de produtos agrícolas biofortificados – variedades melhoradas que apresentam um conteúdo maior de minerais e vitaminas – complementar as intervenções em nutrição existentes e proporcionará uma maneira sustentável e de baixo custo para alcançar as populações com limitado acesso aos sistemas formais de mercado e de saúde.

A biofortificação refere-se ao uso de práticas de criação de culturas tradicionais ou biotecnologia moderna para aumentar a concentração de micronutrientes nas culturas. Este tipo de intervenção visa reduzir as deficiências de micronutrientes específicos de uma população-alvo. Estudos anteriores têm demonstrado sucesso. Em Moçambique, a produção, acesso e consumo de batata-doce biofortificada foi promovido para combater a deficiência de vitamina A em crianças. O acesso dos agricultores a batata-doce e raízes aumentou, o conhecimento de nutrição melhorou e a demanda por este produto aumentou. A ingestão de vitamina A aumentada foi, em grande parte, devido ao aumento da ingestão da batata-doce biofortificada. Além disso, as concentrações de retinol sérico aumentaram em crianças de comunidades rurais (BURCHI; FANZO; FRISON, 2011).

A biofortificação de culturas de alimentos básicos é uma nova abordagem de saúde pública para controlar a deficiência de vitamina A, ferro e zinco em países pobres (NESTEL *et al*, 2006). Os alimentos biofortificados podem não oferecer altas concentrações de minerais e vitaminas por dia como os suplementos ou alimentos fortificados industrializados, mas podem ajudar a melhorar o estado nutricional dos indivíduos pelo aumento da adequação diária de micronutrientes (BOUIS *et al.*, 2011).

Esta estratégia fornece um meio viável de alcançar populações rurais mal nutridas que, muitas vezes, tem acesso limitado a diversos suplementos dietéticos e alimentos fortificados. Além disso, ao contrário dos suplementos e alimentos fortificados que

alcançam primeiramente os centros urbanos, os alimentos biofortificados alcançam primeiro as áreas rurais (SALTZMAN *et al.*, 2013).

Recentemente, a *HarvestPlus*, uma aliança de instituições de pesquisa, lançou um esforço global para reduzir a deficiência de micronutrientes por meio da biofortificação (NESTEL *et al.*, 2006). O programa de biofortificação HarvestPlus lidera uma aliança interdisciplinar global de instituições de pesquisa e agências de aplicação no esforço de biofortificação. Neste programa, a principal atividade é o melhoramento de plantas do Grupo de Cultivo em Centros Internacionais de Pesquisa Agrícola e Serviços Nacionais de Investigação e Extensão Agrícola. Essas culturas incluem feijão, mandioca, milho, arroz, batata-doce e trigo, e tem a finalidade de desenvolver variedades que combinem as melhores características nutricionais e agronômicas em cada cultura.

Assim, bancos de germoplasma de plantas filiados a HarvestPlus selecionam variedades de culturas ricas em Fe, Zn, e/ou beta-caroteno. Os germoplasma promissores são cruzados com variedades comerciais, que são de alto rendimento e agronomicamente adequadas para uma determinada região. Em última análise, as sementes dessas culturas biofortificadas serão distribuídas aos agricultores, que irão plantá-las e produzir alimentos com maior valor nutricional para as famílias e mercados locais (TAKO *et al.*, 2009).

No Brasil, as atividades dos projetos de biofortificação HarvestPlus, AgroSalud e BioFORT são coordenadas pela Embrapa, onde são pesquisados: arroz, feijão, batata doce, mandioca, milho, feijão-caupi, trigo e abóbora. As Unidades da Embrapa pesquisam: mandioca, batata doce e abóbora com maior teor de carotenoides; milho com maiores teores de lisina, triptofano e pró-vitamina A; arroz, feijão, milho, trigo e feijão-caupi com teores mais elevados de ferro e zinco; e produtos extrusados e de panificação a partir de farinhas biofortificadas (NUTTI, 2006).

Os alimentos contemplados no programa *Harvest-Plus* já são largamente produzidos e consumidos no Brasil, o que significa que agricultores e consumidores não precisam mudar seus hábitos alimentares para se beneficiar da biofortificação. Além disso, o aumento do conteúdo de minerais não deve necessariamente alterar a aparência, o sabor, a textura ou a qualidade culinária do alimento (NUTTI; CARVALHO; WATANABE, 2006).

O aumento da concentração de um micronutriente em um alimento por si só não garante melhoria do estado nutricional das pessoas com deficiências de micronutrientes que consumirem esse alimento. Isso ocorre porque nem todo micronutriente em um alimento é biodisponível em uma refeição tradicional. Vários fatores genéticos e

ambientais interagem, podendo reduzir os níveis de micronutrientes biodisponíveis nos alimentos (GRAHM; WELCH, 1996).

## 2.7 Biodisponibilidade de ferro

A biodisponibilidade é a fração de um nutriente que está disponível para a utilização em processos metabólicos ou para armazenamento (ARGYRI *et al.*, 2011). Salvo algumas exceções, somente uma pequena proporção do total de nutrientes ingeridos na dieta são utilizados pelo organismo (MARTINEZ *et al.*, 1999). O termo biodisponibilidade, relacionado ao ferro, é a medida da fração do ferro alimentar capaz de ser absorvida pelo trato gastrointestinal e, subsequentemente armazenada e incorporada ao heme (BIANCHI *et al.*, 1992).

A biodisponibilidade de ferro depende do tipo de alimento ingerido e da interação entre este mineral e outros nutrientes presentes no alimento. A carne de gado bovino, peixes, aves, vísceras e embutidos contem o ferro heme derivado da hemoglobina e mioglobina, por isso apresenta alta biodisponibilidade, sendo absorvido pela mucosa intestinal cerca de 10 a 30% do valor ingerido. Já os alimentos de origem vegetal (cereais, leguminosas e tubérculos) contêm o ferro não heme, apresentando, assim, biodisponibilidade variável, geralmente baixa (SANTOS *et al.*, 2004).

O ferro heme é mais eficientemente absorvido do que o ferro inorgânico da dieta, pois é solúvel no pH do intestino delgado. A maior parte do ferro inorgânico, ou seja, ferro não heme da dieta, está presente no alimento na forma  $Fe^{3+}$ , sendo menos absorvido pelo organismo (MAHLERA, SHULERB, GLAHNC, 2009).

Existe uma grande quantidade de compostos que podem aumentar a absorção de ferro pelo organismo, como os ácidos orgânicos citrato, malato e lactato, porém o mais efetivo é o ácido ascórbico. Este age principalmente no estômago e duodeno (HURRELL, 2002), aonde tem efeito redutor, prevenindo a formação de hidróxido férrico insolúvel, e a capacidade de formar complexos solúveis com íons férricos, matendo-se a solubilidade em pH alcalino no duodeno (MARTINEZ *et al.*, 1999). Argyri e colaboradores (2009), em um estudo in vitro para analisar a biodisponibilidade de ferro nos alimentos, também observou que o ácido ascórbico favoreceu a formação de metais ferrosos e o total de ferro dialisável.

Por outro lado, alguns fatores intraluminais podem afetar negativamente a quantidade de ferro absorvida. Entre esses, pode-se citar os fatores antinutricionais, tais como o ácido oxálico, o ácido fítico e polifenóis (por exemplo, taninos), que podem



formar precipitados, quelatos insolúveis ou macromoléculas que diminuem a absorção do ferro (MOURA; CANNIATTI-BRAZACA, 2006).

Em geral, somente uma pequena parte do ferro ingerido é absorvido, porém essa quantidade pode variar inter e intraindividualmente. A necessidade corporal de ferro é o fator mais importante que regula a absorção deste mineral, sendo que quanto menor a reserva de ferro no organismo maior a absorção corporal de ferro, e vice-versa (MARTINEZ *et al.*, 1999). Este fato também foi observado por Reddy e colaboradores (2000), que em um estudo para estimar a biodisponibilidade de ferro não-heme da dieta, concluíram que fatores fisiológicos contribuem com a maior parte da variação da absorção de ferro da dieta, em contrapartida os fatores dietéticos dão uma pequena contribuição para a determinação da quantidade de ferro absorvida.

Em determinados estados fisiológicos a necessidade de ferro é maior, alterando o padrão absorptivo do organismo, como por exemplo, nas fases de crescimento (infância e adolescência) e gestação. Situações de deficiência nutricional de ferro também aumentam o potencial absorptivo do ferro e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade. Em contraponto, situações de baixa acidez gástrica podem levar à menor solubilidade do ferro, reduzindo, assim, sua biodisponibilidade (FAIRWEATHER-TAIT, 1997).

Devido à importância de se avaliar a biodisponibilidade de ferro dos alimentos, muitos estudos têm sido feitos nesse sentido. Prom-u-thai e colaboradores (2009) avaliaram a biodisponibilidade de ferro em arroz parbolizado fortificado com este mineral, usando a técnica de digestão *in vitro* com cultura de células Caco-2. Nesse estudo foi verificado que a quantidade de ferro biodisponível correlacionou-se positivamente com o aumento do nível de ferro nos grãos de arroz parbolizado, independentemente de cultivares. Isto sugere um elevado potencial de eficácia do arroz enriquecido com ferro para melhorar o estado nutricional desse mineral em dietas humanas. No entanto, os métodos *in vitro* não podem reproduzir as interações (por exemplo, a liberação de fatores intrínsecos) que ocorrem entre células da mucosa intestinal e os constituintes dos alimentos (WELCH *et al.*, 2000).

A eficácia do consumo de arroz biofortificado com ferro também foi verificada por um estudo *in vivo* com 192 mulheres jovens, que receberam o arroz biofortificado e arroz comum. Foi observada maior concentração de ferritina, no grupo que recebeu arroz biofortificado, no entanto os níveis de hemoglobina não apresentaram diferença significativa. Além disso, o aumento da ferritina foi mais acentuado nas mulheres que não apresentavam anemia no início do estudo (HAAS *et al.*, 2005).

Além do arroz, o milho geneticamente modificado também tem sido avaliado quanto à biodisponibilidade de ferro. Tako e colaboradores (2013) avaliaram a biodisponibilidade de ferro de variedades de milho geneticamente modificadas, de forma que, as variedades fossem geneticamente semelhantes, porém com uma alteração no *locus* que determina a biodisponibilidade do ferro. Assim, criou-se uma variedade com alta biodisponibilidade (HB) e outra com baixa biodisponibilidade (LB). O ensaio biológico foi realizado em aves (*Gallus gallus*). Foram verificadas maiores concentrações de hemoglobina e ferritina hepática no grupo que recebeu dieta HB do que o que recebeu dieta LB. Além disso, ao avaliar a expressão de mRNA de DMT1, DcytB e ferroportina, verificou-se aumento dos níveis de mRNA dessas proteínas no grupo em dieta LB, indicando uma adaptação à baixa biodisponibilidade de ferro da dieta. De forma semelhante, nesse mesmo estudo, ao realizar ensaio *in vitro*, com células Caco-2, foi observada maior biodisponibilidade da variedade de milho HB.

Na mesma linha de pesquisa da biodisponibilidade de ferro de alimentos biofortificados, Tako, Blair, Glahn (2011) realizaram um ensaio biológico em aves (*Gallus gallus*) para comparar a biodisponibilidade do ferro em feijões biofortificados e convencionais. Assim, verificaram maiores concentrações de hemoglobina e ferritina hepática no grupo que recebeu o feijão biofortificado. Em contrapartida, esses animais apresentaram menores níveis de mRNA de DMT-1, Dcytb e Ferroportina no duodeno. Como uma forma do organismo aumentar a captação celular de ferro e compensar a deficiência de ferro dietético. Da mesma forma, ao realizar o estudo *in vitro*, com células Caco-2, foi observada maior biodisponibilidade de ferro do feijão biofortificado.

Corroborando com o estudo já citado, Tako e colaboradores (2009) utilizaram ensaio biológico em porcos com deficiência de ferro induzida, para avaliar a biodisponibilidade de ferro de feijão biofortificado em comparação com o convencional, por meio da capacidade de regeneração da hemoglobina. Os animais que receberam a dieta com feijão biofortificado tiveram um ganho significativamente maior de hemoglobina do que os com a dieta contendo feijão convencional. Este resultado mostra que o feijão biofortificado pode melhorar o estado nutricional de ferro em porcos deficientes, mesmo quando como parte de uma dieta completa. Os autores concluíram que o feijão biofortificado é um veículo promissor para o aumento da ingestão de ferro biodisponível em populações humanas, em que o feijão é um alimento básico e que contêm níveis relativamente altos de ferro biodisponível (TAKO *et al.*, 2009).

Muitas técnicas de biodisponibilidade do ferro utilizam tanto radioisótopos como isótopos estáveis de ferro, incorporados em uma refeição para determinar a

biodisponibilidade do ferro (VAN CAMPEN; GLAHN, 1999). Nesse sentido, Welch e colaboradores (2000) avaliaram a biodisponibilidade de ferro em ratos que receberam dietas com arroz e feijão enriquecidos com <sup>59</sup>Ferro. Foi observada uma biodisponibilidade significativamente maior em ambos, arroz e feijão. Embora o modelo de rato não seja ideal para a determinação da biodisponibilidade de ferro em seres humanos (pois os ratos são muito mais eficientes para absorver o ferro de fontes vegetais que os seres humano), eles podem ser utilizados para se ter estimativas relativas de ferro biodisponível em alimentos (WELCH *et al*, 2000).

## **2.8 Alimentos biofortificados e hábitos alimentares**

A mistura arroz e feijão é uma combinação rica em carboidrato e fornece uma importante complementação proteica na dieta. O arroz é pobre em lisina, mas é uma excelente fonte de aminoácidos sulfurados, como metionina e cistina, em contrapartida o feijão é, relativamente rico na maioria dos aminoácidos essenciais, especialmente em lisina, no entanto é pobre em cistina e metionina. Assim, a combinação de ambos fornece proteína de boa qualidade (FERNANDES, SOUZA, NAVES, 2011; CASTRO, 1999).

Outro alimento de grande relevância na dieta de populações sujeitas a restrição alimentar é a batata-doce. É uma cultura olerácea com potencial de uso na alimentação humana, pois é fonte de calorias, vitaminas A, C, do complexo B e minerais. Além disso, suas raízes apresentam cálcio, potássio e teor de carboidratos variando entre 25% e 30%, dos quais 98% são facilmente digeríveis (TAKEITI, 2009). Um dos principais componentes da raiz da batata-doce é o amido, seguido dos açúcares mais simples: sacarose, glicose, frutose e maltose. Suas raízes possuem níveis elevados de polifenóis, entre os quais antocianinas e ácidos fenólicos, que possuem excelentes propriedades antioxidantes e antimutagênicas. Por estas características a batata-doce é um bom meio de fortificação (SILVA *et al.*, 2004).

As batatas-doce de coloração alaranjada são mais ricas em carotenóides (pigmento amarelo-alaranjado presente em vários alimentos) em comparação com as que apresentam coloração branca (SILVA *et al.*, 2004). O consumo per capita de batata-doce no Brasil é em média de 2,5g/dia (POF, 2008-2009).

Já a abóbora, do ponto de vista nutricional, é rica em vitaminas do complexo B, vitamina C e outros nutrientes, como proteínas, carboidratos, gorduras, fibras alimentares e minerais, como o ferro, cálcio, magnésio e potássio. Além disso, possui bioflavonóides, bloqueadores de receptores dos hormônios estimulantes do câncer e esteróis. Também é rica em beta-caroteno e licopeno, antioxidantes precursores da vitamina A. Essa

característica, torna a abóbora um alimento importante, especialmente para populações que apresentam altos índices de hipovitaminose A (EÇA *et al.*, 2007).

## 2.9 Referências

- AITKEN, R.J.; ROMAN, S.D. Antioxidant Systems and Oxidative Stress in the Testes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.1, p.15-24, 2008.
- ALFÉREZ, M.J.M. et al. Development of nutritional iron deficiency in growing male rats: haematological parameters, iron bioavailability and oxidative defence. **British Journal of Nutrition**. v. 105, p. 517-525, 2011.
- ALLEN, L.H.; PEERSON, J.M.; OLNEY, D.K.; Provision of multiple rather than two or fewer micronutrients more effectively improves growth and other outcomes in micronutrient-deficient children and adults. **The Journal of Nutrition**, v.139, p.1022-1030, 2009.
- AMBRÓSIO, C.L.B.; CAMPOS, F.D.A.C.; FARO, Z.P.D. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v.19(2), p.233-243, 2006.
- AMENY, M.A.; RAILA, J.; WALZEL, E.; SCHWEIGERT, F.J. Effect of Iron and/or Vitamin A Re-supplementation of Vitamin A and Iron Status of Rats After a Dietary Deficiency of Both Components. **Journal of Trace Elements**. N.16, p. 175-178, 2002.
- ANDREWS, N.C. A genetic view of iron homeostasis. **Seminars in Hematology**. v.39, n.4, p.227-234, 2002.
- ARGYRI, K.; BIRBA, A.; MILLER, D. D.; KOMAITIS, M.; KAPSOKEFALOU, M. Predicting relative concentrations of bioavailable iron in foods using in vitro digestion: New developments. **Food Chemistry**, v.113(2), p.602-607, 2009.
- ARGYRI, K.; THEOPHANIDI, E.; KAPNA, A.; STAIKIDOU, C.; POUNIS, G.; KOMAITIS, M.; GEORGIU, C; Kapsokefalou, M. Iron or zinc dialyzability obtained from a modified in vitro digestion procedure compare well with iron or zinc absorption from meals. **Food chemistry**, v.127(2), p.716-721, 2011.
- ARIZA-NIETO, M.; BLAIR, M.W.; WELCH, R.M.; GLAHN, R.P. Screening of Iron Bioavailability Patterns in Eight Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes Using the Caco-2 Cell in Vitro Model, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.7950-7956, 2007.
- ARRUDA, S.F.; SIQUEIRA, E.M.A.; VALÊNCIA, F.F. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress by iron tissues overload. **Nutrition**. v.25, p.472-478, 2009.
- BIANCHI, M. L. P.; SILVA, H. C.; OLIVEIRA, J. E. D. Considerações sobre a biodisponibilidade do ferro do alimentos. **Archivos Latino-americanos de Nutricion**, Caracas, v. 42, n. 2, p. 94-100, 1992.
- BLOEM, M. W.; SEMBA, R. D.; KRAEMER, K. Castel Gandolfo Workshop: na introduction to the impacto of climate change, the economic crisis, and the increase in the food prices on malnutrition. **The Journal of Nutrition**, v. 140, p. 132S-135S, 2010.
- BOUIS, H.E.; HOTZ, C.; MCCLAFFERTY, B.; MEENAKSHI, J.V.; PFEIFFER, W.H. Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 11, p.31-40, 2011.
- BRESSANI, R.; ELIAS, L. G. All vegetable protein mixtures for human feeding. **Journal of Food Science**, v.31, p. 626-630, 1983.

- BURCHI, F. Child Nutrition in Mozambique in 2003: The Role of Mother's Education and Nutrition Knowledge. **Economics e Human Biology**, v.8, p. 331-345, 2010.
- BURCHI, F.; FANZO, J.; FRISON, E. The Role of Food and Nutrition System Approaches in Tackling Hidden Hunger, **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.8, p.358-373, 2011.
- CARBONARO, M.; MASELLI, P.; NUCARA, A. Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. *Amino Acids*, v.43, p.911-921, 2012.
- CASGRAIN, A. et al. Micronutrient bioavailability research priorities. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 91, p.1423-1429, 2010.
- CASTRO, E.M.; VIEIRA, N.R.A.; RABELO, R.R.; SILVA, S.A. Qualidade de grãos em arroz. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 30 p.
- CINTRA, R.M.G.C.; MAGALHÃES, C.O.; GARCIA, R.R.; MELLO, R.; PADILHA, A.; KUSAI, C.; CAETANO, L. Avaliação da qualidade da proteína de arroz e feijão e de dieta da região sudeste do Brasil, **Alimentos e Nutrição**, v.18, p.283-289, 2007.
- COUTINHO, J. G.; GENTIL, P. C.; TORAL, N. A desnutrição e obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição Malnutrition and obesity in Brazil: dealing with the problem through. **Cadernos Saúde Pública**, v.24, p.332-340, 2008.
- CRUZ, G.A.D.R.; OLIVEIRA, M.G.A.; COSTA, N.M.B.; PIRES, C.V.; CRUZ, R.S.; MOREIRA, M.A. Comparação de digestibilidade protéica *in vitro* e *in vivo* de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenados por 30 dias, **Alimentos e Nutrição**, v.16, p.265-271, 2005.
- DRAGSTED, L.O. Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers. **European Journal of Nutrition**, v. 47 (Suppl 2), p. 3-18, 2008.
- DUNN, L.L.; RAHMANTO, Y.S.; RICHARDSON, D.R. Iron uptake and metabolism in the new millennium. **Trends Cell Biology**, v. 17, p. 93-100, 2007.
- EÇA, K. S.; ROCHA, S. D.; SILVEIRA, E. O. Desidratação, Avaliação da Composição Química e Atividade de Água de Abóbora (*Cucurbita moschata*). II Jornada Nacional da Agroindústria. Bananeiras, 2007.
- FAIRBANKS, V.G.; BEUTLER, E. Iron metabolism. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. *Williams- Hematology*. 6th ed. **New York: McGraw-Hill**; p.295-304, 2001.
- FAIRWEATHER-TAIT SJ. From absorption and excretion of minerals... to the importance of bioavailability and adaptation. **The British Journal of Nutrition**, v. 78, p.95-100, 1997.
- FERNANDES, D.C; SOUZA, E.M; NAVES, M.M.V. Feijão macerado: alternativa para melhorar a qualidade nutricional, **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.32, p.177-184, 2011.
- FRAZER, D.M.; WILKINS, S.J.; BECKER, E.M.; MURPHY, T.L.; VULPE, C.D.; MCKIE, A.T.; et al. A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Iregl

or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. **Gut**, v.52, p.340-346, 2003

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 6-29, 1996.

GARCIA-CASAL, M.N.; LAYRISSE, M. Food iron absorption: role of vitamin A. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. v. 48, n.3, p.191-196, 1998.

GARDNER, G.W.; EDGERTON, V.R.; SENEWIRATNE, B.; BARNARD, R.J.; OHIRA, Y. Physical work capacity and metabolic stress in subjects with iron deficiency anemia. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 30, p.10-917, 1977.

GLAHN, R.P.; LEE, O.A.; YEUNG, A.; GOLDMAN, M.I. Caco-2 Cell ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in an in vitro digestion/ Caco-2 Cell culture model. **The Journal of Nutrition**, v.128, p.1555-1561, 1998.

GONDIM, S.S.R.; DINIZ, A.S.; CAGLIARI, M.P.P.; ARAÚJO, E.S.; QUEIROZ, D.; PAIVA, A.A. Relação entre níveis de hemoglobina, concentração de retinol sérico e estado nutricional em crianças de 6 a 59 meses do Estado da Paraíba. **Revista de Nutrição de Campinas**, v.25, n.4, p.441-449, 2012.

GRAHAM, R.D.; WELCH, R.M. Breeding for staple-food crops with high micronutrient density. Washington, DC: International Food Policy Research Institute, 1996.

GRAHAM, R.D.; WELCH, R.M.; SAUNDERS, D.A.; ORTIZ-MONASTERIO, I.; BOUIS, H.E.; BONIERBALE, M.; DE HAAN, S.; BURGOS, G.; THIELE, G.; LIRIA, R.; MEISNER, C.A.; BEEBE, S.E.; POTTS, M.J.; KADIAN, M.; HOBBS, P.R.; GUPTA, R.K.; TWOMLOW, S. Nutritious subsistence food systems. **Advances in Agronomy**, v.92, p. 1-74, 2007.

GROTO, H.Z.W. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32, p.8-17, 2010.

HAAS, J.D.; BEARD, J.L.; MURRAY-KOLB L.E.; DEL MUNDO A.M.; FELIX, A.; GREGORIO G.B. Iron-biofortified rice improves the iron stores of nonanemic Filipino women. **Journal of Nutrition**, v.135, p.2823-2830, 2005.

HENTZE, M.W.; MUCKENTHALER, M.U.; ANDREWS, N.C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, v.117, p.285-297, 2004.

HERNANDEZ, M.; SOUSA, V.; MORENO, A.; VILLAPANDO, S.; LOPEZ-ALARCON, M. Iron bioavailability and utilization in rats are lower from limetreated corn flour than from wheat flour when they are fortified with different sources of iron. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 154-159, 2003.

HERNÁNDEZ, T.; HERNÁNDEZ, A.; MATÍNEZ, C. Calidad de proteínas. Conceptos y evaluación. **Alimentaria**, v.27, p. 27-37, 1996.

HOFFBRAND, A.V.; PETTIT, F.E.; MOSS, P.A.H. Essential Haematology. 5<sup>a</sup> ed. Oxford (UK): Blackwell Publishing, p. 28-43, 2006.

HURRELL, R. F.; JUILLERAT, M. A.; REDDY, M. B.; LYNCH, S. R.; DASSENKO, S. A.; COOK, J. D. Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.56(3), p.573-578, 1992.

HURTADO, E.K., CLAUSSEN, A.H., SCOTT, K.G. Early childhood anemia and mild or moderate mental retardation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, n.1, p.115-119, 1999.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de orçamento familiar (POF) - 2008-2009. Consumo alimentar médio per capita e percentual de consumo fora do domicílio em relação ao total consumido, por sexo, segundo os alimentos – Brasil 2008-2009.** Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_analise\\_consumo/tabelas\\_pdf/tab\\_1\\_1.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/tabelas_pdf/tab_1_1.pdf). Acesso em: 22 de agosto de 2013.

KANNAN, S.; NIELSEN, S.S.; MASON, A.C. Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores for Bean and Bean-Rice Infant Weaning Food Products, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.5070-5074, 2001.

KENNEDY, G.; PEDRO, M.R.; SEGHERI, C.; NANTEL, G.; BROUWER, I. Dietary diversity score is a useful indicator of micronutrient intake in non breast-feeding Filipino children. **Journal of Nutrition**, v.137, 1-6, 2007.

KRISHNAMURTHY, P.; XIE, T.; SCHUETZ, J.D. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. **Pharmacology e therapeutics**. v.114, n.3, p.345-358, 2007.

LA FRANO, M. R.; DE MOURA, F. F.; BOY, E.; LÖNNERDAL, B.; BURRI, B. J. Bioavailability of iron, zinc, and provitamin A carotenoids in biofortified staple crops. **Nutrition Review**, v.72(5), p.289-307, 2014.

LOOKER, A.C.; COGSWELL, M.E.; GUNTER, M.T. Iron deficiency – United States, 1999–2000. *Morb Mortal Wkly Rep*, v. 51, p.897–899, 2002

LUDWICZEK, S.; THEURL, I.; MUCKENTHALER, M. U.; JAKAB, M.; MAIR, S. M.; THEURL, M.; KISS, J.; PAULMICHL, M.; HENTZE, M.W.; RITTER, M.; WEISS, G. Ca<sup>2+</sup> channel blockers reverse iron overload by a new mechanism via divalent metal transporter-1. **Nature Medicine**. v.13, p.448–454. 2007

LUJÁN, D.L.B.; LEONEL, A.J.; BASSINELLO, P.Z.; COSTA, N.M.B. Variedades de feijão e seus efeitos na qualidade protéica, na glicemia e nos lipídios sanguíneos em ratos, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.142-149, 2008.

MACHADO, S.E.; FERNANDES, R.M.; TALÁ, E.  $\beta$ -Carotene from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves improves vitamin A status in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 146, p. 235-240, 2007.

MAHAN, L. K; ESCOTT-STUMP, S. Krause **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

MAHLERA, G.J.; SHULERB, L.M.; GLAHNC, P.R. Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.20, p. 494-502, 2009.

MARTÍNEZ, C. Biodisponibilidad del hierro de los alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.49, p. 106-113, Caracas, 1999.

MCCLUNG, J.P.; KARL, J.P. Iron deficiency and obesity: the contribution of inflammation and diminished iron absorption. **Nutrition Review**, v.67, p.100–104, 2009.



- MEHDAD, A.; SIQUEIRA, E.M.A., ARRUDA, S.F. Effect of Vitamin A Deficiency on Iron Bioavailability. **Annals of Nutrition and Metabolism**. v. 57, p. 35-39, 2010.
- MENDES, F.Q.; OLIVEIRA, M.G.; COSTA, N.M.; PIRES, C.V.; HOFFMAM, Z.B. Qualidade proteica de diversos alimentos, incluindo diferentes variedades de soja. **Alimentos e Nutrição**, v.20, p. 77-86, 2009.
- MILLWARD, D. J., LAYMAN, D.K., TOMÉ, D., SCHAAFSMA, G. Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, p. 1576S-1581S, 2008.
- MOURA, N.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Avaliação da disponibilidade de ferro de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em comparação com carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos de Campinas**, v.26, p. 270-276, 2006.
- MUTHAYYA, S.; RAH, J.H.; SUGIMOTO, D.J.; ROOS, F.F.; KRAEMER, K.; BLACK, R.E. The Global Hidden Hunger Indices and Maps: An Advocacy Tool for Action, **Plos One**, v.8, p.1-12, 2013.
- MWANRI, L.; WORSLEY, A.; RYA, P.; MASIKA, J. Supplemental Vitamin A Improves Anemia and Growth in Anemic School Children in Tanzania. **The Journal of Nutrition**, p. 2691-2696, 2000.
- NEMETH, E.; TUTTLE, M.S.; POWELSON, J.; VAUGHN, M.B.; DONOVAN, A.; WARD, D.M.; et al. Hcpidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. **Science**, v.306, p.2090–2093, 2004.
- NESTEL, P.; BOUIS, H.E.; MEENAKSHI, J.V.; PFEIFFER, W. Symposium: Food Fortification in Developing Countries: Biofortification of Staple Food Crops. **The Journal of Nutrition**, v.136, p. 1064-1067, 2006.
- NICOLAS, G.; BENNOUN, M.; PORTEU, A.; MATIVET, S.; BEAUMONT, C.; GRANDCHAMP, B.; SIRITO, M.; SAWADOGO, M.; KAHN, A.; VAULONT, S. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, n.7, p.4596-4601, 2002.
- NORTHROP-CLEWES, C.A.; PARACHA, P.I.; MCLOONE, U.J.; THURNHAM DI. Effect of improved vitamin A status on response to iron supplementation in Pakistani infants. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 64, n.5, p.694-699, 1996.
- NUTTI, M.; CARVALHO, J.L.V.; WATANABE, E. A biofortificação como ferramenta para combater as deficiências em micronutrientes. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, Rio de Janeiro, 2006.
- OATES, P.S. The role of hepcidin and ferroportin in iron absorption. **Histology and Histopathology**. v.22, p.791-804, 2007.
- OLIVEIRA, J.E.D. de & VANNUCCHI, H. The protein requirement of Brazilian rural workers studies with a rice and a bean diet. In: RAND, W.M. Proteinenergy requirements of developing countries: results of international research. Tokio, United University, p. 98-114, 1983.
- PALTI, H.; MEIJER, A.; ADLER, B. Learning achievement and behavior at school of anemic and non-anemic infants. **Early Human Development**, v.10, p.217–223, 1985.

- PIETRANGELO, A. The ferroportin disease. **Blood Cells Molecules and Diseases**, v.32, n.1, p.131-138, 2004.
- PROM-U-THAI, C.; GLAHN, R.P.; CHENG, Z.; FUKAI, S.; RERKASEM, B.; HUANG, L. The bioavailability of iron fortified in whole grain parboiled rice, **Food Chemistry**, v.112, p.982-986, 2009.
- REDDY, M.B.; HURRELL, R.F.; COOK, J.D. Estimation of nonheme-iron bioavailability from meal composition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, p. 937-943, 2000.
- RIVERA, S.; NEMETH, E.; GABAYAN, V.; LOPEZ, M.A.; FARSHIDI, D.; GANZ, T. Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. **Blood**, v. 106, p. 2196-2199, 2005.
- SALTZMAM, A.; BIROL, E.; BOUIS, H.E.; BOY, E.; MOURA, F.F.; ISLAM, Y.; PFEIFFER, W.H. Biofortification: Progress toward a more nourishing future. **Global Food Security**, v.2, p. 9-17, 2013.
- SCHNEIDER, J.M.; FUJII, M.L.; LAMP, L.C.; LÖNNERDAL, B.; DEWEY, K.G.; ZIDENBERG-CHERR, S. Anemia, iron deficiency, and iron deficiency anemia in 12–36-mo-old children from low-income families. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.82, p.1269-1275, 2005.
- SEMBA, R.D. The role of vitamin A and related retinoids in immune function. **Nutrition Review**. v.56, S38-S48. 1998;
- SEMBA, R.D.; BLOEM, M.W. The anemia of vitamin A deficiency: epidemiology and pathogenesis. **European Journal of Clinical Nutrition**. v.56, n.4, p.271-281, 2002.
- SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. *Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença*. Manole, 9ª Edição. São Paulo, SP, Brasil, 2003.
- SIJTSMA, K. W.; VAN DEN BERG, G. J.; LEMMENS, A. G.; WEST, C. E.; BEYNEN, A. Iron status in rats fed on diets containing marginal amounts of vitamin A. **British Journal of Nutrition**, v.70, p. 777– 85, 1993.
- SILVA, J. B. C.; LOPES, C. A.; MAGALHÃES, J. S. Cultura da batata-doce (*Ipomoea batatas* L.). Brasília: EMBRAPA-CNPq, 2004. (Sistema de produção, n. 6). Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/sistprod/batatadoce>>. Acesso em: 01 de Agosto de 2013.
- SILVA, S. M. C; MURA, J. P. **Tratado de Alimentação, Nutrição e Dietoterapia**. 2ed.São Paulo: Roca, 2011, p. 107-134.
- SONNWEBER, T.; RESS, C.; NAIRZ, M.; THEURL, I.; SCHROLL, A.; MURPHY, A.T.; WROBLEWSKI, V.; WITCHER, D.R.; MOSER, P.; EBENBICHLER, C.F.; KASER, S.; WEISS, G. High-fat diet causes iron deficiency via hepcidin-independent reduction of duodenal iron absorption, **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.23, p.1600-1608, 2012.
- TAKEITI, C.Y.; ANTONIO, G.C. Batata-doce: potencial para novos produtos alimentícios. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/agronoticias/noticia.php>>. Acesso em 01 de Agosto de 2013.

TAKO, E.; BLAIR, M.W.; GLAHN, R.P. Biofortified red mottled beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in a maize and bean diet provide more bioavailable iron than standard red mottled beans: Studies in poultry (*Gallus gallus*) and an in vitro digestion/Caco-2 model. **Nutrition Journal**, v. 10, p. 1-10, 2011.

TAKO, E.; HOEKENGA, O.A.; KOCHIAN, L.V.; GLAHN, R.P. High bioavailability iron maize (*Zea mays* L.) developed through molecular breeding provides more absorbable iron in vitro (Caco-2 model) and in vivo (*Gallus gallus*), **Nutrition Journal**, v.12, p.1-11, 2013.

TAKO, E.; LAPARRA, J.M.; GLAHN, R.R.; WELCH, R.M.; LEI, X.G.; BEEBE, S.; MILLER, D.D. Biofortified black beans in a maize and bean diet provide more bioavailable iron to piglets than standard black beans. **Journal of Nutrition**, v.139, p.305–309, 2009.

THURNHAM, D.I. Vitamin A, iron and haematopoiesis. **The Lancet**, v.342, p.1312-1313, 1993.

VAN CAMPEN, D.R.; GLAHN, R.P. Micronutrient bioavailability techniques: accuracy, problems and limitations. **Field Crops Research**, v. 60, p. 93–113, 1999.

WALCZYK, T.; DAVIDSSON, L.; ROSSANDER-HULTHEN, L.; HALLBER, L.; HURRELL, R.F. No enhancing effect of vitamin A on iron absorption in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.77, p.144-149, 2003.

WELCH, R.M.; HOUSE, W.A.; BEEBE, S.; SENADHIRA, D.; GREGORIO, G.B.; CHENG, Z. Testing iron and zinc bioavailability in genetically enriched beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and rice (*Oryza sativa* L.) in a rat model, **Food and Nutrition Bulletin**, v.21, 428-433, 2000.

WIJAYANTI, N.; KATZ, N.; IMMENSCHUH, S. Biology of heme in health and disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 981-986, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Preventing and controlling IDA through primary health care: a guide for health administrators and programme managers**. Geneva: Switzerland WHO, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005** WHO: Global Database on Anaemia. Geneva: WHO, 2008.

ZIMMERMANN, M.B.; BIEBINGER, R.; ROHNER, F.; DIB, A.; ZEDER, C.; HURRELL, R.F.; CHAOUKI, N. Vitamin A supplementation in children with poor vitamin A and iron status increases erythropoietin and hemoglobin concentrations without changing total body iron. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, p. 580-586, 2006.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a qualidade proteica e biodisponibilidade do ferro das combinações alimentares de arroz e feijão, e destes com a batata doce e abóbora biofortificadas, que fazem parte do programa de Biofortificação de micronutrientes, bem como a avaliar a expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro e atividade antioxidante.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Elaborar farinhas dos alimentos biofortificados;
- ✓ Determinar a concentração de lipídios, proteínas, carboidratos cinzas, umidade e fibra alimentar das farinhas dos alimentos;
- ✓ Analisar o concentração de fitato, fenólicos totais, carotenoides, ferro e zinco dos alimentos;
- ✓ Avaliar a qualidade proteica dos alimentos biofortificados em ratos *Wistar*, variáveis bioquímicas, e a excreção fecal de lipídios e de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes;
- ✓ Avaliar a biodisponibilidade de ferro dos alimentos em ratos *Wistar*, por meio de índices hematológicos da expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, bem como avaliar da capacidade antioxidante do plasma.

#### 4. ARTIGO I

##### **Alimentos do programa de biofortificação de micronutrientes apresentam elevada qualidade proteica e ação hipoglicemiante em ratos Wistar.**

##### **Resumo**

Avaliou-se a qualidade proteica, o perfil de lipídios e de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e a glicemia de combinações de alimentos como Arroz, Feijão BRS Pontal, Feijão BRS Xique-Xique, Abóbora e Batata Doce que fazem parte do programa de Biofortificação de micronutrientes (Zn, Fe e carotenoides) promovido pelo Programa de Melhoramento Genético da EMBRAPA (BioFORT e HarvestPlus). Foram utilizados 48 ratos machos, recém desmamados, divididos em dois grupos controles (padrão de caseína) e o aprotéico, e seis grupos testes (n=6): arroz+feijão caupi (AFC), arroz+feijão pontal (AFP), arroz+feijão caupi+abóbora (AFCA), arroz+feijão pontal+abóbora (AFPA), arroz+feijão caupi+ batata doce (AFCB) e arroz+feijão pontal+batata doce (AFPB). As dietas apresentavam em média 9,7% de proteína. O experimento durou 28 dias e foram dosadas as concentrações séricas de glicose, colesterol total, lipoproteína de alta densidade e triglicerídeos, pH das fezes e ácidos graxos de cadeia curta. Foram calculados os índices de qualidade proteica: coeficiente de eficiência proteica (PER), razão proteica líquida (NPR) e digestibilidade verdadeira (DV). Os índices PER e NPR dos grupos testes não diferiram ( $p \geq 0,05$ ) do grupo caseína, indicando elevada qualidade proteica. A DV dos grupos teste foi inferior ( $p < 0,05$ ) à caseína, no entanto os grupos contendo feijão caupi AFC ( $81,5 \pm 3,05$ ), AFCA ( $79,5 \pm 2,6$ ) e AFCB ( $83,0 \pm 6,5$ ) apresentaram DV superior ( $p < 0,05$ ) aos demais grupos testes contendo feijão pontal. A glicemia de jejum reduziu nos grupos AFPA ( $134,5 \pm 29,9 \text{ mg/dL}$ ) e AFPB ( $108,3 \pm 17,8 \text{ mg/dL}$ ) em comparação ao padrão caseína ( $218,3 \pm 40,4 \text{ mg/dL}$ ). Não houve alteração no perfil de lipídios séricos. As combinações alimentares apresentaram maior excreção de lipídios fecal comparados com o controle caseína. A excreção de ácido propiônico foi maior no grupo AFCB ( $25,8 \pm 5,3 \mu\text{mol/g}$ ) e a concentração de ácido butírico maior nos grupos AFCA ( $13,0 \pm 5,1 \mu\text{mol/g}$ ) e AFCB ( $14,2 \pm 3,6 \mu\text{mol/g}$ ), ambos contendo feijão caupi. A excreção de ácido acético foi maior no grupo caseína. A combinação de alimentos previstos no programa de biofortificação de micronutrientes mostrou-se tão eficiente quanto à caseína para promover o crescimento e desenvolvimento dos animais, além dos efeito hipoglicemiante das combinações alimentares com feijão pontal.

**Palavras-chave:** proteína, biofortificação, glicemia, lipídio fecal

## 4.1 Introdução

Paradoxalmente a queda acentuada da desnutrição e aumento da obesidade, característica do processo de transição nutricional, ainda é observada uma alta prevalência da deficiência de micronutrientes. É estimado que dois bilhões de pessoas no mundo sejam afetadas pela deficiência crônica de vitaminas e minerais essenciais, coletivamente conhecida como fome oculta (MUTHAYYA, *et al*, 2013).

Os esforços globais para reduzir a incidência dessas carências nutricionais têm sido amplamente direcionados para o consumo crescente de suplementação de micronutrientes por meio da fortificação e biofortificação de alimentos (KENNEDY *et al.*, 2003). A produção de alimentos biofortificados como arroz, feijão, abóbora e batata doce, consiste no desenvolvimento de culturas com maiores concentrações de micronutrientes, utilizando as melhores práticas tradicionais de reprodução e biotecnologia moderna, sendo uma nova abordagem de saúde pública para controlar as deficiências nutricionais (BOUIS *et al.*, 2011; TAKO, 2013).

Os alimentos de origem vegetal são fontes de proteína, porém, muitas vezes apresentam-se em quantidades insuficientes de aminoácidos essenciais. Apesar de não serem fonte de proteína de alta qualidade, alimentos de origem vegetal contribuem consideravelmente para a ingestão proteica total da população, pois representam as fontes proteicas de menor custo e, portanto de maior consumo (MENDES *et al.*, 2009; SOUSA, FERNANDES, NAVES, 2012). A combinação de diferentes fontes alimentares pode melhorar o balanço de aminoácidos essenciais e, conseqüentemente, a qualidade proteica.

Alguns estudos tem avaliado a qualidade proteica do feijão (CRUZ *et al*, 2005; LUJÁN *et al*, 2008) e também a combinação de arroz e feijão (CINTRA *et al*, 2007; KANNA; NIELSEN; MASON, 2001). No entanto, estudos que avaliem as combinações de alimento biofortificados com ferro, zinco e carotenoides, como o feijão, arroz, abóbora e batata doce são escassos.

A qualidade proteica dos alimentos pode ser influenciada por fitoquímicos presentes em alguns alimentos como o feijão, dentre eles se destaca o fitato, taninos condensados e fenólicos totais, que podem se ligar à minerais, proteínas e amidos, formando complexos insolúveis que prejudica a absorção destes (RAMÍRES-CÁRDENAS, LEONEL E COSTA, 2008). No entanto, alguns desses compostos tem apresentado efeitos positivos no tratamento de enfermidades como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer do cólon (MANISHA *et al.*, 2003; WOO *et al.*, 2003). Além disso, determinados constituintes do feijão, como fibras alimentares, taninos, fitatos e

inibidores de amilase, tem se correlacionado inversamente com a digestão de carboidratos e resposta glicêmica (ANDERSON; SMITH; WASNOCK, 1999).

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade proteica, glicemia, perfil de lipídios séricos e a excreção de lipídeos e de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes de combinações de arroz, feijão BRS Pontal, feijão BRS Xique-Xique, abóbora e batata doce biofortificados.

A hipótese do estudo baseia-se na premissa de que a combinação de alimentos ricos com ferro e biofortificados com carotenoides proporcionará fontes proteicas vegetais de boa qualidade, mesmo na presença de fitoquímicos; haverá alteração no perfil lipídico e na glicemia de jejum nos animais após a ingestão das combinações alimentares.

## 4.2 Metodologia

### 4.2.1 Matéria prima

Foram utilizados o feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) cultivar BRS Pontal, o arroz branco Chorinho (*Oryza sativa*), a abóbora (*Curcubita moscata*, Duchesne) e batata doce (*Ipomoea batatas*), biofortificados com ferro, zinco e carotenoides, desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento Genético da EMBRAPA (BioFORT e HarvestPlus).

#### 4.2.1.1 Preparo das farinhas dos alimentos

##### *Arroz*

Primeiramente o arroz foi lavado em água corrente e em seguida submetido à cocção úmida, a uma proporção de 2,83:1 de arroz. Posteriormente foram distribuídos em tabuleiros e secos em estufa a 60°C por 17 horas. Após a secagem o material foi pesado, triturado em moinho (MAO 090 CFT) a 3000 rpm e peneirado em peneira de 60 mesh.

##### *Feijões*

O preparo dos feijões foi realizado segundo metodologia proposta por Ramírez-Cárdenas, Leonel e Costa (2006) com modificações. Os feijões foram cozidos em panela de pressão, na proporção de 1 kg de feijão BRS Pontal para 2,2L de água, e 1 kg de feijão BRS Xique-xique para 3,6 L de água. Ao iniciar a fervura, manteve-se o cozimento em fogo baixo por 40 minutos. O feijão foi distribuído em tabuleiros e secos em estufa a 60°C por 17 horas. Após a secagem o material foi pesado, triturado em moinho (MAO 090 CFT) a 3000 rpm e peneirado em peneira de 60 mesh.

### *Abóbora*

O processamento da abóbora foi realizado de acordo com Silva (2010), com modificações. Primeiramente, foram retiradas as cascas e sementes da abóbora, e em seguida procedeu o corte do fruto no formato de palha, em um multiprocessador. A abóbora cortada foi distribuída em tabuleiros e seca em estufa a 60°C por 18 horas. Após a secagem o material foi pesado, triturado em moinho (MAO 090 CFT) a 3000 rpm e peneirado em peneira de 60 mesh.

### *Batata doce*

As batatas doce foram descascadas e cortadas no formato de palha, em um multiprocessador. Em seguida, foram submersas em solução de bissulfito de sódio a 0,5% por 10 minutos, a fim de evitar o escurecimento enzimático. As batatas foram, então distribuídas em tabuleiros e secas em estufa a 60°C por 18 horas. Após a secagem o material foi pesado, triturado em moinho (MAO 090 CFT) a 3000 rpm e peneirado em peneira de 60 mesh (SILVA, 2010).

## 4.2.2 Composição química dos alimentos

### *Umidade*

A umidade foi determinada por secagem a 105°C em placas de petri previamente taradas, e submetidas a aquecimento em estufa de circulação forçada de ar (Marconi®, modelo MA 035, Piracicaba, Brasil), até peso constante, conforme o procedimento descrito pela AOAC (2012). Após secagem, as amostras foram resfriadas em dessecador com sílica e gel e pesados em balança analítica digital, com precisão de 0,0001 g. A umidade foi calculada pela diferença entre a amostra úmida e seca.

### *Cinzas*

Para análise do teor de cinzas, cerca de 5 g das amostras secas, obtidas na análise de umidade, foram pesadas em cadinhos de porcelana previamente secos e pesados, e submetidos à calcinação em mufla a 600 °C, por 6 horas. Posteriormente, os cadinhos com as amostras foram resfriados em dessecador com sílica gel e novamente pesados em balança analítica digital da marca OHAUS. O teor de cinzas foi determinado pela diferença de peso antes e após a calcinação (AOAC, 2012).

### *Lipídios totais*



O teor de lipídios totais foi determinado por extração utilizando o aparato de Soxhlet, segundo as normas analíticas AOAC (2012). Neste procedimento, a extração foi realizada utilizando o éter etílico como solvente.

#### *Proteínas totais*

As proteínas totais foram determinadas pelo micro-método de Kjeldhal, segundo a AOAC (2012). O teor de nitrogênio total foi multiplicado pelo fator 6,25 para determinar a quantidade de proteínas totais.

#### *Fibra alimentar*

O conteúdo de fibra alimentar total, solúvel e insolúvel foram determinados pelo método enzimático-gravimétrico, segundo AOAC (2012), utilizando-se para a hidrólise enzimática a amilase termorresistente, protease e amiloglicosidase (Total dietary fiber assay kit, Sigma®). A filtração foi realizada utilizando-se cadinhos de vidro com placas de vidro sinterizado com porosidade N° 2 (ASTM 40-60) e celite como auxiliar de filtração. A fibra alimentar total foi obtida por soma entre fibra alimentar solúvel e insolúvel.

#### *Fitato*

O conteúdo de fitato foi determinado por cromatografia de troca iônica e espectrofotometria, segundo o método de LATTA e ESKIN (1980), com modificações por ELLIS e MORRIS (1986). Para a extração dos fitatos foi pesado cerca de 0,1g das farinhas dos alimentos e adicionado 5mL de HCl 2,4%, permanecendo sob agitação horizontal durante 12 horas a 250 rpm. O extrato contendo o ácido fítico foi centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos, sendo o sobrenadante filtrado à vácuo em funil de büchner e purificado utilizando coluna de troca iônica, com fase estacionária constituída por resina Dowex- AGX-4. A coluna foi pré-condicionada com NaCl 2M e o extrato obtido das etapas anteriores foi aplicado cuidadosamente à mesma. Os fósforos inorgânicos foram eluídos com NaCl 0,05M, seguida da eluição dos fitatos retidos com NaCl 2M. O fitato foi determinado colorimetricamente, com base na coloração rósea do reagente de Wade que é formado a partir da reação entre o íon férrico e o ácido sulfosalicílico, que exibe absorvância máxima a 50 nm. Na presença de fitato, o ferro é sequestrado e indisponível para reagir com o ácido sulfosalicílico, resultando em redução da intensidade da cor. Foi elaborada uma curva analítica de ácido fítico (Sigma®), com concentrações de 10 a 100µL/mL.<sup>-1</sup>, por meio da equação de regressão linear ( $y = -0,0032$

+ 0,3778:  $R^2= 0,9942$ ) para expressar a concentração de fitato em mg de ácido fítico/ g de farinha.

#### *Compostos fenólicos totais*

A determinação da concentração de compostos fenólicos nos alimentos foi realizada, em triplicata, utilizando-se o reagente de Folin Ciocalteu em ambiente alcalino, este reagente oxida os compostos fenólicos e reduzem o fosfomolibdato, presente no reagente, formando um composto de coloração azul com leitura em uma faixa de 720 a 765 nm, conforme descrito por Singleton *et al.* (1999).

O extrato foi preparado com 2g das farinhas dos alimentos biofortificados adicionados de 20 mL (1:10) de solução de metanol:água (6:4), homogeneizados em agitador automático a 180rpm durante 8 horas em temperatura ambiente.

Fo utilizada uma alíquota de 500 $\mu$ L de cada um dos extratos, adicionados de 0,5 mL de reagente de Folin Ciocalteu (diluído em água a 20%) e 0,5mL de solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 7,5% seguido de agitação em vórtex e incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro Multiskan (Thermo Scientific) no comprimento de onda de 765 nm. Uma curva analítica de ácido gálico, nas concentrações 0,01 a 0,1 g.L<sup>-1</sup> foi elaborada, por meio da equação de regressão ( $y= 30,763x + 0,0818$ :  $R^2= 0,9964$ ) para expressar os resultados em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra.

#### *Carotenoides da abóbora e da batata doce*

A concentração de carotenoides pró-vitamínicos A ( $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno) foi determinado segundo Rodriguez *et al.* (1976). Cerca de 3 a 5g de amostra foram triturados em 60 mL de acetona refrigerada (dividida em três volumes de 20 mL) por aproximadamente 2 minutos. O material foi filtrado à vácuo em funil de büchner utilizando-se papel de filtro. Em seguida, o filtrado foi transferido, aos poucos, para um funil de separação, em que foram adicionados 50 mL de éter de petróleo refrigerado, para a transferência dos pigmentos da acetona para o éter. Cada fração foi lavada três vezes com água destilada para retirar toda a acetona. A concentração do material foi feita por evaporação do extrato em éter de petróleo usando evaporador rotativo em temperatura de 35°C. Os pigmentos foram redissolvidos em quantidade conhecida de éter de petróleo (balão volumétrico de 25 mL) e armazenados em frascos de vidro âmbar em temperatura de -18 °C.

Para análise, uma alíquota (2 mL) do extrato armazenado em éter de petróleo foi evaporada sob fluxo de nitrogênio e, em seguida, recuperada na mesma quantidade de metanol e filtrada em unidade filtrante com 0,45 µm de porosidade.

As análises de carotenoides foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seguindo as condições cromatográficas desenvolvidas por Pinheiro-Sant'Ana *et al.* (1998): sistema CLAE-DAD (detector de arranjos de diodos); coluna cromatográfica RP-18 Phenomenex Gemini, 250 x 4,6 mm, 5 µm, munida de coluna de guarda Phenomenex ODS (C18), 4 mm x 3 mm; fase móvel composta de metanol: acetato de etila: acetonitrila (80:10:10, v/v/v) com fluxo de 2,0 mL/minuto.

#### 4.2.3 Preparo e composição das dietas

A composição das dietas experimentais foi baseada na dieta AIN- 93G (Reeves, Nielsen, & Fahey, 1993). A substituição da caseína da dieta controle pela farinha dos alimentos biofortificados foi baseada no conteúdo de proteína dos alimentos e na contribuição desses para o consumo diário de proteínas de crianças de 7 a 10 anos de idade, segundo pesquisa realizada por Hinnigi; Bergamaschi (2012). Nesse estudo foi observado que a contribuição do feijão para o consumo total de proteína da dieta foi 8,85%, a do arroz foi de 4,01% da abóbora e batata doce foi de 0,35% cada uma. Assim, com base na quantidade de proteína desses alimentos chegou-se a uma proporção de 50% do arroz, 50% do feijão, 13% da batata doce e 3% da abóbora. A composição das dietas foi calculada de forma que as dietas fossem isocalóricas e isoproteicas (**Tabela 2**).

Os ingredientes para o preparo das dietas foram pesados e misturados manualmente, em ordem crescente de quantidade. Posteriormente, foram homogeneizados em batedeira semi-industrial (Lieme®), por 15 minutos. As dietas foram acondicionadas em embalagens plásticas e armazenadas sob refrigeração.

#### 4.2.4 Ensaio Biológico

Quarenta e oito ratos machos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, variação *albinus*), recém desmamados, com 21 dias de vida foram sistematicamente divididos em 8 grupos com 6 animais em cada, de modo que a diferença da média dos pesos entre os grupos não excedesse 10 gramas. Os animais foram distribuídos em gaiolas metabólicas individuais de aço inox, em ambiente com temperatura controlada a 22 °C e ciclo de claro e escuro de 12 horas controlado automaticamente. Os animais receberam água destilada e suas respectivas dietas experimentais *ad libitum*.

Os grupos experimentais receberam as seguintes dietas: Arroz+ Feijão Caupi (AFC); Arroz + Feijão Pontal (AFP); Arroz + Feijão Caupi + Abóbora (AFCA); Arroz + Feijão Pontal + Abóbora (AFPA); Arroz + Feijão Caupi + Batata Doce (AFCB); Arroz + Feijão Pontal + Batata Doce (A+FP+B); Controle Positivo (Caseína); Controle Negativo (Aproteica).

Ao final de 28 dias, após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com isoflurano (Isoforine, Cristália®) e eutanasiados por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos com heparina, 16 x 100mm (BD Vacutainer®) com 10 mL de heparina sódica e centrifugados a 2865xg por 10 minutos (Fanem – 204, São Paulo, Brazil) para separação do plasma. Além disso, as fezes do ceco foram coletadas para análises de lipídios e ácidos graxos de cadeia curta nas fezes.

Este estudo que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG (**Anexo 1**).

#### 4.2.5 Digestibilidade, PER e NPR

Para o cálculo da digestibilidade, as dietas foram marcadas com índigo carmin na proporção de 200mg/100g e as fezes foram coletadas do 7º ao 14º dia do experimento. Após o período de coleta, as fezes foram secas em estufa com circulação de ar, a 105°C durante 24 horas. Em seguida, foram resfriadas, pesadas e moídas em moinho de navalha para determinação do conteúdo de nitrogênio. A digestibilidade verdadeira foi calculada medindo a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta, a excretada nas fezes e a perda metabólica nas fezes (corresponde ao nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica). A digestibilidade verdadeira (DV) foi calculada pela seguinte equação:

$D = I - (F - FK) \times 100/I$  em que:

D = digestibilidade; I = nitrogênio ingerido pelo grupo com dieta-teste; F = nitrogênio fecal do grupo com dieta-teste; e FK = nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

#### *PER (Coeficiente de Eficácia Proteica)*

O PER foi determinado de acordo com a AOAC (1975), utilizando a seguinte equação:

$$PER = \frac{\text{ganho de peso (g) do grupo-teste}}{\text{proteína consumida (g) pelo grupo-teste}}$$

#### *NPR (Razão Proteica Líquida)*

O NPR foi determinado de acordo com Bender e Doell (1957), pela seguinte equação:

$$\text{NPR} = \frac{\text{ganho de peso (g) do grupo-teste} + \text{perda de peso (g) do grupo aprotéico}}{\text{proteína consumida (g) pelo grupo-teste}}$$

**Tabela 2:** Composição alimentar e densidade calórica das dietas experimentais (g.100<sup>-1</sup>).

Ingredientes	Dietas Experimentais							
	Controle Positivo (caseína)	Controle Negativo	Feijão Pontal+ Arroz	Feijão Caupi+ Arroz	Feijão Pontal+Arroz+ Abóbora	Feijão Pontal+Arroz+ Batata doce	Feijão Caupi+ Arroz+ Abóbora	Feijão Caupi+ Arroz+ Batata doce
Feijão Pontal	-	-	33,1	-	31,79	31,78	-	-
Feijão Caupi	-	-	-	33,3	-	-	27,87	27,58
Arroz	-	-	33,1	33,3	32,68	32,68	32,66	32,64
Abóbora	-	-	-	-	1,58	-	1,58	-
Batata Doce	-	-	-	-	-	9,56	-	9,56
Caseína	11,59	-	-	-	-	-	-	-
Amido Dextrinizado	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	8,45
Sacarose	10	10	10	10	10	10	10	10
Óleo de Soja	7	7	5,26	4,96	5,27	5,15	6,32	6,2
Celulose Microcristalina	5,00	5,00	-	-	0,26	-	0,48	0,5
Pré Mix Mineral	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Pré Mix Vitamínico	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
L-Cistina	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de Milho	48,16	59,75	-	-	0,41	-	2,84	-
<b>Proteína</b>	9,83	-	9,26	9,91	9,34	9,8	9,93	9,9
<b>Densidade Calórica(Kcal/g)</b>	3,95	3,95	3,56	3,4	3,47	3,7	3,41	3,64

#### 4.2.6 Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) nas fezes

O conteúdo de ácido propiônico, acético e butírico nas fezes foi determinado de acordo com Smiricky-Tjardes e colaboradores (2003), com algumas modificações. Resumidamente, 0,5g de fezes foram misturadas a 0,5 ml de ácido meta-fosfórico a 25% e agitado em vortex. Em seguida as amostras foram deixadas à temperatura ambiente durante 30 minutos, e centrifugadas a 13500 rpm durante 30 min. O sobrenadante foi transferido para microtubos e centrifugados novamente por 20 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos e transferidos para vials individuais e adicionados de 400µL de ácido meta-fosfórico a 25%. Esse conteúdo foi injetado em cromatógrafo gasoso (Modelo GC-2010, Shimadzu Scientific Instruments Inc, Japan) para a quantificação dos AGCC. Foi utilizada coluna capilar de sílica Nukol, dimensões de 30m, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura do filme (Supelco, USA). O arraste foi feito por meio do gás hidrogênio ao fluxo de 1,8 mL/min. Foi usada uma temperatura inicial do forno de 100°C por 0,5 minutos, com posterior aumento de 8°C/min até atingir a temperatura de 180°C, sendo que esta será mantida por 1 minuto, seguida do aumento de 20°C/min até 200°C, que foi mantido por 5 minutos.

O detector de chama (FID) e injetor tiveram a temperatura de, respectivamente, de 240°C e 200°C, sendo que o volume de injeção foi de 1µL, com split de 1:2.

A identificação foi feita por meio da comparação do tempo de retenção, utilizando como padrão externo uma mistura de ácidos graxos de cadeia curta livres (Volatile free acid mix, Cód. 46975, Sigma Aldrich, USA). A quantificação foi feita por meio da utilização da curva padrão nas concentrações de 2 a 10 mM.

#### 4.2.7 Lipídios nas fezes

O conteúdo de lipídios totais nas fezes foi determinado por extração utilizando o aparato de Soxhlet, segundo as normas analíticas da AOAC (2012). Neste procedimento, a extração foi realizada utilizando como solvente o éter etílico.

#### 4.2.8 Análises bioquímicas

As concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), triglicerídeos foram determinadas por métodos colorimétricos de acordo com as instruções do fabricante (Bioclin®).

#### 4.2.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido de teste de médias, Dunnett para comparação dos grupos testes com o controle e para comparação entre todos os grupos experimentais foi realizado teste de Newman-Keuls. As análises foram realizadas no software GraphPad Prisma versão 5.0 considerando nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1. Composição química dos alimentos biofortificados

A farinha do feijão BRS Xique-xique apresentou maior ( $p < 0,05$ ) conteúdo de proteínas, seguido da farinha do feijão BRS pontal e da farinha da abóbora (**Tabela 3**).

De acordo com a análise de fibra alimentar das farinhas dos alimentos foi observado que a farinha do feijão BRS Pontal apresentou maior conteúdo ( $p < 0,05$ ), seguido da farinha do BRS Xique xique, batata doce e abóbora, que não diferiram ( $p \geq 0,05$ ) entre si. A farinha do arroz apresentou o menor conteúdo de fibra alimentar total ( $p < 0,05$ ). Ao analisar a fração solúvel da fibra alimentar da farinha do feijão BRS Pontal apresentou maior ( $p < 0,05$ ) conteúdo em comparação a farinha do BRS Xique-Xique, não sendo diferente ( $p \geq 0,05$ ) das farinhas da abóbora e da batata doce (**Tabela 3**).

As farinhas do feijão BRS Pontal e BRS Xique-xique apresentaram conteúdos semelhantes ( $p \geq 0,05$ ) de ácido fítico. O mesmo observou-se para a abóbora e a batata doce (**Tabela 3**).

A farinha da abóbora apresentou maior concentração de fenólicos totais ( $p < 0,05$ ) em relação as outras farinhas. Além disso, apresentou maior ( $p < 0,05$ ) conteúdo de carotenoides totais em comparação a farinha da batata doce (**Tabela 3**).



**Tabela 3.** Composição nutricional das farinhas dos alimentos biofortificados, em base seca.

	Feijão BRS		Arroz	Abóbora	Batata Doce
	Xique-Xique	Pontal			
Umidade (g.100g <sup>-1</sup> )	8,27 <sup>c</sup> ±0,1	10,7 <sup>a</sup> ±0,28	7,35 <sup>d</sup> ±0,06	9,99 <sup>ab</sup> ±0,55	9,92 <sup>b</sup> ±0,06
Cinzas (g.100g <sup>-1</sup> )	2,93 <sup>c</sup> ±0,02	3,14 <sup>b</sup> ±0,03	0,34 <sup>e</sup> ±0,02	6,38 <sup>a</sup> ±0,07	2,27 <sup>d</sup> ±0,06
Lipídeos (g.100g <sup>-1</sup> )	2,23 <sup>a</sup> ±0,22	1,37 <sup>b</sup> ±0,3	0,13 <sup>c</sup> ±0,13	1,46 <sup>b</sup> ±0,14	1,55 <sup>c</sup> ±0,34
Proteína (g.100g <sup>-1</sup> )	23,15 <sup>a</sup> ±0,32	18,86 <sup>b</sup> ±0,08	8,83 <sup>d</sup> ±0,18	15,86 <sup>c</sup> ±0,24	2,63 <sup>c</sup> ±0,12
Fibra Alimentar Total (g.100g <sup>-1</sup> )	15,53 <sup>b</sup> ±0,92	26,69 <sup>a</sup> ±0,45	1,08 <sup>c</sup> ±0,1	15,02 <sup>b</sup> ±0,03	15,31 <sup>b</sup> ±0,31
<i>Fibra Solúvel</i>	1,88±0,11	7,04±1,27	0,47	5,10±0,25	4,89±0,63
<i>Fibra Insolúvel</i>	13,66±0,82	19,64±0,92	0,61	9,92±0,23	10,42±0,38
Carboidratos (g.100g <sup>-1</sup> )	48,87 <sup>bc</sup> ±0,73	41,71 <sup>c</sup> ±0,28	82,48 <sup>a</sup> ±0,05	52,19 <sup>bc</sup> ±0,34	69,62 <sup>ab</sup> ±0,56
Fenólicos Totais (mg de EqAG/g)	0,89 <sup>c</sup> ±0,09	1,33 <sup>b</sup> ±0,15	0,06 <sup>d</sup> ±0,01	2,41 <sup>a</sup> ±0,12	1,51 <sup>b</sup> ±0,07
Carotenoides (mg/100g)	nd	nd	nd	308,84 <sup>a</sup> ±1,98	127,11 <sup>b</sup> ±0,06
Ácido Fítico (g/100g <sup>-1</sup> )	0,54 <sup>a</sup> ± 0,01	0,51 <sup>a</sup> ± 0,02	0,20 <sup>b</sup> ± 0,03	0,03 <sup>c</sup> ± 0,32	0,10 <sup>c</sup> ± 0,1

Dados apresentados em média e desvio-padrão. Nd: não determinado. A composição nutricional das farinhas dos alimentos foi determinada de acordo com os métodos AOAC (2012) (carboidratos, proteínas, fibras). Fenólicos: método de Singleton et al. (1999), utilizando o reagente Folin Ciocalteu; Ácido Fítico: segundo Latta e Eskin (1980), com modificações por Ellis e Morris (1986).

#### 4.3.2 Efeito das combinações alimentares sobre a qualidade proteica

Os grupos experimentais apresentaram coeficiente de eficiência alimentar (CEA) semelhante ( $p \geq 0,05$ ) (**Tabela 4**). Os índices PER e NPR dos grupos testes não diferiram ( $p \geq 0,05$ ) do grupo caseína, indicando elevada qualidade protéica. Entre os grupos testes observou-se que os grupos AFC e AFPB apresentaram as menores ( $p < 0,05$ ) médias de PER e NPR e os grupos contendo feijão pontal, AFP e AFPA apresentaram os maiores ( $p < 0,05$ ) médias para esses índices (**Tabela 5**).

**Tabela 4:** Consumo alimentar total, ganho de peso e coeficiente de eficiência alimentar (CEA).

	<b>Consumo Alimentar Total</b>	<b>Ganho de peso</b>	<b>CEA</b>
<b>Caseína</b>	168,21 <sup>A</sup> ±20,67	57,16 <sup>A</sup> ±14,1	0,33 <sup>A</sup> ±0,079
<b>AFC</b>	168,20 <sup>Aa</sup> ±5,51	45,83 <sup>Ba</sup> ±6,99	0,27 <sup>Aa</sup> ±0,048
<b>AFP</b>	129,67 <sup>Bb</sup> ±11,72	40,16 <sup>Ba</sup> ±6,24	0,30 <sup>Aa</sup> ±0,028
<b>AFCA</b>	148,74 <sup>Abc</sup> ±19,95	45,66 <sup>Ba</sup> ±6,34	0,31 <sup>Aa</sup> ±0,038
<b>AFPA</b>	136,59 <sup>Bbc</sup> ±6,33	42,16 <sup>Ba</sup> ±4,53	0,31 <sup>Aa</sup> ±0,034
<b>AFCB</b>	128,94 <sup>Bbc</sup> ±13,83	39,75 <sup>Ba</sup> ±2,62	0,31 <sup>Aa</sup> ±0,041
<b>AFPB</b>	120,28 <sup>Bc</sup> ±25,40	31,66 <sup>Bb</sup> ±7,14	0,26 <sup>Aa</sup> ±0,043

Dados apresentados em média e desvio-padrão. AFC: arroz e feijão caupi; AFP: arroz e feijão pontal; AFCA: arroz, feijão caupi e abóbora; AFPA: arroz, feijão pontal e abóbora; AFCB: arroz, feijão caupi e bata doce; AFBP: arroz, feijão pontal e batata doce; Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Dunnett ( $p \leq 0.05$ ). Médias nas colunas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls ( $p \leq 0.05$ ). N=6, período de 14 dias.

**Tabela 5:** Efeito das combinações de alimentos inseridos no Programa de Biofortificação de nutrientes sobre os índices de qualidade proteica.

	<b>PER</b>	<b>PER-R</b>	<b>NPR</b>	<b>NPR-R</b>
<b>Caseína</b>	3,43 <sup>A</sup> ±0,74	100 <sup>A</sup>	4,08 <sup>A</sup> ±0,71	100 <sup>A</sup>
<b>AFC</b>	2,75 <sup>Ab</sup> ±0,36	80,3 <sup>Ab</sup> ±14,37	3,39 <sup>Ac</sup> ±0,5	83,11 <sup>Ac</sup> ±12,47
<b>AFP</b>	3,33 <sup>Aa</sup> ±0,3	97,02 <sup>Aa</sup> ±8,84	4,22 <sup>Aa</sup> ±0,27	103,38 <sup>Ac</sup> ±6,61
<b>AFCA</b>	3,11 <sup>Aab</sup> ±0,39	90,63 <sup>Aab</sup> ±11,4	3,84 <sup>Aabc</sup> ±0,45	94,09 <sup>Aabc</sup> ±11,17
<b>AFPA</b>	3,30 <sup>Aa</sup> ±0,36	96,28 <sup>Aa</sup> ±10,66	4,14 <sup>Aab</sup> ±0,38	101,34 <sup>Aab</sup> ±9,3
<b>AFCB</b>	3,14 <sup>Aab</sup> ±0,42	91,45 <sup>Aab</sup> ±12,25	3,98 <sup>Aabc</sup> ±0,51	97,43 <sup>Aabc</sup> ±12,48
<b>AFPB</b>	2,69 <sup>Ab</sup> ±0,43	78,48 <sup>Ab</sup> ±12,79	3,62 <sup>Abc</sup> ±0,47	88,76 <sup>Abc</sup> ±11,62

Dados apresentados em média e desvio-padrão. AFC: arroz e feijão caupi; AFP: arroz e feijão pontal; AFCA: arroz, feijão caupi e abóbora; AFPA: arroz, feijão pontal e abóbora; AFCB: arroz, feijão caupi e bata doce; AFBP: arroz, feijão pontal e batata doce; PER: quociente de eficiência protéica; PERR: PER relativo; NPR: razão protéica líquida; NPRR: NPR relativo. Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Dunnett ( $p < 0.05$ ). Médias nas colunas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls ( $p < 0.05$ ). N=6, período de 14 dias.

As combinações alimentares contendo feijão caupi apresentaram ingestão de nitrogênio superior aos demais grupos experimentais ( $p < 0,05$ ), porém apresentaram excreção fecal semelhante aos outros grupos experimentais. Desta forma, os grupos AFC, AFCA e AFCB apresentaram maiores valores de DV e DV-R ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais grupos testes que continham feijão pontal em suas combinações alimentares. Entre as combinações alimentares a que obteve menor ( $p < 0,05$ ) digestibilidade verdadeira foi a AFPA (**Tabela 5**).

**Tabela 6:** Efeito das combinações de alimentos inseridos no programa de biofortificação de nutrientes sobre a ingestão e excreção de nitrogênio, e digestibilidade verdadeira.

	NI	NF	DV	DV-R
<b>Caseína</b>	0,64 <sup>A</sup> ±0,03	0,05 <sup>A</sup> ±0,09	94,24 <sup>A</sup> ±1,32	
<b>AFC</b>	0,68 <sup>Aa</sup> ±0,03	0,14 <sup>Ba</sup> ±0,2	81,51 <sup>Ba</sup> ±3,05	86,5 <sup>a</sup> ±3,23
<b>AFP</b>	0,45 <sup>Ba</sup> ±0,05	0,13 <sup>Ba</sup> ±0,13	74,58 <sup>Bb</sup> ±4,55	79,13 <sup>b</sup> ±4,83
<b>AFCA</b>	0,60 <sup>Ab</sup> ±0,08	0,14 <sup>Ba</sup> ±0,23	79,53 <sup>Bab</sup> ±2,65	84,39 <sup>ab</sup> ±2,81
<b>AFPA</b>	0,49 <sup>Bb</sup> ±0,04	0,14 <sup>Ba</sup> ±0,66	73,35 <sup>Bc</sup> ±2,05	77,83 <sup>c</sup> ±2,17
<b>AFCB</b>	0,61 <sup>Ab</sup> ±0,05	0,12 <sup>Ba</sup> ±0,43	83,03 <sup>Ba</sup> ±6,47	87 <sup>a</sup> ±5,59
<b>AFPB</b>	0,45 <sup>Bb</sup> ±0,11	0,13 <sup>Ba</sup> ±0,42	75,16 <sup>Bbc</sup> ±4,14	79,75 <sup>bc</sup> ±4,39

Dados apresentados em média e desvio-padrão. AFC: arroz e feijão caupi; AFP: arroz e feijão pontal; AFCA: arroz, feijão caupi e abóbora; AFPA: arroz, feijão pontal e abóbora; AFCB: arroz, feijão caupi e bata doce; AFBP: arroz, feijão pontal e batata doce; NI: nitrogênio ingerido; NF: nitrogênio fecal; DV: Digestibilidade Verdadeira. DV-R: Digestibilidade Verdadeira Relativa. Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Médias nas colunas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). N=6, período de 14 dias.

#### 4.3.3 Efeito da ingestão dos alimentos inseridos no programa de biofortificação de micronutrientes sobre as variáveis bioquímica.

Os animais que consumiram dietas com combinações alimentares contendo feijão pontal, AFPA e AFBP, apresentaram níveis de glicose sanguínea inferiores ( $p < 0,05$ ) aos animais que receberam a dieta controle. Com relação as outras variáveis bioquímicas analisadas, todos os grupos experimentais foram semelhantes ao grupo controle ( $p \geq 0,05$ ) (**Tabela 7**).

**Tabela 7:** Efeito da ingestão de combinações de alimentos inseridos no programa de bifortificação sobre as variáveis bioquímicas de ratos Wistar.

	Caseína	AFCA	AFPA	AFCB	AFPB
<b>GLI (mg/dL)</b>	218,33 <sup>A</sup> ±40,43	185,66 <sup>Aa</sup> ± 17,79	134,5 <sup>Bbc</sup> ±29,9	172,66 <sup>Aab</sup> ±40,84	108,33 <sup>Bc</sup> ±17,79
<b>CT (mg/dL)</b>	79,66 <sup>A</sup> ±15,73	82,16 <sup>Aa</sup> ±12,66	72,33 <sup>Aa</sup> ±12,92	87,83 <sup>Aa</sup> ±13,12	84,5 <sup>Aa</sup> ±12,66
<b>HDL (mg/dL)</b>	39,33 <sup>A</sup> ±6,63	40 <sup>Aa</sup> ± 6,17	40,5 <sup>Aa</sup> ±2,58	45,33 <sup>Aa</sup> ±6,83	39,83 <sup>Aa</sup> ±6,17
<b>VLDL (mg/dL)</b>	11,4 <sup>A</sup> ±4,11	9,83 <sup>Aa</sup> ±4,02	8,16 <sup>Aa</sup> ±2,83	10,1 <sup>Aa</sup> ±4,35	9,4 <sup>Aa</sup> ±3,44
<b>LDL (mg/dL)</b>	28,93 <sup>A</sup> ±13,14	32,33 <sup>Aa</sup> ±15,84	23,66 <sup>Aa</sup> ±10,74	32,4 <sup>Aa</sup> ±7,1	35,26 <sup>Aa</sup> ±9,77
<b>TGL (mg/dL)</b>	57 <sup>A</sup> ±20,55	49,16 <sup>Aa</sup> ±17,2	40,83 <sup>Aa</sup> ±14,16	50,5 <sup>Aa</sup> ±21,76	47 <sup>Aa</sup> ±17,2
<b>TGO (U/L)</b>	120,2 <sup>A</sup> ±39,2	107,33 <sup>Aa</sup> ±22,02	109,66 <sup>Aa</sup> ±24,19	125,83 <sup>Aa</sup> ±15,23	121 <sup>Aa</sup> ±41,35
<b>TGP (U/L)</b>	23,16 <sup>A</sup> ±6,79	30,5 <sup>Aa</sup> ±8,78	33 <sup>Aa</sup> ±5,01	32 <sup>Aa</sup> ±6,72	35,66 <sup>Aa</sup> ±14,51
<b>PCR (mg/dL)</b>	0,2 <sup>A</sup> ±0,14	0,12 <sup>Aa</sup> ±0,08	0,14 <sup>Aa</sup> ±0,04	0,16 <sup>Aa</sup> ±0,1	0,09 <sup>Aa</sup> ±0,06

Dados apresentados em média e desvio-padrão. AFCA: Arroz+ Feijão Caupi+ Abóbora; AFPA: Arroz + Feijão Pontal +Abóbora; Arroz + Feijão Caupi + Batata Doce; AFBP: Arroz + Feijão Pontal + Batata Doce; GLI: glicose; HDL: *High Density Lipoprotein*; CT: Colesterol Total; TGL: Triglicerídeos; TGO: Transaminase Glutâmico Oxalacética ; TGP: Transaminase Glutâmico Pirúvica ; VLDL: *Very Low Density Lipoprotein*; LDL: *Low Density Lipoprotein*; PCR: Proteína C Reativa. As médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Dunnett ( $p<0.05$ ). Médias nas colunas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls ( $p<0.05$ ). N=6, período de 28 dias.

4.3.4 Efeito da ingestão dos alimentos inseridos no programa de biofortificação de micronutrientes sobre a excreção fecal de lipídeos e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

A excreção de gordura fecal dos animais alimentados com as dietas contendo combinações de alimentos biofortificados foi superior ( $p<0,05$ ) à excreção dos animais que receberam a dieta controle. Entre os grupos testes o grupo AFCA apresentou menor ( $p<0,05$ ) excreção de gordura fecal (**Figura 1**).

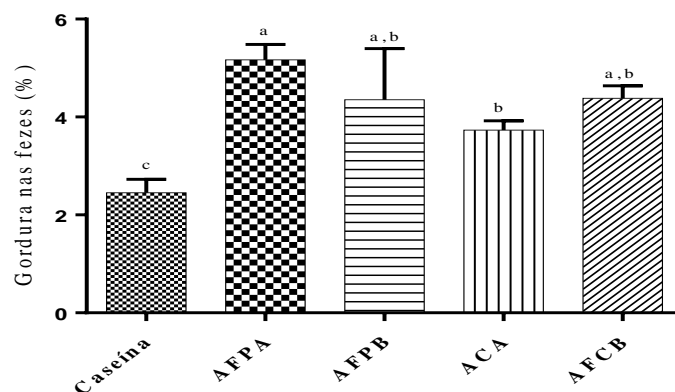
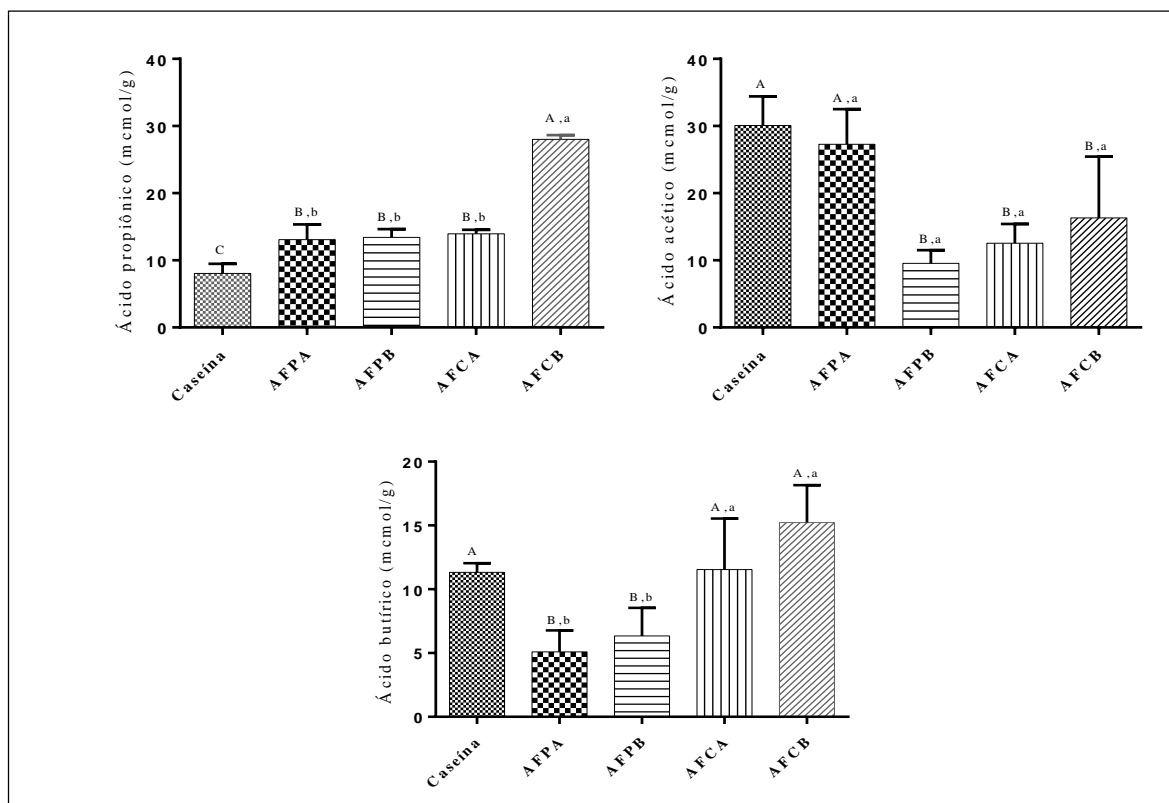


Figura 1- Excreção de gordura fecal dos animais alimentados com caseína e com dietas contendo combinações de alimentos biofortificados (n=6), período de 28 dias. AFCA: Arroz+ Feijão Caupi+ Abóbora; AFPA: Arroz + Feijão Pontal +Abóbora; Arroz + Feijão Caupi + Batata Doce; AFPB: Arroz + Feijão Pontal + Batata Doce . Diferentes letras maiúsculas indicam diferença entre si, pelo teste de Dunnett ( $p<0.05$ ). Diferentes letras minúsculas indicam diferença pelo teste de Newman-Keuls ( $p<0.05$ ).

Com relação à produção de AGCC, observou-se que o grupo AFCB apresentou maior ( $p<0,05$ ) produção de ácido propiônico em relação ao demais grupos experimentais, incluindo o controle. Além disso, esse grupo apresentou maior ( $p<0,05$ ) produção de ácido butírico, assim como o grupo AFCA, ambos contendo feijão caupi em sua combinação alimentar. A produção de ácido acético no grupo AFPA foi igual ao grupo controle ( $p\geq 0,05$ ), sendo superior ( $p<0,05$ ) aos demais grupos testes (**Figura 2**).



**Figura 2-** Concentração de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes dos animais alimentados com caseína e com dietas contendo combinações de alimentos biofortificados (n=6), período de 28 dias. AFCA: Arroz+ Feijão Caupi+ Abóbora; AFPA: Arroz + Feijão Pontal +Abóbora; Arroz + Feijão Caupi + Batata Doce; AFPB: Arroz + Feijão Pontal + Batata Doce. Análise por Cromatografia Gasosa. Diferentes letras maiúsculas indicam diferença entre si, pelo teste de Dunnett ( $p<0.05$ ). Diferentes letras minúsculas indicam diferença pelo teste de Newman-Keuls ( $p<0.05$ ).

#### 4.4 Discussão

O feijão pontal apresentou elevado conteúdo de fibra alimentar total (26,7%), próximos aos valores obtidos por Ramírez-Cárdenas e colaboradores (2008) em feijão Pérola cozido (26,1%) e superior ao encontrado por Silva, Rocha e Canniatti-Brazaca; (2009) (21,52%) no feijão BRS Pontal cru. Essa diferença entre os estudos podem estar relacionada ao processamento térmico aplicado, uma vez que o cozimento seguido do resfriamento dos feijões pode levar à retrogradação de amilose e formação de amido resistente, podendo ser quantificado como parte da fibra insolúvel (RAMÍREZ-CÁRDENAS et al.,2008). Quanto as frações, o feijão pontal apresentou elevada concentração de fibra alimentar solúvel (7,04%) sendo este resultado semelhante ao encontrado por Silva; Brigide e Canniatti-Brazaca (2013) para o feijão BRS Pontal (7,3%).

O feijão caupi apresentou menor conteúdo de fibra alimentar (15,53%) em relação ao feijão pontal, apresentando-se também inferior aos valores obtidos por Frota (2008) (19,4%) para a mesma variedade de feijão.

Com relação ao conteúdo de ácido fítico, ambas as variedades de feijão apresentaram valores semelhantes entre si e inferiores ao obtido por Moura e Canniatti-Brazaca (2006) (0,8mg/100g) e Canniatti-Brazaca; Silva (1999) (1,06mg/100g). Oliveira, Queiroz e Helbing (2001) obtiveram valores de ácido fítico em feijão carioca cozido de 11,2 mg/g, duas vezes maior do que o obtido em nosso estudo (5,4mg/g). A menor concentração de fitato encontrada neste estudo é uma vantagem pois, em condições fisiológicas normais o ácido fítico é capaz de interagir com proteínas, formando complexos insolúveis e tornando esse macronutriente indisponível para a absorção intestinal (DEVI et al., 2011).

A maior digestibilidade encontrada nos grupos contendo feijão caupi pode estar associada ao menor conteúdo de fibra alimentar solúvel e de compostos fenólicos em relação ao feijão pontal. A fibra alimentar solúvel e os compostos fenólicos podem formar complexos no conteúdo intestinal e impedir o acesso de enzimas digestivas, reduzindo a digestibilidade das proteínas (DEVI *et al.*, 2011). Mendes e colaboradores (2009) observaram valores de DV para o arroz de 92,12%, semelhante à caseína. Assim, pode-se evidenciar que as diferenças nos valores de DV entre as combinações alimentares foram decorrentes da diferença na composição química das variedades de feijão, caupi e pontal.

A combinação de diferentes fontes vegetais estudadas, como de um cereal, uma leguminosa e de uma hortaliça resultaram em valores de PER e NPR semelhantes aos da caseína, indicando elevado valor biológico das combinações proteicas. Diferentemente, Luján e colaboradores (2007) ao avaliarem o PER e NPR de variedades de feijões verificaram valores inferiores ao da caseína.

Os animais que consumiram dietas com combinações alimentares contendo feijão pontal, AFPA e AFPB, apresentaram níveis de glicose sanguínea inferiores aos animais que receberam a dieta controle. Esse resultado pode estar associado ao conteúdo de fibra alimentar, especialmente a fração solúvel, presente no feijão pontal, sendo este conteúdo superior ao feijão caupi. A fibra solúvel por torna-se viscosa quando combinada com água, retarda o contato da glicose com a área absorptiva intestinal, reduzindo, assim, a sua absorção. Além disso, as fibras podem aumentar a sensibilidade periférica à insulina (KENDALL; ESFAHANI; JENKINS, 2010).

O grupo AFPB apresentou menor concentração de ácido acético nas fezes, o que pode indicar uma maior absorção desse AGCC. Estudos sugerem que o acetato pode reduzir a glicemia, por meio da ativação da via hepática AMPK e redução da expressão de enzimas da gliconogênese (BOILLOT *et al.*, 1995; SAKAKIBARA *et al.*, 2006). Além

disso, o grupo AFPB apresentou maior concentração de ácido propiônico nas fezes em relação ao controle, indicando uma menor absorção deste AGCC. Sabe-se que o propionato pode atuar como precursor da gliconeogênese hepática, podendo estar associado com aumento da glicemia (REILLY; ROMBEAU, 1993).

No presente estudo não foram observadas diferenças significativas para o colesterol total e suas frações e nem para os triglicerídeos entre os grupos experimentais. Luhán e colaboradores (2008) também não encontraram diferença significativa quanto aos níveis de colesterol total sérico e triacilglicerídios em ratos normais alimentados com cinco variedades de feijão, em comparação com o controle (caseína).

Embora, não se tenha observado diferença nas concentrações de lipídios séricos, a excreção de gordura fecal dos animais alimentados com as dietas contendo combinações de alimentos biofortificados foi superior à excreção dos animais que receberam a dieta de caseína. Marques e colaboradores (2014) em um estudo *in vitro* observaram que os peptídeos do feijão caupi foram capazes de inibir a HMG-CoA redutase e reduzir a solubilização micelar do colesterol, aumentando assim a excreção de lipídeos fecal.

Alguns estudos tem associado a maior excreção de lipídios aos peptídeos hidrofóbicos do arroz. Esses peptídeos podem se ligar aos ácidos biliares e reduzir sua disponibilidade para formação de micelas, diminuindo assim o transporte micelar de lipídios e aumentando sua excreção fecal (CAM; MEJIA, 2012; UM *et al.*, 2013). Segundo Yang e colaboradores (2011) a proteína do arroz contém mais arginina e menos lisina em comparação à caseína. Essa maior proporção de arginina pode resultar na elevação da atividade da 7-alfa-hidroxilase, uma enzima limitante da velocidade da conversão de colesterol em ácidos biliares.

Além disso, os alimentos testados apresentavam elevado conteúdo de fibra alimentar solúvel, que pode retardar a digestão e a absorção da gordura, aumentando assim a sua excreção nas fezes. Corroborando com esse fato, Cherem e Bramosrki (2008) observaram maior excreção de lipídios nas fezes de animais alimentados com dieta hiperlipídica, suplementada com quitosana em comparação com a caseína.



#### **4.5 Conclusão**

O feijão BRS Pontal apresentou elevado conteúdo de fibra alimentar total, fitato e compostos fenólicos. A abóbora e a batata doce apresentaram elevado conteúdo de carotenoides e compostos fenólicos. A combinação de arroz e feijão, e estes com a abóbora e a batata doce biofortificadas apresentaram elevada qualidade proteica e ainda proporcionou uma melhora na qualidade nutricional das dietas, uma vez que, são excelentes fontes de carotenoides e fibra alimentar. As combinações alimentares aumentaram a excreção fecal de lipídeos, e as combinações contendo o feijão pontal apresentaram ação hipoglicemiante.

#### 4.6 Referências

ANDERSON, J. W.; SMITH, B. M.; WASNOCK, C. S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 464S-474S, 1999.

AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. **Official methods of analysis**. 19th ed. Gaithersburg, 2012.

AOAC - Association Of Official methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemistry**. 12th ed. Washington, D.C., 1975.

BENDER, A. E.; DOELL, B. H. Biological evaluation of proteins: a new aspect. **British Journal of Nutrition**, v. 11, n. 2, p. 140-148, 1957.

BOILLOT, J., ALAMOWITCH, C., BERGER, A.M., LUO, J., BRUZZO, F., BORNET, F.R., SLAMA, G. Effects of dietary propionate on hepatic glucose production, whole-body glucose utilization, carbohydrate and lipid metabolism in normal rats. **British Journal of Nutrition**, v.73, p.241-251, 1995.

BOUIS, H.E.; HOTZ, C.; MCCLAFFERTY, B.; MEENAKSHI, J.V.; PFEIFFER, W.H. Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 11, p.31-40, 2011.

CAM, A., MEJIA, E.G. Role of dietary proteins and peptides in cardiovascular disease. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.56, p.53-66, 2012.

CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; SILVA, F.C. Avaliação do aproveitamento do ferro de leguminosas por dálise *in vitro*. In: Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 20, São Paulo, 1999. **Resumos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 1999, 258 p.

CHEREM, A.R., BRAMOSRKI, A. Excreção de gordura fecal de ratos (*Rattus norvegicus*, *Wistar*), submetidos a dietas hiperlipídicas e hipercolesterolêmicas suplementadas com quitosana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, p.701-706, 2008.

CINTRA, R.M.G.C.; MAGALHÃES, C.O.; GARCIA, R.R.; MELLO, R.; PADILHA, A.; KUSAI, C.; CAETANO, L. Avaliação da qualidade da proteína de arroz e feijão e de dieta da região sudeste do Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v.18, p.283-289, 2007.

CRUZ, G.A.D.R.; OLIVEIRA, M.G.A.; COSTA, N.M.B.; PIRES, C.V.; CRUZ, R.S.; MOREIRA, M.A. Comparação entre a digestibilidade protéica *in vitro* e *in vivo* de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenados por 30 dias. **Alimentos e Nutrição**, v.16, p.265-271, 2005.

DEN BESTEN, G., VAN EUNEN, K., GROEN, A.K., VENEMA, K., REIJNGOUD, D.J., BAKKER, B.M. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **The Journal of Lipid Research**, v.54, p.2325- 2340, 2013.

DEVI, P.B., VIJAYABHARATHI, R., SATHYABAMA, S., MALLESHI, N.G., PRIYADARISINI, VB. Health benefits of finger millet (*Eleusine coracana* L.)

polyphenols and dietary fiber: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v.51, p.1021-1040, 2014.

ELLIS, R. MORRIS, R. Appropriate resin selections for rapid phytate analysis by ion-exchange chromatography. **Cereal Chemistry**, v.63, p.58-59, 1986.

FROTA, K.M.G.; SOARES, R.A.M.; ARÊAS, J.A.G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos de Campinas**, v.28, p.470-476, 2008.

HINNIG, P.F., BERGAMASCHI, D.P. Itens alimentares no consumo alimentar de crianças de 7 a 10 anos. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.15, p.324-34, 2012.

KANNAN, S.; NIELSEN, S.S.; MASON, A.C. Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores for Bean and Bean-Rice Infant Weaning Food Products, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.5070-5074, 2001.

KENDALL, C.W.C., ESFAHANI, A., JENKINS, D.J.A. The link between dietary fibre and human health. **Food Hydrocolloids**, v.24, p.42-48, 2010.

LATTA, M., ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.28, n.6, p. 1313-1315, 1908.

LUJÁN, D.L.B.; LEONEL, A.J.; BASSINELLO, P.Z.; COSTA, N.M.B. Variedades de feijão e seus efeitos na qualidade protéica, na glicemia e nos lipídios sanguíneos em ratos, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.142-149, 2008.

MANISHA, C. et al. Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 11, p. 392-1398, 2003.

MARQUES MR, FREITAS RAMSF, CARLOS ACC, SIGUEMOTO ES; FONTANARI GG; ARÊAS JAG. Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilisation into micelles. **Food Chemistry**, v.168, p.288-293, 2014

MENDES, F.Q.; OLIVEIRA, M.G.; COSTA, N.M.; PIRES, C.V.; HOFFMAM. Z.B. Qualidade proteica de diversos alimentos, incluindo diferentes variedades de soja. **Alimentos e Nutrição**, v.20, p. 77-86, 2009.

MOURA, N.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Avaliação da disponibilidade de ferro de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em comparação com carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos de Campinas**, v.26, p. 270-276, 2006.

MUTHAYYA, S.; RAH, J.H.; SUGIMOTO, D.J.; ROOS, F.F.; KRAEMER, K.; BLACK, R.E. The Global Hidden Hunger Indices and Maps: An Advocacy Tool for Action, **Plos One**, v.8, p.1-12, 2013.

OLIVEIRA, A.C.; QUEIROZ, K.S.; HELBING, E. O processamento doméstico do feijão comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos, taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência rafinose, estaquiase e verbascose. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 51, n. 3, p. 276-283, 2001.

PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. et al. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1-2, p. 145-151, 1998.

RAMÍREZ-CÁRDENAS, L.A.; LEONEL, A.J.; COSTA, N.M.B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 200-213, 2008.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H. et al. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, n.11, p.1939-51,1993.

REILLY, K. J., ROMBEAU, J.L. Metabolism and potential clinical applications of short-chain fatty acids. **Clinical Nutrition**. v.12 S97-S105, 1993.

RODRIGUEZ, D.B., RAYMUNDO, L.C., LEE, T.C., SIMPSON, K.L., CHICHESTER, C.O. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. **Annals of Botany**, v.40, p. 615-624, 1976.

SAKAKIBARA, S., YAMAUCHI, T., OSHIMA, Y., TSUKAMOTO., Y., KADOWAKI, T. Acetic acid activates hepatic AMPK and reduces hyperglycemia in diabetic KK-A(y) mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.344, p. 597-604, 2006.

SILVA, A.G., ROCHA, L.C., CANNIATTI BRAZACA, S.G. Caracterização físico-química, digestibilidade protéica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.20, p.591-598, 2009.

SILVA, M.O., BRIGIDE, P., CANNIATTI- BRAZACA, S.G. Caracterização da composição centesimal e mineral de diferentes cultivares de feijão comum crus e cozidos, **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 24, n. 3, p. 339-346, 2013.

SILVA, R.G.V. Caracterização físico-química de farinha de batata-doce para produtos de panificação. 2010. Dissertação (Mestrado) - **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**, Bahia, 2010.

SINGLETON, V.L., RUDOLF, O., LAMUELA-RAVENTÓS, R.M., et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: (Ed.) **Methods in Enzymology**: Academic Press, v.299, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, p.152-178.

SMIRICKY-TJARDES, M.R., GRIESHOP, C.M., FLICKINGER, E.A., BAUER, L.L., FAHEY, G.C. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2535-2545, 2003.

SOUSA, A.G.O., FERNANDES, D.C., NAVES, M.M.V. Eficiência alimentar e qualidade proteica das sementes de baru e pequi procedentes do Cerrado brasileiro. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, p.274-80, 2012.

TAKO, E.; HOEKENGA, O.A.; KOCHIAN, L.V.; GLAHN, R.P. High bioavailability iron maize (*Zea mays* L.) developed through molecular breeding provides more

absorbable iron in vitro (Caco-2 model) and in vivo (Gallus gallus), **Nutrition Journal**, v.12, p.1-11, 2013.

UM, M.Y., AHN, J., C.H., HA, T.Y. Cholesterol-lowering Effect of Rice Protein by Enhancing Fecal Excretion of Lipids in Rats. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 18, p. 210-213, 2013.

WOO, K. K. et al.. Effect of resistant starch from corn or rice on glucose control, colonic events, and blood lipid concentrations in streptozotocininduced diabetic rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, n. 3, p. 166-172, 2003.

YANG, L., CHEN, J., XU, T., QIU, W., ZHANG, Y., ZHANG, L., XU, F., LIU, H. Rice protein extracted by different methods affects cholesterol metabolism in rats due to its lower digestibility. **International Journal of Molecular Science**, v.12, p.7594-7608, 2011.

## 5. ARTIGO II

### **Rice and bean combined with pumpkin and sweet potato regulate transcriptional mechanisms favoring the bioavailability of iron**

#### **ABSTRACT**

The objective was to evaluate the effect of combinations of beans and rice, and these with sweet potato and pumpkin biofortified on the bioavailability of iron, gene expression of proteins involved in iron metabolism and the antioxidant effect. Bioavailability of the iron was measured by depletion/repletion method. Seven experimental groups were tested (n=7): Pontal Bean (PB); Rice + Pontal Bean (R+BP); Pontal Bean + Sweet Potato (PB+SP); Pontal Bean + Pumpkin (PB+P); Pontal Bean + Rice + Sweet Potato (PB+R+SP); Pontal Bean + Rice + Sweet Potato (PB+R+SP); Positive Control (Ferrous Sulfate). It was determined: Hemoglobin gain (HG), Hemoglobin Regeneration Efficiency (HRE) and Biological Relative Value of HRE. It was evaluated the gene expression of DMT-1 DcytB, ferroportin, hephaestina, transferrin and ferritin as well as the total plasma antioxidant capacity (TAC). The test groups showed higher HRE ( $p<0.05$ ) than the control, except the PB group. The animals fed with biofortified foods with carotenoids had higher ( $p<0.05$ ) expression of DMT-1, DcytB and ferroportin. All groups except the PB showed similar TAC ( $p\geq 0.05$ ). The combination of rice and beans, and these with foods rich in carotenoids increased gene expression of proteins involved in iron metabolism, favoring its bioavailability and antioxidant capacity.

**Keywords:** gene expression, antioxidant capacity, iron, carotenoids, biofortification.

---

#### **5.1 Introduction**

A deficiency of micronutrients, collectively known as hidden hunger, affects approximately two billion people worldwide. The iron deficiency is the most prevalent nutrient deficiency worldwide affecting about 40% of the world population, particularly women and children in developing countries [1,2].

Global efforts to reduce the incidence of this nutritional deficiency have been directed to the increasing consumption of micronutrient supplementation through fortification and biofortification of food. The biofortification of staple crops is a new public health approach to control vitamin A deficiency, iron and zinc in poor countries. The biofortification produces foods with higher micronutrient concentrations by the best practices of breeding and modern biotechnology [3,4].

However, there is a need to assess the effect of interactions between biofortified foods consumed in the same diet [5], because the concomitant intake of food influences the bioavailability of nutrients. Moreover, increased consumption of iron [6] and vitamin can influence the content and activity of antioxidant enzymes [7,8].

Iron fortification is often ineffective due to concomitant deficiency of vitamin A, as the consumption of this vitamin has a close relationship with the iron status. Studies in animals and humans, have shown a relationship between vitamin A deficiency and iron deficiency anemia [9,10,11,12].

Furthermore, the increase in iron concentration in food crops may not necessarily translate into a proportionate increase in the absorbed iron, as crop varieties with high concentrations of iron can have increased or decreased concentrations of inhibitors or enhancers of iron absorption. Therefore, it is necessary to analyze the concentration of iron and its bioavailability in new cultures with high concentrations of mineral and carotenoids [13]. Moreover, the body's need for iron is the most important factor that governs the absorption, this homeostasis is regulated by transcriptional mechanism, with the regulation of gene expression of proteins involved in iron metabolism [14].

Some studies have assessed the availability of iron biofortified crops such as beans [15,16,17] and iron bioavailability of iron fortified rice [18,19]. However, they are not yet studies on the bioavailability of iron from combinations of food inserted into the biofortification micronutrient program. Thus, it is essential to evaluate both the bean bioavailability of iron, such as the combination of this with rice and sweet pumpkin and potato biofortified in carotenoids.

The biofortification program with iron has not been successful in increasing the levels and the bioavailability of iron to desired levels and that may impact on nutritional status in animals and in humans [20]. The association with vitamin A sources can be an alternative to improve the effectiveness of biofortification on human health. Thus, the objective of the study was to evaluate the effect of food combinations of beans and rice, and these with sweet potato and pumpkin biofortified in carotenoids on the bioavailability of iron, gene expression of proteins involved in iron metabolism and the antioxidant effect.

## 5.2 Experimental Section

### 5.2.1 Setting and Sample

We evaluated the bean BRS Pontal, white rice Chorinho, pumpkin and sweet potato inserted in the biofortification program micronutrient. Foods were developed and supplied by the Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA. For the production of flour used in the diet, rice and beans were previously boiled and dried in air oven for 17 hours at 60°C [21]. The pumpkin and sweet potato were peeled and sliced on multiprocessor and dried in air oven for 6 hours at 60 ° C [22]. All foods were ground by mill 090 CFT at 3000 rpm, sieved (600 mesh screen) and stored at -12 ° C.

### 5.2.2 Minerals of biofortified foods and iron concentration of diets

The determination of mineral content of food and the iron content of the diet was performed according to Gomes (1996) [23]. Briefly, 1.0 g of the sample was digested with 10 mL of nitric acid in the digester block with exhaust to approximately 120 ° C. The reading was held on an atomic absorption spectrophotometer. For this analysis, calibration curves were used to prepared standard solutions of known iron concentration. We determined the concentrations of iron and zinc (Table 8).

### 5.2.3 Carotenoids in pumpkin and sweet potato

The concentration of pro-vitamin A carotenoids ( $\alpha$  and  $\beta$ -carotene) was determined by Rodriguez et al. (1976) [24]. About 3 to 5 g of sample were ground in 60 mL of chilled acetone for approximately 2 minutes. The material was then vacuum filtered on Buchner funnel using filter paper. Then, the filtrate was transferred to a separatory funnel, in which were added 50 ml of cooled petroleum ether, to transfer the pigment to the acetone ether. Each fraction was washed three times with distilled water to remove all acetone. The concentration of material was made by evaporation of the petroleum ether extract using a rotary evaporator at 35 ° C. The pigments were redissolved in a known amount of petroleum ether and stored in amber glass vials at -18 ° C.

For analysis, an aliquot (2 mL) of the extract stored in petroleum ether was evaporated under nitrogen flow and then recovered in the same amount of methanol and filtered through a 0.45  $\mu$ m filter unit with porosity. The analyzes of carotenoids were performed by high performance liquid chromatography (HPLC), following the chromatographic conditions developed by Pinheiro-Sant'Ana *et al.*(1998) [25]: HPLC-DDA system (detector diode array); chromatographic column Phenomenex Gemini RP-18, 250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m, equipped with Phenomenex ODS guard column (C18), 4 mm x 3 mm; The



mobile phase was methanol: ethyl acetate: acetonitrile (80:10:10, v / v / v) at flow rate of 2.0 ml / min.

#### 5.2.4 Phytate and phenolic compounds

Phytate content was determined by ion exchange and spectrophotometry according to Latta and Eskin (1980) [26], with modifications by ELLIS and MORRIS (1986) [27]. The determination of the concentration of phenolic compounds in foods was performed in triplicate using the Folin Ciocalteu reagent as described by Singleton et al. (1999) [28].

**Table 8.** Chemical composition and phytate/iron and zinc/iron molar ratio of flours food inserted in the biofortification program\*, on a dry basis

	<b>Pontal Bean</b>	<b>Rice</b>	<b>Pumpkin</b>	<b>Sweet Potato</b>
Moisture (g.100g <sup>-1</sup> )	10,7 <sup>a</sup> ±0,28	7,35 <sup>d</sup> ±0,06	9,99 <sup>ab</sup> ±0,55	9,92 <sup>b</sup> ±0,06
Ash (g.100g <sup>-1</sup> )	3,14 <sup>b</sup> ±0,03	0,34 <sup>c</sup> ±0,02	6,38 <sup>a</sup> ±0,07	2,27 <sup>d</sup> ±0,06
Lipids (g.100g <sup>-1</sup> )	1,37 <sup>b</sup> ±0,3	0,13 <sup>c</sup> ±0,13	1,46 <sup>b</sup> ±0,14	1,55 <sup>e</sup> ±0,34
Protein (g.100g <sup>-1</sup> )	18,86 <sup>b</sup> ±0,08	8,83 <sup>d</sup> ±0,18	15,86 <sup>c</sup> ±0,24	2,63 <sup>e</sup> ±0,12
Total dietary fiber (g.100g <sup>-1</sup> )	26,69 <sup>a</sup> ±0,45	1,08 <sup>c</sup> ±0,1	15,02 <sup>b</sup> ±0,03	15,31 <sup>b</sup> ±0,31
<i>Soluble fiber</i>	7,04±1,27	0,47	5,10±0,25	4,89±0,63
<i>Insoluble fiber</i>	19,64±0,92	0,61	9,92±0,23	10,42±0,38
Carbohydrates (g.100g <sup>-1</sup> )	48,87 <sup>bc</sup> ±0,73	82,48 <sup>a</sup> ±0,05	52,19 <sup>bc</sup> ±0,34	69,62 <sup>ac</sup> ±0,56
Total phenolic (mg de EqAG/g)	1,33 <sup>b</sup> ±0,15	0,06 <sup>d</sup> ±0,01	2,41 <sup>a</sup> ±0,12	1,51 <sup>b</sup> ±0,07
Carotenoids (mg/100g)	nd	nd	308,84 <sup>a</sup> ±1,98	127,11 <sup>b</sup> ±0,06
<b>Minerals</b>				
<i>Iron (mg/100g)</i>	7,52±0,1	3,9±0,03	2,09± 0,18	3,33±0,06
<i>Zinc (mg/100g)</i>	3,11±0,01	1,73±0,06	1,71±001	1,8±0,05
Phytic acid (g/100g)	0,51 <sup>a</sup> ± 0,02	0,20 <sup>b</sup> ± 0,03	0,03 <sup>c</sup> ± 0,32	0,10 <sup>c</sup> ± 0,1
<b>Molar Ratio</b>				
<i>Phytate/iron</i>	5,78	4,38	1,26	2,54
<i>Zinc/iron</i>	0,35	0,37	0,72	0,46

Data presented as mean and standard deviation. nd: not determined. Means with different letters in the same line present significative difference ( $p < 0.05$ ) by Tukey test. \*BIOFORT/ HarvestPlus

### 5.2.5 Animals and diets

It is a controlled experimental test, the method adopted for evaluating the bioavailability of iron was the hemoglobin depletion/repletion modified AOAC (2012) [29]. At 21 days of age, 49 male rats (*Ratus norvegicus albinus Wistar*) from the Central Animal Facility of the Center for Life Sciences and Health at Federal University of Viçosa. The animals were placed in individual temperature-controlled ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) cages, with a photoperiod of 12 h.

During the 21 days of the depletion phase, the animals received AIN-93G29 diet [30] modified (Table 9) using mixtures of mineral without iron and deionized water *ad libitum* for the induction of anemia.

In repletion phase the food inserted in biofortification micronutrient program were used as a source of iron, ferrous sulfate was used as positive control, and using a single level of iron, 12 mg of iron per kg of diet [31] for each treatment. The quantity of pumpkin and sweet potato added in the experimental diets was calculated to provide 4.5mg of vitamin A/kg of diet (Table 2). This value was based on the conversion of milligrams of vitamin A/gram of body weight of the study Mwanri et al. (2000) [32] with anemic children between 9 and 12 years old, supplemented with 1.5 mg of vitamin A/day, to assist in the recovery of iron status.

The 49 animals were placed into seven groups (n=7): 1) Pontal Bean; 2) Pontal Bean + Rice; 3) Pontal Bean + Pumpkin; 4) Pontal Bean + Sweet Potato; 5) Pontal Bean + Rice + Pumpkin; 6) Pontal Bean + Rice + Sweet Potato; 7) Control (containing ferrous sulfate as iron source). In this phase, the animals received deionized water *ad libitum* and controlled diet, approximately 18 g, for a period of 14 days.

On the 36th day, after fasting for 12 hours, the animals were anesthetized with isoflurane (Isoforine, Cristália®) and it were euthanized by cardiac puncture. It were collected blood and fragments of the liver and duodenum.

All experimental procedures with animals were performed in accordance with the ethical principles for animal experimentation and the study approved by the Ethics Committee of the Federal University of Viçosa.

**Table 9.** Food and nutritional composition of experimental diets.

	Standard diet without iron	Standard diet with iron (Ferrous Sulfate)	Pontal Bean	Pontal Bean and Rice	Pontal Bean and Pumpkin	Pontal Bean and Pweet Potato	Pontal Bean, Rice and Pumpkin	Pontal Bean, Rice and Pweet Potato
<i>Ingredients (1kg of diet)</i>								
Ferrous Sulfate (mg)	-	120,98	-	-	-	-	-	-
Bean (g)	-	-	163,73	100,84	156,36	155,16	91,41	88,05
Rice (g)	-	-	-	100,84	-	-	91,41	88,05
Pumpkin (g)	-	-	-	-	25,56	-	25,56	-
Pweet Potato (g)	-	-	-	-	-	18,85	-	18,85
Albumin (g)	200,00	200,00	173,44	178,11	170,18	174,98	177,65	180,93
Dextrinized starch (g)	132,00	132,00	132,00	132,00	132,00	132,00	132,00	132,00
Sucrose (g)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Soybean Oil (mL)	70,00	70,00	67,71	68,62	67,85	67,87	69,88	69,88
Microcrystalline cellulose (g)	50,00	50,00	10,98	24,96	9,33	10,42	24,73	24,70
Mineral Mix without iron (g)	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00
Vitamin Mix (g)	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
L-cystine (g)	3,00	3,00	3,00	3,00	2,73	3,00	3,00	3,00
Choline Bitartrate (g)	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Corn starch (g)	397,50	397,50	337,89	309,32	333,10	337,20	305,41	302,83
<i>Nutritional composition</i>								
Total calories (Kcal)	3830,8	3830,8	3989,47	4105,9	4013,1	4028,6	4100,4	4093,5
Caloric density (Kcal/g)	3,83	3,83	3,98	4,1	4,01	4,02	4,1	4,09
Vitamin A (mg/Kg)	1,20	1,20	1,20	1,20	5,70	5,70	5,70	5,70
Iron (mg/Kg)	0,30	20,4*	23,7±0,81*	19,7±0,68*	26,3±4,7*	22,5±0,09*	23,9±3,62*	22,7±0,82*
Phytate (g/100g)	nd	nd	0,83	0,72	0,805	0,81	0,63	0,66
Phytate: iron molar ratio	nd	nd	29,81 <sup>a</sup> ±1,01	30,79 <sup>a</sup> ±1,07	30,25 <sup>a</sup> ±0,12	26,89 <sup>a</sup> ±4,8	22,88 <sup>a</sup> ±3,46	24,86 <sup>a</sup> ±0,9
Zinc: iron molar ratio			0,18 <sup>a</sup> ± 0,006	0,21 <sup>a</sup> ±0,007	0,2 <sup>a</sup> ±0,0008	0,17 <sup>a</sup> ±0,03	0,17 <sup>a</sup> ±0,02	0,18 <sup>a</sup> ±0,006

\* Analyzed according to the methodology proposed by Gomes (1996). Nd: not determined. Means with different letters in the same line present significative difference ( $p < 0.05$ ) by Tukey test.

### 5.2.6 Blood tests

Serum hemoglobin was measured by cyanide methemoglobin method, proposed by the AOAC (2012) [29], using colorimetric kit for in vitro diagnosis. The volume of 10L blood was pipetted and mixed with 5 ml of Drabkin's solution color reagent (containing potassium cyanide, and hydrogen cyanide). The reading of absorbance was done in UV-Visible Multiskan (Thermo Scientific) at a wavelength of 540 nm.

### 5.2.7 Iron bioavailability

The iron bioavailability was calculated according to Hernandez et al. (2003) [33]. The hemoglobin regeneration efficiency (ERH%) was calculated by the expression:  $ERH\% = [(mg\ Fe\ end\ Hb - mg\ Fe\ initial\ Hb) / 100] / mg\ Fe\ consumed$ . The iron in hemoglobin content was estimated by:  $[Body\ weight\ (g) * Hb\ (g / L) * 0.335 * 6.7] / 1000$ . This variable was calculated assuming a total blood volume to be 6.7% of the mouse body weight and body iron in hemoglobin content as being 0.335. The use of iron was calculated as:  $[ERH\% * \% \text{ dietary iron}] / 100$ , and the absorption of iron was calculated as:  $[Fe\ intake - excretion\ Fe] / Fe\ intake$ .

### 5.2.8 Extraction of mRNA and expression of proteins involved in iron metabolism

The organs were macerated in liquid nitrogen in RNase free conditions and samples were aliquoted for total RNA extraction. Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using the manufacturer's recommendations as follows: 100 mg tissue was homogenized in 1 ml of TRIzol. After extraction with chloroform (0.2 mL/1 mL TRIzol), the aqueous phase of the RNA was precipitated with isopropyl alcohol (0.5 mL/100 mg of tissue) and the tubes were centrifuged at 10000g/4 °C, the washed mRNA with 75% ethanol and centrifuged at 9500g for 5 minutes at 4 °C. The pellet was resuspended in 50 uL of water treated with diethylpyrocarbonate (DEPC).

After extraction, RNA samples were treated with DNase (RQ1 RNase-free DNase kit; Promega, Madison, WI, USA) using the manufacturer's protocol: 7 uL of sample was transferred to a new tube and treated with 1 uL of 10x DNase buffer and 2 uL of DNase (Invitrogen Brazil Ltda) and left at room temperature for 15 minutes, to the action of the DNase enzyme. After this period, it was added 1 uL of EDTA and the samples were left in water bath at 60°C for 8 minutes. Total RNA was quantified at 260nm in a spectrophotometer, and the degree of purity was quantified by the optical density reason 260 / 280nm.

The isolated total RNA was used to fabricate the cDNA using M-MLV Reverse Transcription kit (Invitrogen Corp., Grand Island, NY) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 2 uL of mRNA extracted at a concentration of 200. uL<sup>-1</sup> was added to 1 uL of 100 uM oligo dT, and 1 uL 10 uM dNTPs diluted and incubated at 65°C for 5 minutes. Subsequently the mixture was placed on ice and added 4 uL 5x buffer FF 2µL of 0.1 M DTT and 1 ul of RNase Out. Then it was added 1 uL of MMLV reverse transcriptase (200 U/uL) and incubated in water bath at 37°C for 1 hour. Finally, the cDNA was incubated at 70°C for 10 minutes and quantified similarly to RNA.

*Determination of gene expression of proteins involved in iron metabolism by Reverse Transcriptase Chain Reaction (RT-PCR)*

Expression of mRNA levels in the duodenal mucosa and the liver of proteins involved in iron metabolism were analyzed by Reaction technique of real-time Polymerase Chain (RT-PCR). The markers SYBR green PCR master mix from Applied Biosystems (Foster City, CA) and analyzes were performed in equipment StepOne™ Real-Time PCR System was used (Thermo Fisher Scientific) using the measurement system by SYBR-Green Fluorescence and Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR involves initial denaturation cycle of 95 ° C (10 min.) And then 40 cycles with 1 min. denaturation (94 ° C), 1 minute annealing (56 ° C) and 2 minutes elongation (72 ° C), followed by standard dissociation curve. Primer sequences were used (Choma Biotechnologies) sense and antisense to protein divalent metal carrier (DMT-1), duodenal cytochrome b (DcytB), ferroportin, hephaestina the duodenum and liver proteins: ferritin and transferrin (Table 10). The relative expression levels of mRNA were normalized by endogenous control glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) to rats. All steps were performed in open conditions RNase.

**Table 10.** Sequence of primers used in the RT-PCR analysis.

Genes	Oligonucleotide (5'-3')	
	Forward	Reverse
<b>GAPDH</b>	AGGTTGTCTCCTGTCACTTC	CTGTTGCTGTAGCCATATTC
<b>DMT-1</b>	CTGATTTACAGTCTGGAGCAG	CACTTCAGCAAGGTGCAA
<b>DcytB</b>	TGCAGACGCAGAGTTAAGCA	CCGTGAAGTATAACCGGCTCC
<b>Ferroportin</b>	TTCCGCACTTTTCGAGATGG	TACAGTCGAAGCCCAGGACCGT
<b>Hephaestin</b>	GGCACAGTTACAGGGCAGAT	AGTAACGTGGCAGTGCATCA
<b>Ferritin</b>	CAGCCGCCTTACAAGTCTCT	ATGGAGCTAACCGCGAAGAC
<b>Transferrin</b>	AGCTGCCACCTGAGAACATC	CGCACGCCCTTTATTCATGG

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; DMT-1: Divalent metal transporter-1 Protein; DcytB: Duodenal cytochrome B.

### 5.2.9 Antioxidant Capacity total plasma

The total plasma antioxidant capacity was measured by a colorimetric method with the Sigma kit (Sigma-Aldrich). The concentration of antioxidants in plasma was expressed as mM Trolox equivalent.

For the procedure, the lyophilized trolox standard was reconstituted by the addition of 2.67 ml of 1X assay buffer. For the preparation of ABTS substrate solution, an ABTS tablet and a phosphate citrate buffer tablet was added to 100 ml of ultrapure water. Subsequently were added 37.5 uL of hydrogen peroxide solution 3% to 15 ml ABTS substrate solution. The assay buffer was diluted 10 times in ultrapure water. The lyophilized myoglobin was reconstituted in 285 uL of ultrapure water, and before use it was diluted 100 times in 1X buffer (myoglobin working solution). After, 190 uL of assay buffer 1X was added to microfuge tubes containing 10 uL plasma. Initially, it was pipetted in the center of the well Elisa plate 10 uL of trolox standards in duplicate with increasing concentrations. Aliquots of 10 uL of plasma was added to the remaining wells identified for the samples. To all the wells was added 20 uL of the myoglobin working solution, 150 uL of ABTS substrate solution with hydrogen peroxide. The plate was covered with adhesive and incubated at room temperature for 5 minutes. After incubation, was added 100 uL of stop solution previously heated. The reading of absorbance was done at 405 nm in a spectrophotometer. For the calculation it used the straight line equation ( $y = -1,3565x + 0.6823$ ) obtained by the construction of the calibration curve and the values were expressed in mM.

### 5.2.10 Statistical Analysis

The treatments were conducted with animals a completely randomized design. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by average tests for comparison Dunnett test groups with control and comparison of all experimental groups was performed Tukey test. Analyses were performed in GraphPad Prism version 5.0 software considering a 5% significance level.

### 5.3 Results

The weight gain, feed intake and feed efficiency coefficient (FEC) of the experimental groups showed no statistical difference ( $p \geq 0.05$ ) (Table 11).

**Table 11.** Weight gain, feed intake and feed efficiency coefficient of Wistar rats (n=7).

	WG	FI	FEC
<b>FS</b>	57,6 <sup>a</sup> ±4,32	218,96 <sup>a</sup> ± 4,92	0,23 <sup>a</sup> ±0,02
<b>PB</b>	43,0 <sup>a</sup> ±8,0	217,28 <sup>a</sup> ±7,72	0,21 <sup>a</sup> ±0,03
<b>PB+R</b>	45,0 <sup>a</sup> ±4,0	221,76 <sup>a</sup> ±11,14	0,21 <sup>a</sup> ±0,01
<b>PB+P</b>	48,8 <sup>a</sup> ±10,24	213,59 <sup>a</sup> ±6,64	0,21 <sup>a</sup> ±0,06
<b>PB+SP</b>	49,6 <sup>a</sup> ±11,92	214,46 <sup>a</sup> ± 15,48	0,22 <sup>a</sup> ±0,03
<b>PB+R+P</b>	52,33 <sup>a</sup> ±5,78	216,97 <sup>a</sup> ± 5,59	0,23 <sup>a</sup> ±0,02
<b>PB+R+SP</b>	43,6 <sup>a</sup> ±5,28	220,04 <sup>a</sup> ±7,57	0,21 <sup>a</sup> ±0,02

Data presented as mean and standard deviation. FS: ferrous Sulfate; PB: Pontal Bean; PB+R: Pontal Bean + Rice; PB+P: Pontal Bean + Pumpkin; PB+SP: Pontal Bean + Sweet Potato; PB+R+P: Pontal Bean + Rice + Pumpkin; PB+R+SP: Pontal Bean + Rice + Sweet Potato WG: weight gain; FI: feed intake; FEC: feed efficiency coefficient.

#### 5.3.1 Effect of food intake combinations biofortifying inserted into nutrient program on the bioavailability of iron.

It was observed that the groups fed diets containing biofortified foods with iron and carotenoids had hemoglobin gain similar to the positive control group receiving iron as a source of iron ( $p \geq 0.05$ ) (Table 12). The animals fed diets containing only the spit beans had HG and HRE inferior to the control and other test groups ( $p < 0.05$ ). By associating the spit beans and rice (PB+R) the HB remained lower than the control, but the HRE was higher ( $p < 0.05$ ) and similar to the control test group ( $p \geq 0.05$ ).

**Table 12.** Total intake of iron and vitamin A and indices for assessing iron bioavailability (n=7).

	<b>Fe Intake</b>	<b>Vitamin A Intake</b>	<b>HG</b>	<b>%HRE</b>	<b>RBV-HRE</b>
<b>FS</b>	6,75 <sup>a</sup> ±0,19	0,39 <sup>b</sup> ±0,01	6,9 <sup>A</sup> ±1,95	76,92 <sup>B</sup> ±0,14	-
<b>PB</b>	5,13 <sup>bc</sup> ±0,28	0,39 <sup>b</sup> ±0,02	2,6 <sup>Bb</sup> ±1,33	60,71 <sup>Cb</sup> ±0,15	0,79 <sup>b</sup> ±0,2
<b>PB+R</b>	4,28 <sup>e</sup> ±0,33	0,39 <sup>b</sup> ±0,03	3,84 <sup>Ba</sup> ±1,03	87,52 <sup>Aa</sup> ±0,16	1,14 <sup>a</sup> ±0,21
<b>PB+P</b>	4,6 <sup>de</sup> ±0,38	1,29 <sup>a</sup> ±0,11	4,85 <sup>Aa</sup> ±1,16	86,75 <sup>Aa</sup> ±0,12	1,13 <sup>a</sup> ±0,16
<b>PB+SP</b>	5,37 <sup>b</sup> ±0,67	1,28 <sup>a</sup> ±0,16	5,77 <sup>Aa</sup> ±2,6	86,72 <sup>Aa</sup> ± 0,24	1,13 <sup>a</sup> ±0,32
<b>PB+R+P</b>	5,2 <sup>bc</sup> ±0,15	1,37 <sup>a</sup> ±0,04	4,72 <sup>Aa</sup> ±1,56	81,65 <sup>Aa</sup> ±0,12	1,06 <sup>ab</sup> ±0,15
<b>PB+R+SP</b>	4,81 <sup>cd</sup> ±0,37	1,33 <sup>a</sup> ±0,1	4,97 <sup>Ab</sup> ± 1,85	85,72 <sup>Aa</sup> ± 0,24	1,05 <sup>ab</sup> ±0,33

Data presented as mean and standard deviation. FS: ferrous Sulfate; PB: Pontal Bean; PB+R: Pontal Bean + Rice; PB+P: Pontal Bean + Pumpkin; PB+SP: Pontal Bean + Sweet Potato; PB+R+P: Pontal Bean + Rice + Pumpkin; PB+R+SP: Pontal Bean + Rice + Sweet Potato. HG: Hemoglobin Gain; HRE: Hemoglobin maintenance efficiency; RBV: Relative Biological Value of HRE.

Means followed by different capital letters in columns differ by Dunnett's test ( $p < 0.05$ ).

Means followed by different small letters differ by Tukey test ( $p < 0.05$ ).

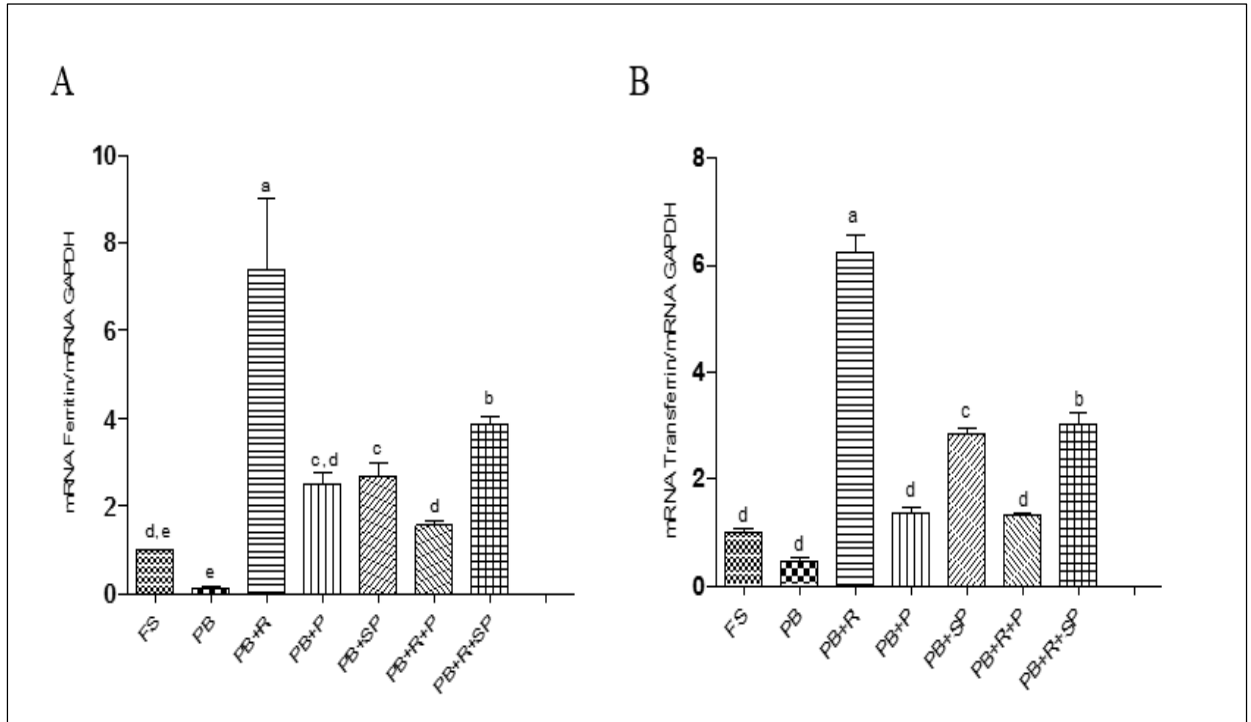
### 5.3.2 Gene expression of proteins involved in iron metabolism

The PB+R group showed higher expression of ferritin (Fig.3.A) and transferrin (Fig 3.B) ( $p < 0.05$ ), followed by PB+R+SP group. Furthermore, the level of expression of these two proteins was proportional in all groups.

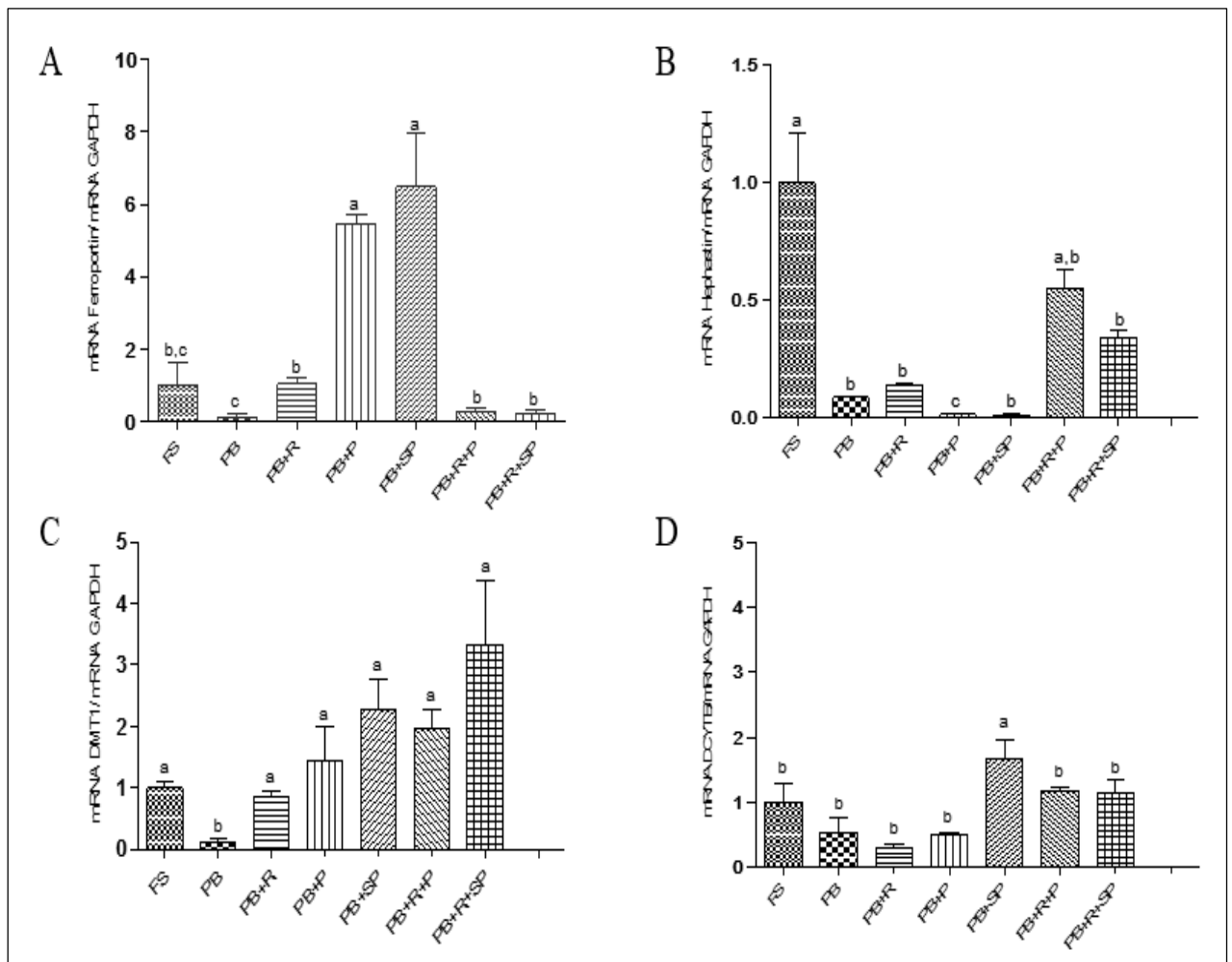
The animals fed diets containing only beans spit had lower gene expression of proteins involved in iron metabolism, which may explain the lower HRE ( $p < 0.05$ ). Additionally, groups containing food biofortified beans and spit with carotenoids (PB and PB+R+SP) had increased mRNA expression ferredutase DcytB (Fig. 4.D) and ferroportin (Fig. 4.A).

The mRNA hephaestina was more expressed ( $p < 0.05$ ) in the control group and the groups receiving diets containing rice, bean and biofortified foods with carotenoids (PB+R+P and PB+R+SP) (Fig. 4.B).





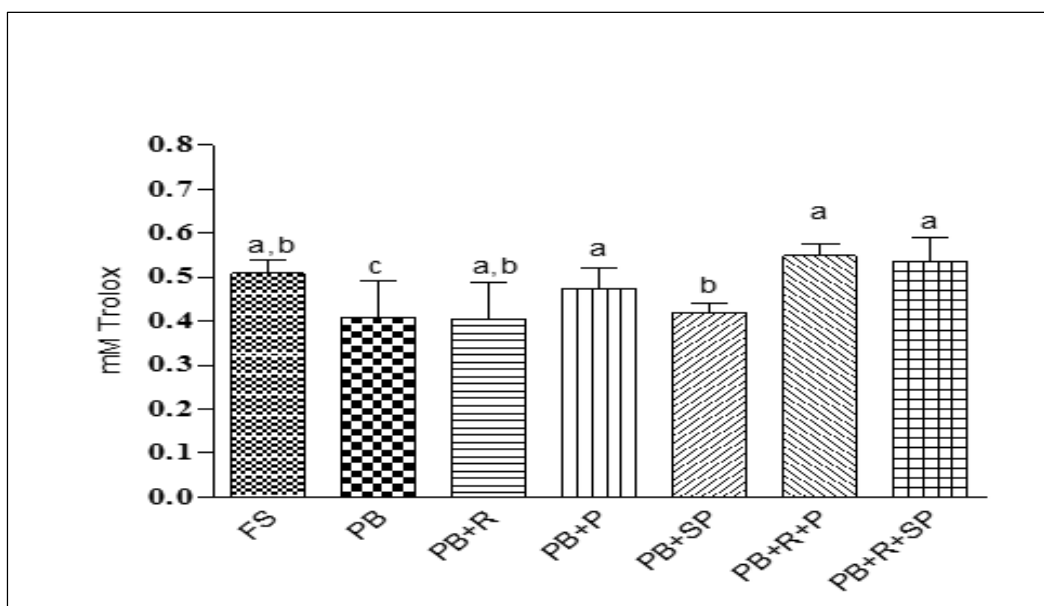
**Figure 3.** Effect of the ingestion of different combinations of food inserted in micronutrients biofortification program and ferrous sulfate on the gene expression of proteins in liver tissue. RT-PCR Analysis. (A) Ferritin, (B) Transferrin. FS: Sulfate Ferrous; PB: Pontal Bean; PB+R: Pontal Bean + Rice; PB+A: Pontal Bean + Pumpkin; PB+SP: Pontal Bean + Sweet Potato; PB+R+P: Pontal Bean + Rice + Pumpkin; PB+R+SP: Pontal Bean + Rice + Sweet Potato. Different letters indicate statistical differences at 5% probability by Tukey test.



**Figure 3.** Effect of the ingestion of different combinations of food inserted in micronutrients biofortification program and ferrous sulfate on the gene expression of proteins in duodenal tissue. RT-PCR Analysis. (A) Ferroportin, (B) Hephastin, (C) DMT-1, (D) Dcytb. FS: Sulfate Ferrous; PB: Pontal Bean; PB+R: Pontal Bean + Rice; PB+A: Pontal Bean + Pumpkin; PB+SP: Pontal Bean + Sweet Potato; PB+R+P: Pontal Bean + Rice + Pumpkin; PB+R+SP: Pontal Bean + Rice + Sweet Potato. Different letters indicate statistical differences at 5% probability by Tukey test.

### 5.3.3 Effect of the ingestion of food placed in nutrient biofortifying program on total plasma antioxidant capacity

The group only fed Pontal Bean showed lower ( $p < 0.05$ ) antioxidant capacity (Figure 5). The other tested groups that bean was associated with rice, pumpkin and sweet potato was similar ( $p \geq 0.05$ ) to control.



**Figure 5.** Total Antioxidant capacity of the plasma. Results are expressed in equivalent mmol Trolox. FS: Sulfate Ferrous; PB: Pontal Bean; PB+R: Pontal Bean + Rice; PB+A: Pontal Bean + Pumpkin; PB+SP: Pontal Bean + Sweet Potato; PB+R+P: Pontal Bean + Rice + Pumpkin; PB+R+SP: Pontal Bean + Rice + Sweet Potato. Different letters indicate statistical differences at 5% probability by Tukey test.

#### 5.4 Discussion

Several studies have been demonstrating increased bioavailability of iron biofortified foods such as rice and bean [17, 14, 34, 19]. However, the effect of the combination of biofortified foods with iron, zinc and carotenoids on the bioavailability of iron had not yet been tested. Our results show the importance of combining these foods in the diet in order to increase the iron content and enhancers compounds of the absorption of the same, and to minimize the negative effect of phytochemicals.

The association of basic foods that is usual intake in Brazil, such as rice and beans, and them associating with biofortified vegetables with carotenoids increased the bioavailability of iron. Vitamin A can act in iron mobilization of stocks of organic tissues, favoring the availability of this mineral for hematopoiesis and hemoglobina synthesis [35]. Additionally, vitamin A has been associated with the gene expression of hepcidin in the liver, hormone that regulates uptake and export of endogenous iron in organism [36].

Some studies have demonstrated an association between vitamin A and iron metabolism, however none evaluated biofortified food intake in the normal diet in Brazilian, demonstrating the significance of association with the legumes and cereals, vegetables or biofortified [9,10,12].

The molar ratio phytate: iron does not differ among diets, with around 27.6:1. Studies in humans and in vitro showed that the molar ratio of phytate: iron from 4:1 to 30:1 could significantly inhibit the absorption of iron [16,37,38,39]. The combination of pinto bean with food biofortified with carotenoids favored iron absorption, even in diets with high molar ratio phytate: iron. Rats have the intestinal phytase, but studies show that young rats, weanling, as the animals in this study, have low activity of this enzyme [4]. If phytase had acted only the group fed with pinto beans would have presented iron bioavailability similar to ferrous sulfate. Thus, the most likely case is that vitamin A bound with iron to form a complex which acts as a chelating agent prevents the inhibitory effect of phytate on the iron absorption [40,41].

In this fact, animals which received an additional dose of carotenoid showed enhanced expression of DMT-1, and DcytB ferroportin, which also may have assisted in increasing the uptake and incorporation of iron in the hemoglobin resulting in higher Hb values. Vitamin A has been associated with the regulation of the synthesis of DMT-1 proteins and ferroportin [36].

The PB group showed lower HG than other groups and to correct the iron consumption by iron incorporated into hemoglobin remained the lowest value of HRE. The worst performance of this group may be associated with a lower mRNA expression of DMT-1 and ferroportin, proteins important for the absorption of iron and outsourcing enterocytes [42]. The lower expression of these proteins may also be associated with a lower antioxidant activity observed in this group, since oxidative stress can increase production hepcidin [43]. Increased hepcidin reduces gene expression of DMT-1 and ferroportin [42,44].

The molar ratio zinc: iron diets also did not differ, standing around 0.18:1. Tripathi, Platel e Srinivasan (2012) [45], in an in vitro study found that the molar ratio of zinc: iron 0.5 did not reduce the bioavailability of iron. However PB group showed lower bioavailability of iron compared to the other groups, which may also be associated with a reduced gene expression of DMT-1 observed in this group, since the iron and zinc protein that compete for absorption site [46].

Conversely, Tako et al (2013) [14] observed higher HG and HRE in birds consuming biofortified beans with iron compared to the common bean. Furthermore, observed lower gene expression of DMT-1, ferroportin and DcytB.

When the pinto bean was associated with rice (PB+R group) increased the bioavailability of iron, demonstrated by the indices HRE and RBV-HRE. This result may

be related to the fact that this combination provided an increased amount of sulfur amino acids such as cysteine, has been reported to promote the bioavailability of iron [4,47].

The PB+R group also increased the gene expression of ferritin and transferrin. This may have occurred because of low iron intake during the repletion phase, which may have caused an increase in gene expression of the transferrin in the liver tissue as a way to compensate for the reduced supply of this mineral. Increased gene expression of transferrin, in turn, increased iron transport to the liver leading to increased gene expression of ferritin, to store the transported iron. The increase in iron storage in the liver resulted in reduced availability for hematopoiesis, which was evidenced by the reduced HG displayed by this group.

The hephaestina mRNA was more expressed in the group fed the rice, beans and spit food biofortified with carotenoids (PB+R+P and PB+R+SP), suggesting an increase in iron transport into the bloodstream. However, this was not reflected in a significant difference in HG and HRE in the other groups, except for the PB group.

Another factor was that despite the high concentration of phenolic compounds in food, this did not affect the bioavailability of iron. Some studies have shown that it is possible neutralizer the inhibitory effect of iron absorption of phenolic compounds by increased iron concentration in food [17]. The high concentration of phenolic compounds in pumpkin and sweet potato may also have contributed to the increased antioxidant activity of food combinations.

The control group showed TAC tests similar to groups, except for the PB group. One possible explanation for this result is that the control group receiving ferrous sulfate as iron source in the diet. This form of iron is high bioavailability, resulting in increased iron absorption. The increase of iron in the liver tissue may increase the production of reactive oxygen species resulting in an increased activity of superoxide dismutase (SOD) [48], which may be responsible for this increase TAC group. In addition, the TAC has been evaluated in the plasma of animals in a 12 hour fast, some studies have found no difference in TAC animals in this state [49,50].

The group PB+R also presented TAC comparable to the groups supplemented with carotenoids. This group, despite not having consumed food biofortified with carotenoids, showed high gene expression of ferritin and transferrin, binding iron proteins that are also part of antioxidant defense system [51]. According Cornelis *et al.*, (2012) [52] the control of iron absorption prevents the accumulation of toxic levels of iron which can promote

the production of reactive oxygen species (ROS). Suggesting, as a link between the regulation of iron homeostasis and resistance to oxidative stress mechanisms.

## 5.5 Conclusions

The combination of rice and beans, and the combination of these with food biofortified in carotenoids increased gene expression of proteins involved in iron metabolism, favoring its bioavailability and antioxidant capacity.

## 5.6 References

1. Muthayya S, Rah JH, Sugimoto JD, Roos FF, Kraemer K, Black RE: The global hidden hunger indices and maps: an advocacy tool for action. *PLoS One* **2013**, 8:7860. 2.
2. WHO: Worldwide Prevalence of Anaemia 1993–2005. WHO Global Database on Anaemia. Geneva: World Health Organization; 2008.
3. Bouis, H.E.; Hotz, C.; McClafferty, B.; Meenakshi, J.V.; Pfeiffer, W.H. Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition. *Food Nut. Bull.* **2011**, 11, 31-40.
4. La Frano, M. R.; de Moura, F. F.; Boy, E.; Lönnerdal, B.; Burri, B. J. Bioavailability of iron, zinc, and provitamin A carotenoids in biofortified staple crops. *Nutr. Rev.* **2014**, 72(5), 289-307.
5. Casgrain, A.; Collings, R.; Harvey, L. J.; Boza, J. J.; Fairweather-Tait, S. J. Micronutrient bioavailability research priorities. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, 91(5), 1423-1429.
6. Alférez, M. J.; Díaz-Castro, J.; López-Aliaga, I.; Rodríguez-Ferrer, M.; Pérez-Sánchez, L. J.; Campos, M. S. Development of nutritional iron deficiency in growing male rats: haematological parameters, iron bioavailability and oxidative defence. *Br. J. Nutr.* **2011**, 105(04), 517-525.
7. Dragsted, L. O. Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers. *Eur. J. Nutr.* **2008**, 47(2), 3-18.
8. Aitken, R. J., & Roman, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2008**, 1, 15-24.
9. Zimmermann, M. B.; Biebinger, R.; Rohner, F.; Dib, A.; Zeder, C.; Hurrell, R. F., Chaouki, N. Vitamin A supplementation in children with poor vitamin A and iron status increases erythropoietin and hemoglobin concentrations without changing total body iron. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, 84(3), 580-586.
10. Arruda, S. F., de Almeida Siqueira, E. M., & de Valência, F. F. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition* **2009**, 25(4), 472-478. .
11. Mehdad, A.; Siqueira, E. M.; & Arruda, S. F. Effect of vitamin A deficiency on iron bioavailability. *Ann. Nutr. Metab.* **2009**, 57(1), 35-39.
12. Gondim, S. S. R.; Diniz, A. D. S.; Cagliari, M. P. P.; Araújo, E. D. S.; Queiroz, D. D.; Paiva, A. D. A. Relationship among hemoglobin levels, serum retinol level and nutritional status in children aged 6 to 59 months from the state of Paraíba, Brazil. *Rev. Nutr.* **2012**, 25(4), 441-449.

13. Glahn, R. P.; Lee, O. A.; Yeung, A.; Goldman, M. I.; Miller, D. D. Caco-2 cell ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *J. Nutr.* **1998**, 128(9), 1555-1561.
14. Tako, E.; Hoekenga, O. A.; Kochian, L. V.; Glahn, R. P. High bioavailability iron maize (*Zea mays* L.) developed through molecular breeding provides more absorbable iron in vitro (Caco-2 model) and in vivo (*Gallus gallus*). *Nutr. J.* **2013**, 12(3).
15. de Moura, N. C.; Canniatti-Brazaca, S. G. (2006). Avaliação da disponibilidade de ferro de feijão comum. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2006**, 26(2), 270-276.
16. Ariza-Nieto, M.; Blair, M. W.; Welch, R. M.; Glahn, R. P. Screening of iron bioavailability patterns in eight bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes using the Caco-2 cell in vitro model. *J. Ag. Food Chem.* **2007**, 55(19), 7950-7956.
17. Tako, E.; Blair, M. W.; Glahn, R. P. Biofortified red mottled beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in a maize and bean diet provide more bioavailable iron than standard red mottled beans: Studies in poultry (*Gallus gallus*) and an in vitro digestion/Caco-2 model. *Nutr. J.* **2011**, 10, 113.
18. Glahn, R. P.; Cheng, Z.; Fukai, S.; Rerkasem, B.; Huang, L. The bioavailability of iron fortified in whole grain parboiled rice. *Food Chem.* **2009**, 112(4), 982-986.
19. Haas, J. D.; Beard, J. L.; Murray-Kolb, L. E.; del Mundo, A. M.; Felix, A.; Gregorio, G. B. (2005). Iron-biofortified rice improves the iron stores of nonanemic Filipino women. *Nutr J.* **2005**, 135(12), 2823-2830.
20. Vaz-Tostes, M.G.; Verediano, T.A.; Mejia, E.G.; Costa, N.M.B. Evaluation of iron and zinc bioavailability of beans targeted for biofortification using in vitro and in vivo models and their effect on the nutritional status of preschool children. *J. Sci. Food Agr.* **2015**, 1-9.
21. Ramírez-Cárdenas, L.; Leonel, A. J.; Costa, N. M. B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2008**, 28(1), 200-13.
22. Silva, R.G.V. Caracterização físico-química de farinha de batata-doce para produtos de panificação. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, 2010.
23. Gomes, J.C. *Análise de alimentos*. Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, Brasil, 1996; p.p 126.
24. Rodriguez, D. B.; Raymundo, L. C.; Lee, T. C.; Simpson, K. L.; Chichester, C. O. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Ann. Bot.* **1976**, 40(3), 615-624.
25. Sant'Ana, H. M. P.; Stringheta, P. C.; Brandão, S. C. C.; de Azeredo, R. M. C. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. *Food Chem.* **1998**, 61(1), 145-151.
26. Latta, M.; Eskin, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J. Agr Food Chem.* **1980**, 28(6), 1313-1315.
27. Ellis, R.; Morris, R. Appropriate resin selections for rapid phytate analysis by ion-exchange chromatography. *Cereal Chem.* **1986**, 63, 58-59.
28. Singleton, V.L., Rudolf, O., Lamuela-Raventós, R.M., et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: (Ed.) *Methods in Enzymology*: Academic Press, v.299, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, p.152-178.
29. AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. *Official methods of analysis*. 19th ed. Gaithersburg, 2012.
30. Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey Jr, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing

- committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **1993**, 123(11), 1939-1951.
31. Della Lucia C. M.; Tostes, M.G.V.; Silveira, C.M.; Bordalo, L.A.; Rodrigues, F.C.; Pinheiro-Sant'Ana, H.M.; Martino, H.S.; Costa, N.M. Iron bioavailability in Wistar rats fed with fortified rice by Ultra Rice technology with or without addition of yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*). *Arch. Lat. Am. Nutr.* **2013**, 63(1):64-73.
  32. Mwanri, L.; Worsley, A.; Ryan, P.; Masika, J. Supplemental vitamin A improves anemia and growth in anemic school children in Tanzania. *J. Nutr.* **2000**, 130(11), 2691-2696.
  33. Hernández, M.; Sousa, V.; Moreno, Á.; Villapando, S.; López-Alarcón, M. (2003). Iron bioavailability and utilization in rats are lower from lime-treated corn flour than from wheat flour when they are fortified with different sources of iron. *J. Nutr.* **133**(1), 154-159.
  34. Petry, N.; Egli, I.; Gahutu, J. B.; Tugirimana, P. L.; Boy, E.; Hurrell, R. Stable iron isotope studies in Rwandese women indicate that the common bean has limited potential as a vehicle for iron biofortification. *J. Nutr.* **2012**, 142(3), 492-497.
  35. Semba, R. D.; Bloem, M. W. The anemia of vitamin A deficiency: epidemiology and pathogenesis. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2002**, 56(4), 271-281.
  36. Oates, P.S. The role of hepcidin and ferroportin in iron absorption. *Histology and Histopathology* **2007**, 22, 791-804.
  37. Hurrell, R. F.; Juillerat, M. A.; Reddy, M. B.; Lynch, S. R.; Dassenko, S. A.; Cook, J. D. (1992). Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *Am. J. Clinical Nutr.* **1992**, 56(3), 573-578.
  38. Anton, A. A.; Ross, K. A.; Beta, T.; Fulcher, R. G.; Arntfield, S. D. Effect of pre-dehulling treatments on some nutritional and physical properties of navy and pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *LWT- Food Sci. Tech.* **2008**, 41(5), 771-778.
  39. Petry, N.; Egli, I.; Champion, B.; Nielsen, E.; Hurrell, R. Genetic reduction of phytate in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds increases iron absorption in young women. *J. Nutr.* **2013**, 143(8), 1219-1224.
  40. Garcia-CasaL, M.N.; Layrisse, M. Food iron absorption: role of vitamin A. *Arch. Latinoam. Nutr.* **1998**, 48, 3, 191-196.
  41. Petry, N., Egli, I., Zeder, C., Walczyk, T., Hurrell, R. Polyphenols and phytic acid contribute to the low iron bioavailability from common beans in young women. *J. Nutr.* **2010**, 140, 1977-1982.
  42. Brasse-LagneL, C., Karim, Z., Letteron, P., Bekri, S., Bado, A., Beaumont, C. Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation. *Gastroenterology* **2011**, 140 (4), 1261-1271.
  43. Maruyama, Y.; Yokoyama, K.; Yamamoto, H.; Nakayama, M.; Hosoya, T. Do serum hepcidin-25 levels correlate with oxidative stress in patients with chronic kidney disease not receiving dialysis? *Clin. Nephrol.* **2012**, 78(4), 281-286.
  44. Mena, N. P.; Esparza, A.; Tapia, V.; Valdés, P.; Nunez, M. T. Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2008**, 294(1), G192-G198.
  45. Tripathi, B.; Platel, K.; Srinivasan, K. Double fortification of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) and finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn) flours with iron and zinc. *J. cereal sci.* **2012**, 55(2), 195-201.
  46. Groto, H.Z.W. Fisiologia e metabolismo do ferro. *Rev. Bras. Hemat. Hemot.* **2010**, 32, 8-17.



47. He, W. L.; Feng, Y.; Wei, Y. Y.; Yang, X. E.; Shi, C. H.; He, Z. L.; Stoffella, P. J. Differential iron-bioavailability with relation to nutrient compositions in polished rice among selected Chinese genotypes using Caco-2 cell culture model. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2013**, 64(7), 822-829.
48. Zhang, Y., Huang, Y., Deng, X., Xu, Y., Gao, Z., & Li, H. Iron overload-induced rat liver injury: Involvement of protein tyrosine nitration and the effect of baicalin. *Eur. J. Pharm.* **2012**, 680(1), 95-101.
49. Van der Gaag, M. S.; Van den Berg, R.; Van den Berg, H.; Schaafsma, G.; Hendriks, H. F. Moderate consumption of beer, red wine and spirits has counteracting effects on plasma antioxidants in middle-aged men. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2000**, 54(7), 586-591.
50. Young, J.F.; Dragsted, L.O.; Haraldsdóttir, J.; Daneshvar, B.; Kall, M.A.; Loft, S.; Nilsson, L.; Nielsen, S.E.; Mayer, B.; Skibsted, L.H.; Huynh-Ba, T.; Hermenter, A.; Sandstrom, B. Green tea extract only affects markers of oxidative status postprandially: lasting antioxidant effect of flavonoid-free diet. *Br J Nutr.* **2002**, 87, 343-355.
51. Vannucchi, H.; Moreira, E. A.; da Cunha, D. F.; Junqueira-Franco, M. V.; Bernardes, M. M.; Jordão-Jr, A. A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Medicina* 1998, 31(1), 31-44.
52. Cornelis, P.; Wei, Q.; Andrews, S. C.; Vinckx, T. Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics* **2011**, 3, 540-549.

## **6. CONCLUSÃO GERAL**

O feijão BRS Pontal apresentou elevado conteúdo de ferro, fibra alimentar total, fitato e compostos fenólicos. A abóbora e a batata doce apresentaram elevado conteúdo de carotenoides e compostos fenólicos. A combinação de arroz e feijão com outras fontes vegetais, como a abóbora e a batata doce biofortificadas, manteve a qualidade proteica, mesmo na presença de fitoquímicos e ainda proporcionou uma melhora na qualidade nutricional das dietas, uma vez que, foram excelentes fontes de carotenoides e fibra alimentar. Todas as combinações alimentares aumentaram a excreção fecal de lipídeos, e as combinações contendo o feijão pontal apresentaram ação hipoglicemiante. A combinação do arroz e feijão, e estes a abóbora e a batata doce biofortificadas com carotenoides favoreceu a expressão gênica das proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, favorecendo assim a sua biodisponibilidade e a atividade antioxidante.

## ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS  
*Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-3783*

Viçosa, 10 de outubro 2011.

Ilma. Sra.  
Professora Maria do Carmo Gouvêia Pelúzio  
DD. Coordenadora da Disciplina NUT 327 - Nutrição Experimental

Prezada Coordenadora:

A CEUA da UFV emite parecer favorável ao Protocolo para o uso de animais nas aulas práticas da “Disciplina NUT 327 - Nutrição Experimental”, baseado nas Normas para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do DVT/UFV, no Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, nas Normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e na legislação vigente.

O uso concomitante de animais (para coleta de fezes) pela disciplina NUT 327 e NUT 622 - Qualidade Nutricional de Proteínas, visa diminuir a utilização dos mesmos em aulas práticas.

O número de animais utilizados (18) será equitativamente distribuído por três dietas diferentes, o que aliado à duplicidade das disciplinas reduz ao mínimo o número de animais utilizados nas disciplinas citadas.

Atenciosamente,

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'Cláudio César Fonseca'.

Professor Cláudio César Fonseca

Comissão de Ética para o Uso de Animais - CEUA/UFV  
Coordenador

## **ANEXO 2: Aprovação do Comitê de Ética 2**

Viçosa, 26 de março 2010

Ilma. Sra.  
Professora Hércia Stampini D. Martino  
Coordenadora da Disciplina  
DNS/UFV

Sra. Coordenadora,

A CEUA da UFV emite parecer favorável ao Protocolo para o uso de animais nas aulas práticas da Disciplina NUT 621 “*Biodisponibilidade de Minerais*”, baseado nas Normas para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do DVT/UFV, no Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, nas Normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e na legislação vigente.



Prof. Cláudio C. Fonseca

Coordenador

Comissão de Ética para o uso de animais - CEUA/UFV