

**VÂNIA MAYUMI NAKAJIMA**

**BIODISPONIBILIDADE DE FERRO DE GENÓTIPOS DE MILHO: AVALIAÇÃO  
POR MÉTODOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

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

2010

VÂNIA MAYUMI NAKAJIMA

BIODISPONIBILIDADE DE FERRO DE GENÓTIPOS DE MILHO: AVALIAÇÃO  
POR MÉTODOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

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: 29 de março de 2010.

---

Prof<sup>a</sup> Hércia Stampini Duarte Martino  
(Co-orientadora)

---

Dr<sup>a</sup> Valéria Aparecida Vieira Queiroz  
(Co-orientadora)

---

Prof. Paulo Roberto Cecon

---

Prof José Carlos Gomes

---

Prof<sup>a</sup> Neuza Maria Brunoro Costa  
(Orientadora)

Aos meus pais e aos meus irmãos pelo apoio constante.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Nutrição e Saúde, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, pela minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa em Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Embrapa Milho e Sorgo pelo apoio financeiro e de material.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Neuza Maria Brunoro Costa, minha orientadora desde a graduação em Iniciação Científica, pela orientação, pelos ensinamentos, pela oportunidade, confiança e amizade.

À professora Hércia Stampini Duarte Martino, pela co-orientação, amizade e incentivo durante a execução deste trabalho.

À pesquisadora Valéria Aparecida Vieira Queiroz, pela co-orientação, e pela oportunidade de realizar este trabalho junto a Embrapa Milho e Sorgo.

Ao professor Pedro Vitoriano, pela ajuda sempre prestativa, pelas sugestões e palavras de incentivo durante minha estadia em seu laboratório.

Aos professores José Carlos Gomes e Paulo Roberto Cecon por alguns esclarecimentos que auxiliaram na condução da pesquisa.

Ao Cassiano e Ricardo, técnicos do laboratório de Nutrição Experimental e Análise de Alimentos, pela disponibilidade e ajuda na condução dos experimentos.

Aos meus pais, Victor e Kikuko, pelo amor e carinho, por sempre acreditarem e apoiarem os meus estudos.

Aos meus irmãos Tadashi, Takinha e Hiromi, por terem me dado forças para vencer cada etapa e driblar as dificuldades.

À Ritinha, uma amiga para conselhos, comemorações e ajuda em laboratório.

Aos amigos Saulo e Sara pelo grande apoio nos momentos difíceis.

Às minhas mães adotivas Ana Cristina e Cristiane por todo ensinamento e apoio que contribuiu muito para a conclusão desta etapa.

À Rafaela e Gabriela, estagiárias que trabalharam com muita dedicação, e contribuíram muito para finalização do trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Nutrição Experimental e Análise de Alimentos: Érica, Dorina, Crislaine, Camila, Christiane pelo convívio diário e momentos de descontração meio ao estresse do trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde, em especial ao seu Nilton, Mimorina e Alessandra.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

VÂNIA MAYUMI NAKAJIMA, filha de Victor Nakajima e Kikuko Kamiyama Nakajima, nasceu em 15 de maio de 1983, em Pereira Barreto, São Paulo.

Em março de 2003, iniciou o curso de graduação em Nutrição na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, concluindo-o em janeiro de 2008.

Em março de 2008, ingressou no Curso de Mestrado em Ciência da Nutrição na UFV, sob orientação da professora Neuza Maria Brunoro Costa, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae* em março de 2010.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
Referências bibliográficas .....	3
OBJETIVOS .....	5
Objetivo Geral .....	5
Objetivos Específicos .....	5
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	6
Introdução .....	6
Metabolismo do ferro e sua deficiência.....	6
Biodisponibilidade de ferro .....	10
Métodos de avaliação da biodisponibilidade de minerais .....	12
Métodos in vitro .....	12
Métodos in vivo.....	14
Biofortificação de milho: alternativa na prevenção e combate à deficiência de ferro..	16
Conclusão .....	22
Referências Bibliográficas.....	24
CAPÍTULO 2: BIODISPONIBILIDADE DE FERRO DE GENÓTIPOS DE MILHO: AVALIAÇÃO POR MÉTODOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> .....	31
Introdução .....	31
Materiais e Métodos .....	33
Material .....	33
Disponibilidade de ferro in vitro – Método da diálise .....	33
Biodisponibilidade de ferro in vivo – Ensaio biológico.....	38
Análise estatística.....	44
Resultados.....	44
Disponibilidade in vitro – Ferro solúvel e dialisável .....	44
Biodisponibilidade in vivo – Ensaio biológico .....	46
Correlação entre os dados dos estudos in vitro e in vivo .....	51
Discussão .....	52

Conclusão .....	59
Referências Bibliográficas.....	61
Apêndice 1 .....	67
Apêndice 2.....	71



## RESUMO

Nakajima, Vânia Mayumi, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2010. **Biodisponibilidade de ferro de genótipos de milho: avaliação por métodos *in vitro* e *in vivo*.** Orientadora: Neuza Maria Brunoro Costa. Co-orientadoras: Hércia Stampini Duarte Martino e Valéria Aparecida Vieira Queiroz.

A fortificação dos alimentos é uma alternativa adotada no combate à anemia ferropriva. Entretanto, o acesso limitado aos alimentos industrializados e a baixa biodisponibilidade dos sais minerais utilizados podem reduzir sua eficácia. Nesses casos, a biofortificação com minerais de alta biodisponibilidade pode ser uma alternativa. A biodisponibilidade de ferro pode ser avaliada por técnicas *in vitro* como a diálise, e *in vivo* com animais e humanos. A técnica *in vitro* é um método mais barato e mais fácil de executar que as metodologias *in vivo*, e assim poderia ser utilizada para selecionar os genótipos mais promissores num programa de melhoramento genético. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a biodisponibilidade de ferro de diferentes genótipos de milho e a possível correlação entre os resultados obtidos por método *in vitro* e *in vivo*. Objetivou-se ainda verificar a influência do teor de fitato e a razão fitato:ferro na biodisponibilidade de ferro. Os teores de ferro total, solúvel e dialisável de 13 amostras de milho foram determinados por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite e o de fitato foi quantificado por método colorimétrico. O teor de ferro dos genótipos teve valor médio de  $17,93 \pm 2,93$  mg/kg. O teor de fitato das amostras variou de 0,77% (3E4744 e DKB390) a 1,03% (2E4794), e a razão molar fitato:ferro de 30,64 (1F5924) a 55,41 (DKB390). O percentual de ferro solúvel variou de 13,17 a 39,63% para Caimbé e 3E5335, respectivamente. O maior valor de ferro dialisável também foi para 3E5335 (19,14%), entretanto o menor foi de 3,71% para 3E4824. O ferro total apenas se correlacionou significativamente ( $P < 0,05$ ) com o percentual de ferro solúvel ( $r = -0,597$ ), sendo uma relação inversa. O teor de fitato e a razão molar fitato:ferro não se relacionaram com os valores de solubilidade e diálise. O ferro solúvel e dialisável tanto em  $\mu\text{g/g}$  como em valor percentual, correlacionaram-se significativamente ( $r = 0,944$  e  $r = 0,951$ ; respectivamente). O milho 3E5335 foi o que apresentou melhor potencial para a biofortificação devido ao seu maior teor de ferro disponível. No ensaio biológico, avaliou-se a biodisponibilidade de ferro de cinco genótipos de milho, pelo

método de depleção-repleção em ratos. Os animais receberam dieta AIN93-G sem ferro na fase de depleção por 21 dias. Na fase de repleção (n=8), receberam dietas com 12 mg/kg de ferro, por 14 dias, provenientes de: D1:Sulfato ferroso, D2:Caimbé, D3:1F5924, D4:2E5305, D5:3E4824, D6:2E4794. A hemoglobina (Hb) foi mensurada no início e no final da fase de repleção. Foi avaliado ganho de Hb, ganho de Hb por grama de ferro consumido, eficiência na regeneração de Hb (HRE) e valor biológico relativo de HRE (RBV de HRE). Não houve diferença no consumo alimentar, ganho de peso, Hb inicial, ganho de Hb e ganho de Hb por grama de Fe consumido. Todos os grupos apresentaram HRE maior que o controle, exceto D2; e não houve diferença entre os grupos teste, quando avaliados entre si. O RBV indicou que D5 e D6 foram os que apresentaram melhor valor de HRE em relação ao controle. O grupo D2 consumiu a maior quantidade de ferro, porém apresentou o menor valor de RBV. Não houve correlação entre consumo de ferro e ganho de Hb. Houve correlação positiva significativa entre ganho de Hb por grama de ferro consumido e HRE ( $r = 0,883$ ), e ganho de Hb e HRE ( $r = 0,723$ ). O ganho de hemoglobina por grama de ferro consumido e HRE não apresentaram correlação com os resultados obtidos no estudo *in vitro*. O ganho de hemoglobina não apresentou correlação significativa, ao nível de 5%, com nenhum valor obtido na diálise, porém foram observadas correlações positivas que variaram de 0,653 a 0,809. Os genótipos de milho analisados apresentaram ferro biodisponível, visto que essas amostras continham valores semelhantes ao grupo controle quanto ao ganho de hemoglobina, ganho de hemoglobina por grama de ferro consumido e eficiência na regeneração de hemoglobina. Entretanto, a quantidade de ferro desse alimento e os resultados do ensaio *in vitro* indicaram que ainda deve ser feita uma melhor seleção de genótipos quanto ao conteúdo de ferro e fitato. Também foi observado que o teor de fitato e a razão molar fitato:ferro não apresentaram correlação com os resultados obtidos nas análises de biodisponibilidade de ferro, tanto *in vitro* como *in vivo*. O método da diálise pode ser uma alternativa na seleção das genótipos para o melhoramento genético visto os resultados concordantes com o ensaio biológico.

## ABSTRACT

Nakajima, Vânia Mayumi, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2010. **Iron bioavailability of maize: *in vitro* and *in vivo* evaluation.** Adviser: Neuza Maria Brunoro Costa. Co-advisers: Hércia Stampini Duarte Martino and Valéria Aparecida Vieira Queiroz.

Food fortification is an alternative adopted to reduce anemia prevalence. However, limited access to industrialized food and the utilization of low bioavailability mineral salts reduce its efficacy. In these cases, biofortification with high bioavailable minerals can be an alternative. The bioavailability can be evaluated, by *in vitro* techniques, as dialysis, and *in vivo* techniques, with animals and humans. The *in vitro* methodology is cheaper and easier to execute than *in vivo* methodology, so it could be adopted to select the genotypes with promising characteristics in plant breeding programs. Thus, the objective of this study was to evaluate iron bioavailability of maize genotypes, and analyze the correlation between *in vitro* and *in vivo* methodologies. It was also verified the influence of phytate and phytate:iron molar ratio on iron bioavailability. Total, soluble and dialyzable iron content of 13 samples of maize were determined by atomic absorption spectrometer equipped with a graphite furnace, and phytate was determined by a colorimetric method. The mean iron content of maize genotypes was  $17.93 \pm 2.93$  mg/kg. The phytate content varied from 0.77% (3E4744 e DKB390) to 1.03% (2E4794), and phytate:iron molar ratio from 30.64 (1F5924) to 55.41 (DKB390). Soluble iron varied from 13.17 to 39.63% for Caimbé and 3E5335, respectively. The major value for dialyzable iron was for 3E5335 (19.14%), otherwise the lower value was 3.71% for 3E4824. Total iron correlated ( $p < 0.05$ ) only with soluble iron in percent ( $r = -0.597$ ). Phytate content and phytate:iron molar ration did not correlated with any value of solubility and dialyzability. Iron solubility and dialyzability in  $\mu\text{g/g}$  and in percent value had a significant correlation ( $r = 0.944$  e  $r = 0.951$ ; respectively). The maize 3E5335 presented the best potential for biofortification analyzing by *in vitro* method. In the biological assay, five genotypes were evaluated by the depletion-repletion methodology in rats. The animals received AIN93-G diet without iron during the depletion period, which lasted 21 days. In the repletion phase ( $n = 8$ ), the animals received diets with 12 mg/kg of iron for 14 days, from D1: Ferrous sulfate,

D2:Caimbé, D3:1F5924, D4:2E5305, D5:3E4824, D6:2E4794. Hemoglobin (Hb) was measured at the beginning and at the end of repletion phase. It was evaluated Hb gain, Hb gain per gram of iron consumed, Hb regeneration efficiency (HRE), and HRE relative biological value (HRE RVB). It was not observed difference in food intake, weight gain, initial Hb, Hb gain, and Hb gain per gram of iron consumed. All groups presented HRE higher than the control group, except for D2; and there was no difference between the test groups. HRE RBV indicated that D5 and D6 presented the higher values compared to the control group. The group D2 consumed the highest amount of iron, however presented the lower value of RBV. It was not observed correlation between iron intake and Hb gain. There was a positive and significative correlation between Hb gain per gram of iron consumed and HRE ( $r = 0.883$ ), and Hb gain and HRE ( $r = 0.723$ ). Hb gain per gram of iron consumed and HRE did not present correlation with the results obtained in the *in vitro* assay. Hb gain did not present significative correlation with the results obtained in the *in vitro* assay either, otherwise it was observed positive correlations that varied from 0.653 to 0.809. The maize genotypes presented bioavailable iron because these samples promoted same Hb gain, Hb gain per gram of iron consumed and Hb regeneration efficiency as the control group that received ferrous sulfate. However the iron content of these genotypes and the results obtained in the *in vitro* assay showed that a better selection has to be made to provide genotypes with higher iron and lower phytate contents. It was also observed that phytate content and phytate:iron molar ratio did not present correlation with the results obtained in the *in vitro* and *in vivo* assays. The dialysis methodology may be an alternative choice in the selection of best genotypes in the plant breeding programs because of the concordance results with the biological assay.

## INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, há aproximadamente 2 bilhões de pessoas anêmicas no mundo, ou seja, 24,8% da população mundial, nos diferentes estratos sociais. Ainda, de cada dez, nove estão nos países em desenvolvimento, e cerca de 50% dos casos podem ser atribuídos à baixa ingestão de ferro biodisponível. A anemia é considerada um problema de saúde pública mundial grave no grupo de gestantes e crianças pré-escolares, sendo atribuída esta classificação quando a prevalência é maior que 40% (WHO, 2008).

Vitolo (2008) ressalta a importância ao incentivo de atividades que busquem combater essa deficiência nutricional. Dentre as estratégias de combate à anemia, a modificação no hábito alimentar é geralmente recomendada, visto que a dieta monótona, comum principalmente nos grupos mais carentes, contribui para o desenvolvimento das deficiências nutricionais (Mayer *et al.*, 2008). Entretanto, a mudança de hábito é muitas vezes difícil de ser alcançada (Zimmermann e Hurrell, 2007).

A fortificação dos alimentos é uma alternativa adotada para o combate desta doença. Entretanto, em certas situações, pode não alcançar os efeitos desejados, principalmente nas regiões rurais e menos favorecidas, onde o acesso aos alimentos industrializados é limitado, inviabilizando a ingestão do mineral adicionado durante o processamento (Zimmermann e Hurrell, 2007). Outro fator que contribui para a ineficácia do programa de fortificação industrial é a utilização de sais com baixa biodisponibilidade do mineral e que interagem com a matriz alimentar alterando as características do produto; além da falta de fiscalização quanto a adição de um sal biodisponível, na quantidade adequada, considerando os fatores antinutricionais (Uauy *et al.*, 2002). Ainda, segundo Davidsson *et al.* (2007), embora muitos países tenham experiência de longa data com tais medidas de intervenção, há poucas informações disponíveis a respeito da eficácia das mesmas.

A biofortificação pode ser uma alternativa para fornecer um alimento com maior teor de ferro disponível para o ser humano (Oikeh *et al.*, 2003). Por meio desta intervenção pode-se atingir as populações rurais que não consomem, ou consomem pouco os produtos industrializados fortificados no processamento, aumentando assim a sua abrangência (Mayer *et al.*, 2008).

Em paralelo, os genótipos biofortificados apresentam o potencial de fornecer aos países em desenvolvimento benefícios contínuos, ano após ano. As sementes obtidas poderão ainda, ser adaptadas às condições de crescimento dos diversos ecossistemas. Sendo assim, a introdução de produtos agrícolas por meio de genótipos melhorados geneticamente, atuará de forma complementar as intervenções nutricionais existentes. Ainda esta forma de intervenção apresenta maior probabilidade de atingir indivíduos com pouco acesso aos produtos industrializados e aos sistemas de saúde (Harvest Plus, 2004).

No Brasil, as pesquisas e o desenvolvimento de linhagens de milho biofortificadas com alto teor de ferro, zinco e carotenóides foi iniciado em 2004 na Embrapa Milho e Sorgo, como parte de um programa mundial de geração de culturas biofortificadas denominado *Harvest Plus*. O projeto nacional está sendo direcionado às regiões tropicais, especialmente na geração de genótipos adaptados ao plantio em regiões semi-áridas, uma vez que no Nordeste do Brasil há grande prevalência de deficiências nutricionais, além de concentrar maior consumo de milho e derivados.

Ao utilizar a biofortificação para aumentar o conteúdo de minerais, é importante relacioná-los ao conceito de biodisponibilidade, sendo esta a fração dos nutrientes ingeridos que é utilizada para funções fisiológicas normais ou de estocagem. Muitos fatores interferem na biodisponibilidade dos minerais, como a eficiência da digestão, o estado nutricional do indivíduo, o tempo de trânsito intestinal e alguns outros nutrientes ou substâncias como as fibras alimentares e o fitato (Pushpanjali e Khokhar, 1996). Desta forma, somente um elevado teor de ferro no alimento não significa que este será uma alternativa eficaz na prevenção e tratamento da sua deficiência, pois nem sempre há uma correlação positiva entre conteúdo de ferro e biodisponibilidade (Oikeh *et al.*, 2003; Hirschi, 2008).

As técnicas que podem ser utilizadas para avaliar a biodisponibilidade de ferro são a *in vitro* como a diálise, e as *in vivo* com animais (ratos ou porcos) e humanos.

No método *in vitro* ocorre a simulação da digestão do trato digestório. Após esta fase, na diálise, é mensurada a quantidade de ferro que consegue atravessar uma membrana de diálise com poro de tamanho conhecido, sendo denominado ferro dialisável (Miller *et al.*, 1981; Hemalatha *et al.*, 2007).

Para os métodos *in vivo*, utilizando modelos animais, a técnica da depleção/repleção de hemoglobina proposto pela AOAC (1998) é recomendada e

amplamente utilizada. Nesta técnica, a anemia é induzida nos animais e, posteriormente, os produtos-teste são oferecidos como fonte de ferro avaliando-se o ganho de hemoglobina, e utilizando três diferentes níveis do mineral. Ao final é feita a análise por regressão linear. Uma adaptação do método da AOAC (1998) é a utilização de apenas um nível de ferro e posterior cálculo da Eficiência na Regeneração de Hemoglobina (HRE) (Haro-Vicente *et al.*, 2008).

A análise da biodisponibilidade de minerais é de suma importância para avaliar se o programa de biofortificação alcançará seus objetivos. Todavia, o uso de técnicas *in vivo* nestes programas é inviável devido ao grande número de materiais desenvolvidos que devem ser avaliados, além da quantidade insuficiente de amostra nas fases iniciais de estudo. Assim, como uma forma de detectar os genótipos desenvolvidos mais promissores, propõe-se a utilização de técnicas *in vitro*, como a diálise, que se trata de um método mais barato e de fácil execução que as metodologias *in vivo*. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a possível correlação entre os resultados obtidos por diálise e ensaio biológico. Além disso, verificou-se se o teor de fitato e a razão fitato:ferro influenciaram nos resultados de biodisponibilidade dos dois métodos.

### **Referências bibliográficas**

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 16ed. rev. 4. Washington, D.C., 2v. 1170p. 1998.

DAVIDSSON, L.; ZIEGLER, E.E.; KASTENMAYER, K.; VAN DAEL, P.; BARCLAY, D. Dephytinisation of soyabean protein isolate with low native phytic acid content has limited impact on mineral and trace element absorption in healthy infants. **British Journal of Nutrition**, v.91, n. 2, p.287-293, 2007.

HARO-VICENTE, J.; PÉREZ-CONESA, D.; RINCÓN, F.; ROS, G.; MARTÍNEZ-GRACIÁ, C.; VIDAL, M. Does ascorbic acid supplementation affect iron bioavailability in rats fed micronized dispersible ferric pyrophosphate fortified fruit juice? **European Journal of Nutrition**, v.47, n.8, p.470-478, 2008.

HARVEST PLUS. **Desenvolvendo Produtos Agrícolas Mais Nutritivos.** 2004. Disponível em: <http://www.harvestplus.org/pdfs/brochurepo.pdf>. Acesso em: 14 de dezembro de 2008.

HEMALATHA, S.; PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Zinc and iron contents and their bioaccessibility in cereals and pulses consumed in India. **Food Chemistry**, v.102, p.1328-1336, 2007.

HIRSCHI, K. Nutritional improvements in plants: time to bite on biofortified foods. **Trends in Plant Science**, v.13, n.9, p.459-463, 2008.

MAYER, J.E.; PFEIFFER, W.H.; BEYER, P. Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, n.2, p.166-170, 2008.

MILLER, D. D.; SCHRICKER, B. R.; RASMUSSEN, R. R.; VAN CAMPEN, D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.34, p.2248-2256, 1981.

OIKEH, S.O.; MENKIR, A.; MAZIYA-DIXON, B.; WELCH, R.; GLAHN, R.P. Assessment of Concentrations of Iron and Zinc and Bioavailable Iron in Grains of Early-Maturing Tropical Maize Varieties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, n.12, p.3688-3694, 2003.

PUSHPANJALI; S. KHOKHAR. In vitro availability of iron and zinc from some Indian vegetarian diets: correlations with dietary fibre and phytate. **Food Chemistry**, v.56, n.2, p.111-114, 1996.

UAUY, R.; HERTRAMPF, E.; REDDY, M. Iron Fortification of Foods: Overcoming Technical and Practical Barriers. **Journal of Nutrition**, v.132, n.4, p.849S-852, 2002.

VITOLO, M. R. Anemia no Brasil: até quando? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.30, p.429-431, 2008.

WHO - World Health Organization. **Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005 : WHO global database on anaemia**. Geneva: WHO, 2008.

ZIMMERMANN, M. B.; HURRELL, R.F. Nutritional iron deficiency. **The Lancet**, v.370, n.9586, p.511-520, 2007.



## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliar a biodisponibilidade de ferro de genótipos de milho biofortificados por técnicas *in vitro* com as *in vivo*, e correlacionar os resultados encontrados por estes dois métodos.

### Objetivos Específicos

- Quantificar o teor de ferro dos genótipos de milho.
- Quantificar o teor de fibras e fitato e determinar a razão molar fitato:ferro dos genótipos.
- Avaliar a biodisponibilidade de ferro *in vitro* dos genótipos utilizando o método da diálise.
- Avaliar a biodisponibilidade de ferro das genótipos utilizando ensaio biológico com modelo animal.
- Correlacionar os resultados obtidos com os ensaios de biodisponibilidade *in vitro* e *in vivo*.
- Avaliar a influência do fitato na biodisponibilidade do mineral.

## CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### **Introdução**

A anemia é considerada problema de saúde pública no mundo, por isso ainda demonstra-se a necessidade de estudar alternativas no combate a esta deficiência (WHO, 2008).

Dentre as estratégias utilizadas, é promissora a utilização do melhoramento genético convencional para o desenvolvimento de genótipos com maior conteúdo de ferro e carotenóides, e menor teor de fitato, um fitoquímico com propriedade antinutricional para minerais. Nesta linha, o Brasil, por meio da Embrapa, investe no desenvolvimento de genótipos de milho biofortificado.

Todavia somente o aumento no conteúdo de ferro não garante que esse esteja disponível para utilização no organismo, portanto, estudos de biodisponibilidade são necessários para avaliar esses novos genótipos (OIKEH *et al.*, 2003; HIRSCHI, 2008).

Nesse contexto, esse artigo busca revisar os fatores que afetam a biodisponibilidade do ferro e os métodos utilizados para sua avaliação, bem como o potencial para a biofortificação do milho com ferro.

### **Metabolismo do ferro e sua deficiência**

O ferro está associado às funções metabólicas e enzimáticas do organismo, por fazer parte de diversos tipos de proteínas como as heme que contém ferro (hemoglobina, mioglobina e citocromos), enzimas ferro-sulfuradas (flavoproteínas, heme-flavoproteínas), proteínas para estoque e transporte de ferro (transferrina, lactoferrina, ferritina e hemosiderina), e enzimas ativadas ou que contém o mineral (enzimas sulfuradas e não-heme). O ferro ainda atua na síntese de purinas do DNA e RNA, da carnitina, e dos neurotransmissores dopamina, serotonina e norepinefrina. No organismo humano, quase dois terços do ferro está presente na molécula de hemoglobina (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001).

O ferro é absorvido principalmente no intestino delgado, na porção duodenal. Neste processo existem algumas diferenças se o ferro presente no lúmen é do tipo heme ou não-heme. A absorção do ferro não-heme é mediada pelo transportador de íon metálico divalente 1 (DMT1), que transporta somente o mineral na forma ferrosa. Para que isso ocorra, a enzima redutase férrica duodenal citocromo b (Dcytb),

presente na borda em escova reduz o ferro da forma férrica para a ferrosa, para assim tornar-se disponível para absorção (ZIMMERMANN e HURRELL, 2007). Outros compostos presentes na dieta também atuam na redução do ferro, como o ácido ascórbico, cisteína, contribuindo para a absorção do mineral. No estudo de Frazer *et al.* (2002), ratos induzidos a anemia pelo consumo de uma dieta deficiente em ferro apresentaram aumento na absorção do mineral com aumento na expressão de DMT1 e Dcytb no duodeno, demonstrando o papel desses dois compostos na absorção. Outra proteína de membrana que atua como carreador de ferro não-heme é a integrina, que também absorve o ferro na sua forma reduzida (CONRAD *et al.*, 1993). A absorção do ferro heme requer a presença de um transportador específico (HCP1), que é mais expresso durante a hipóxia e na deficiência do mineral. Dentro do enterócito o ferro heme e o não-heme entram num pool comum de  $Fe^{2+}$ , e ficam ligados a mobilferrina para serem transportados no citosol do enterócito (CONRAD *et al.*, 1990). O transporte do ferro da membrana basolateral para a circulação sangüínea é mediada pela proteína de transporte ferroportina 1, e requer a atuação da oxidase férrica hefaestina e da ceruloplasmina (CHERUKURI *et al.*, 2005), que converte o ferro da forma ferrosa para a férrica, que assim pode se ligar a transferrina e ser transportado na corrente sangüínea para os órgãos alvo (ZIMMERMANN e HURRELL, 2007). No processo de absorção de ferro também há influência de um hormônio secretado pelo fígado, a hepcidina, que inibe a absorção atuando na ferroportina 1, ligando-se a esta proteína causando sua internalização e posterior degradação (GANZ, 2005).

Os seres humanos não possuem uma via de excreção de ferro, assim, o controle da concentração no organismo é realizado pela absorção do mineral. Desta forma, quando há excesso de ferro, as enzimas e proteínas que regulam o transporte do mesmo são menos expressas, reduzindo a absorção; e o inverso ocorre na deficiência (ZIMMERMANN e HURRELL, 2007). Um parâmetro utilizado pelo organismo para detectar essa deficiência é a redução da ferritina sérica, confirmado por Beisegel *et al.* (2007), que verificou uma correlação inversa entre esta variável e a absorção de ferro.

As carnes, principalmente a vermelha e vísceras, são as principais fontes de ferro, sendo fonte de ferro-heme, que apresenta melhor biodisponibilidade. Também merecem destaque o feijão, os cereais integrais e as hortaliças folhosas de cor verde escura como fonte de ferro não-heme; entretanto, é importante considerar que esta

fonte de ferro apresenta baixa biodisponibilidade (até 5%). O acréscimo de 25 mg de ácido ascórbico aumenta em duas vezes a absorção de ferro, chegando a aumentar em três a seis vezes quando se adiciona 50 mg de ácido ascórbico (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001). Estudo realizado por Beisegel *et al.* (2007) em mulheres utilizando isótopos radioativos, também verificou o efeito positivo do ácido ascórbico no aumento da absorção de ferro. Portanto, recomenda-se a ingestão numa mesma refeição de alimentos fonte de ferro não-heme e fonte de ácido ascórbico, proporcionando melhor biodisponibilidade deste mineral.

As recomendações de consumo adequado de ferro propostas pelo Instituto de Medicina Americano em 2001 consideram as perdas diárias e o conceito de biodisponibilidade, e podem ser observadas na Tabela 1 (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001).

Visto as diversas funções do ferro, sua deficiência apresenta graves conseqüências à saúde humana, comprometendo o processo de aprendizagem, concentração e o desenvolvimento psicomotor de crianças. Já em adultos, afeta o rendimento no trabalho, além de tornar o organismo mais suscetível a infecções e reduzir a resposta imune (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001).

A anemia é considerada o último estágio desta carência nutricional e, portanto, sua forma mais grave. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, há aproximadamente 2 bilhões de pessoas anêmicas no mundo, ou seja, 24,8% da população mundial, nos diferentes estratos sociais, especialmente os grupos de mais alto risco como crianças pré-escolares e gestantes. Ainda, de cada dez, nove estão nos países em desenvolvimento, e cerca de 50% dos casos podem ser atribuídos à baixa ingestão de ferro biodisponível (WHO, 2008).

Em estudo desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde, a anemia no mundo é considerada um problema de saúde pública grave no grupo de gestantes e crianças pré-escolares, sendo atribuída esta classificação quando a prevalência é maior que 40% (WHO, 2008). Vitolo (2008) ressalta a importância do incentivo a atividades que busquem combater essa deficiência nutricional, visto que há três décadas continua sendo um problema de saúde pública no Brasil.

Tabela 1 – Recomendação de ingestão de ferro para homens e mulheres nas diferentes fases da vida

Grupo	Idade	Fe (mg/dia)		
		EAR	RDA	UL
Crianças	0 – 6 meses		0,27*	40
	7 – 12 meses	6,9	11	40
	1 – 3 anos	3,0	7	40
	4 – 8 anos	4,1	10	40
Homens	9 – 13 anos	5,9	8	40
	14 – 18 anos	7,7	11	45
	19 – 30 anos	6	8	45
	31 – 50 anos	6	8	45
	51 – 70 anos	6	8	45
	> 70 anos	6	8	45
	Mulheres	9 – 13 anos	5,7	8
14 – 18 anos		7,9	15	45
19 – 30 anos		8,1	18	45
31 – 50 anos		8,1	18	45
51 – 70 anos		5	8	45
> 70 anos		5	8	45
Gravidez		≤ 18 anos	23	27
	19 – 30 anos	22	27	45
	31 – 50 anos	22	27	45
Lactação	≤ 18 anos	7	10	45
	19 – 30 anos	6,5	9	45
	31 – 50 anos	6,5	9	45

\*AI: Ingestão adequada (baseada na composição do leite materno)

EAR: Necessidade média estimada

RDA: Quota dietética recomendada

UL: Nível de ingestão máxima tolerável

Fonte: Institute of Medicine, 2001.

### **Biodisponibilidade de ferro**

Quando se trata de minerais é importante relacioná-los ao conceito de biodisponibilidade, sendo esta a fração dos nutrientes ingeridos que é utilizada para funções fisiológicas normais ou de estocagem. Muitos fatores interferem na biodisponibilidade dos minerais, como a eficiência da digestão, o estado nutricional do indivíduo, o tempo de trânsito intestinal e alguns outros nutrientes ou substâncias como as fibras alimentares e o fitato (PUSHPANJALI e KHOKHAR, 1996). Isto ocorre porque diversos fatores no produto podem interagir com o mineral, aumentando ou diminuindo sua biodisponibilidade. Por isso, é importante avaliar a biodisponibilidade do ferro após, por exemplo, um programa de fortificação a fim de verificar se o enriquecimento aumentou o conteúdo do mineral biodisponível (WELCH e GRAHAM, 2004).

Fatores intrínsecos, bem como os extrínsecos, podem interferir na absorção, no transporte, na utilização e no armazenamento desses nutrientes, com subsequente aumento da suscetibilidade à deficiência ou à toxidez (BREMNER e BEATTIE, 2007). A presença de frutooligossacarídeos, de alguns aminoácidos (cisteína, metionina), do ácido ascórbico e do  $\beta$ -caroteno favorecem o aumento da biodisponibilidade do mineral (BRIGIDE e CANNIATTI-BRAZACA, 2006; DAVIDSSON *et al.*, 2007; VITALI *et al.*, 2007). Em contrapartida, o ácido fítico, o ácido oxálico e os taninos são alguns dos fatores dietéticos considerados inibidores da absorção intestinal de minerais, dentre os quais, o ácido fítico tem papel de destaque. Considerando o citado, Layrisse *et al.* (1997), em estudo de biodisponibilidade por meio da diálise, verificou que o acréscimo de vitamina A impediu os efeitos negativos dos taninos presentes no café servido junto a uma refeição, em que a absorção de ferro foi semelhante na refeição sem café e na refeição com café e vitamina A. O consumo de oito gramas de café com a refeição sem a adição de vitamina A foi responsável pela redução em 50% na absorção de ferro. Assim, este estudo demonstra o efeito dos componentes da dieta na bioacessibilidade do ferro.

Alguns estudos na literatura demonstram o efeito negativo do fitato na absorção de minerais. Brune *et al.*, (1992) estudaram a absorção de ferro em humanos que consumiram pães feitos com farinha de trigo e centeio com diferentes níveis de extração, em que, quanto maior o grau de extração, maior o conteúdo de ferro e fitato. Estes autores verificaram que os inositóis penta- e hexafosfato

apresentaram correlação negativa com a absorção de ferro, indicando o efeito inibitório destes compostos. Ainda, Porres *et al.* (2005), ao avaliarem o ferro dialisável em tremoço, constataram que a adição de fitase aumenta a bioacessibilidade do ferro. Rong e Kang-Ning (2009) observaram que a oferta a porcos de milho nixtamalizado, isto é, macerado e cozido em solução alcalina, e que apresenta menor teor de fitato, ocasionou maior quantidade de ferro na hemoglobina e hemoglobina total em relação aos animais alimentados com milho convencional.

Genótipos com menor teor de fitato vem sendo desenvolvidos a fim de reduzir o seu efeito negativo na absorção de minerais pelo ser humano. Entretanto, apesar do efeito negativo do ácido fítico na biodisponibilidade de ferro, este composto é importante para a planta por ser a fonte de reserva de fósforo, e possivelmente também por seu efeito antioxidante. Nesse sentido, Doria *et al.* (2009) verificaram que genótipos de milho com menor teor de fitato apresentavam menor capacidade de germinação, maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e após um processo de maturação da semente, maior dano as proteínas e ao DNA; indicando os efeitos negativos da redução deste fitoquímico. Todavia, pensando nos minerais, este estudo constatou que esses genótipos possuíam maior quantidade de ferro livre. Desta forma, apesar de se desejar a redução do fitato nas plantas, deve-se ter cuidado para não comprometer a produção.

A análise dessas substâncias é útil na avaliação da biodisponibilidade de Fe e Zn em alimentos e dietas (BRIGIDE e CANNIATTI-BRAZACA, 2006). Estes fatores são relevantes para populações dos países em desenvolvimento, e vegetarianos de maneira geral, que possuem como base alimentar os cereais e as leguminosas, que são alimentos ricos nas substâncias antinutricionais supracitadas (WYATT e TRIANA-TEJAS, 1994).

Outro componente dos alimentos que pode influenciar a biodisponibilidade é o tipo de lipídio, sendo que os do tipo saturado parecem afetar positivamente a absorção de ferro (PABÓN e LÖNNERDAL, 2001).

O zinco em baixas doses parece não influenciar a absorção de ferro, todavia, parece afetar negativamente a biodisponibilidade de ferro quando fornecido em doses elevadas (refeição contendo 11,71 mg de zinco para 10 mg de ferro) (OLIVARES *et al.* 2007)

Desta forma, somente um elevado teor de ferro no alimento não garante a sua eficácia na prevenção da sua deficiência, pois depende também de sua

biodisponibilidade (OIKEH *et al.*, 2003; HIRSCHI, 2008), devido aos diversos fatores que afetam a sua absorção e utilização pelo organismo.

### **Métodos de avaliação da biodisponibilidade de minerais**

As técnicas que podem ser utilizadas para avaliar a biodisponibilidade de ferro podem ser divididas em métodos *in vitro*, como a diálise e cultura de células Caco-2, e os *in vivo* com animais (ratos ou porcos) e humanos.

#### ***Métodos in vitro***

Nos métodos *in vitro* ocorre a simulação da digestão e absorção do trato digestório. Nesta simulação são utilizadas as enzimas pepsina, pancreatina e o extrato de bile, todas extraídas de porco. O processo é dividido em duas fases, a gástrica e a intestinal, em que na primeira o pH do meio é aproximadamente 2 e utiliza-se a enzima pepsina. Na fase intestinal o pH é aumentado para 7 e acrescenta-se a pancreatina e o extrato de bile. Após a fase da digestão, na diálise, é mensurada a quantidade de ferro que consegue atravessar uma membrana de diálise com poro de tamanho conhecido, sendo denominado ferro dialisável (MILLER *et al.*, 1981; HEMALATHA *et al.*, 2007). Para a cultura de células Caco-2, que são modelos de células de carcinoma do cólon humano, analisa-se a quantidade de ferro que consegue atravessar uma monocamada de células (absorvido), e também a formação de ferritina no interior das células (GLAHN *et al.*, 2002).

Apesar da maior simplicidade da técnica *in vitro*, há grande dificuldade de se reproduzir esta metodologia. Luten *et al* (1996) verificaram que ocorreu considerável variação no ferro dialisável entre diferentes laboratórios que analisaram os mesmos alimentos. Ainda, alguns estudos nacionais (MACHADO *et al*, 2006; SARTORI, 2007; FELIX e CANNIATTI-BRAZACA, 2008) apresentam modificações do método proposto por Miller *et al* (1981), em que se destaca que o digerido gástrico é colocado no interior do saco de diálise, enquanto o NaHCO<sub>3</sub> e as enzimas do lado externo da membrana. Estas colocações reforçam a necessidade de uma maior padronização da técnica, além do detalhamento e meticulosidade na execução do protocolo a fim de se obter resultados confiáveis.

As técnicas *in vitro* foram utilizadas por Perales *et al.* (2006), na verificação do efeito da fortificação do leite com cálcio na biodisponibilidade de cálcio, ferro e zinco, utilizando os métodos da diálise e células Caco-2. A biodisponibilidade de



cálcio foi maior com a fortificação nos métodos utilizados, sendo que o oposto ocorreu com o ferro. Este fato demonstrou a interação entre cálcio e ferro, fato relatado em estudo *in vivo* (HALLBERG *et al.*, 1991), indicando a ingestão desses dois minerais em horários diferentes.

Moura e Canniatti-Brazaca (2006) avaliaram a biodisponibilidade do ferro do feijão comum e suas interações com ácido ascórbico e cistina, comparando com a disponibilidade do ferro da carne bovina pelo método de diálise. A carne apresentou a maior porcentagem de ferro dialisável, visto que contém aminoácidos que propiciam sua absorção, além de ser fonte de ferro heme. No entanto, o feijão, quando acrescido de cistina e ácido ascórbico, mostrou percentuais de dialisabilidade de ferro semelhantes aos da carne. Estes resultados demonstraram que apesar do feijão conter fatores antinutricionais que poderiam afetar a disponibilidade de ferro, o acréscimo simultâneo dos compostos citados favoreceu a absorção pelo método *in vitro*.

Outro estudo que demonstrou que a técnica *in vitro* consegue reproduzir resultados semelhantes ao *in vivo* foi realizado por Judprasong, Siripnyanond e Shiowatana (2007). Os autores encontraram que o FeNaEDTA foi mais biodisponível que o sulfato ferroso, fumarato ferroso, lactato ferroso e citrato de amônio férrico. Além disso, este método demonstrou o efeito positivo do ácido ascórbico e ácido cítrico, e negativo do fitato, tanino e oxalato na bioacessibilidade do sulfato ferroso. Estes autores discutem a utilização de diálise em fluxo contínuo, sendo que na parte que simula a fase intestinal do processo, seriam retiradas amostras continuamente, em diferentes tempos, e analisadas separadamente. Por este método seria possível verificar os momentos em que há maior passagem de minerais pela membrana, que ocorre principalmente no início da fase intestinal, quando o pH ainda não está tão elevado.

Ainda exemplificando estudos que utilizam a diálise para avaliar a bioacessibilidade de minerais, foi realizado um trabalho com leite e iogurte, que buscava avaliar o efeito da fortificação com NaFeEDTA e sulfato ferroso na biodisponibilidade de cálcio, ferro e zinco utilizando o método proposto por Miller *et al.* (1981). O acréscimo de NaFeEDTA proporcionou aumento na biodisponibilidade de ferro e zinco. Entretanto, quando o ácido ascórbico foi adicionado, a biodisponibilidade de ferro aumentou no leite fortificado com sulfato ferroso e reduziu no fortificado com NaFeEDTA. Os autores atribuíram o resultado

ao fato do ácido ascórbico tornar o meio ácido, o que causa a redução do ferro. O ferro reduzido se ligaria com maior força à caseína do que ao EDTA, e o composto ferro-caseína não passaria pela membrana de diálise (DRAGO e VALENCIA, 2008), diminuindo a biodisponibilidade do ferro usado na fortificação do leite, quando na forma de NaFeEDTA.

### ***Métodos in vivo***

Para os métodos *in vivo*, utilizando modelos animais, a técnica da depleção/repleção de hemoglobina proposto pela AOAC (1998) é recomendada e amplamente utilizada. Nesta técnica, a anemia é induzida nos animais e, posteriormente, os produtos-teste são oferecidos avaliando-se o ganho de hemoglobina, e utilizando três diferentes níveis de ferro, sendo ao final feita a análise por regressão linear. Uma adaptação do método da AOAC (1998) é a utilização de apenas um nível de ferro e posterior cálculo da Eficiência na Regeneração de Hemoglobina (HRE) (HARO-VICENTE *et al.*, 2008). A HRE é calculada utilizando a seguinte fórmula:

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

Sendo:

$$\text{mg Fe da Hb inicial} = [\text{peso inicial (g)} \times \text{Hb inicial (g/L)} \times 6,7 \times 0,335] / 1000$$

$$\text{mg Fe da Hb final} = [\text{peso final (g)} \times \text{Hb final (g/L)} \times 6,7 \times 0,335] / 1000$$

Nesta equação considera-se que o volume do sangue corresponde a 6,7% do peso corporal do animal; e o conteúdo de ferro da hemoglobina é 0,335 (HARO-VICENTE *et al.*, 2008). O consumo de ferro (Fe) é calculado considerando-se a quantidade total de dieta consumida e o conteúdo de ferro dessa dieta, sendo calculado para cada animal, segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Consumo de Fe} = \frac{\text{Consumo de dieta total na fase 2} \times \text{Ferro da dieta (mg/1000g)}}{1000}$$

O baixo teor de ferro do alimento, a pouca quantidade de produto teste disponível, ou a limitação de recursos, são alguns contratempos que podem determinar o uso da técnica que utiliza apenas um nível de ferro em detrimento da metodologia proposta pela AOAC (1998).

Outra técnica empregada em estudos com humanos e animais é a utilização de isótopos estáveis ou radioativos, analisando-se ao final do tratamento a contagem de corpo inteiro em equipamento específico ou incorporação nas células vermelhas do sangue. Em humanos, a segunda técnica é mais utilizada devido à baixa disponibilidade de contadores de corpo inteiro de grande porte. A utilização de isótopos radioativos apresenta limitações visto seu possível dano à saúde, principalmente em se tratando de crianças, gestantes e idosos. Neste sentido, a utilização de isótopos estáveis é mais recomendada, entretanto seu custo elevado reduz a aplicação destes compostos nos estudos de biodisponibilidade (VAN CAPEN e GLAHN, 1999).

A incorporação de isótopos de ferro nas células vermelhas foi a técnica utilizada para mensurar a biodisponibilidade de ferro de uma refeição contendo arroz e algas marinhas. Neste estudo, observou-se que a adição de algas marinhas ao arroz proporcionou um aumento na quantidade de ferro consumido na forma biodisponível, o que poderia ser uma alternativa para os indivíduos vegetarianos (GARCIA-CASAL *et al.*, 2007).

As técnicas *in vitro* são relativamente fáceis de executar, apresentam custo mais baixo em relação as *in vivo*, e permitem um maior controle das variáveis experimentais. Entretanto apresentam como limitação o fato de não considerarem os fatores fisiológicos que afetam a eficiência da absorção, como estado nutricional, transporte ativo, interação com a mucosa e flora intestinal (MILLER *et al.*, 1981; HEMALATHA *et al.*, 2007).

Em paralelo ao mencionado acima, Laparra *et al.* (2008) avaliaram o efeito da inulina, um prebiótico, na biodisponibilidade de ferro do NaFeEDTA e do sulfato ferroso utilizando o método da diálise e por células Caco-2. Pelo método da diálise, a adição de inulina reduziu a biodisponibilidade de ferro do sulfato ferroso entretanto aumentou a do NaFeEDTA. Os autores relatam que o ferro do sulfato se dissocia em meio ácido, e posteriormente, pode ter se ligado a inulina, que não atravessa a membrana da diálise, reduzindo sua bioacessibilidade mensurada por esta técnica. Já

o ferro do NaFeEDTA não se dissociou, assim a inulina não interferiu na sua “absorção”.

Entretanto, ao avaliar a biodisponibilidade de ferro pelo método das células Caco-2, não houve diferença com o acréscimo de inulina nos dois compostos analisados. Este fato teria ocorrido pois a absorção de ferro seria saturável, não aumentando com maiores quantidades de ferro (LAPARRA *et al.*, 2008).

Já em estudo realizado com porcos, verificou-se que a adição de 4% de inulina a uma dieta a base de milho e soja, proporcionou melhor recuperação de hemoglobina. Desta forma, a inulina resultou em maior biodisponibilidade de ferro intrínseco, já que neste caso não foi adicionado outra fonte de ferro (YASUDA *et al.*, 2006). Este resultado controverso com o estudo anteriormente citado demonstra a necessidade de se realizar estudos *in vivo* antes de se chegar a uma afirmação conclusiva.

Para estudos de melhoramento genético, em que muitas variedades são desenvolvidas e precisam ser testadas, as técnicas *in vitro* são mais indicadas para uma avaliação inicial devido ao baixo custo e maior praticidade em relação às técnicas *in vivo*, além de atender aos princípios éticos da experimentação animal. Os ensaios com animais e humanos são importantes, e necessários para melhor elucidção da biodisponibilidade do mineral, devendo assim suceder o ensaio químico dos materiais que demonstrarem maior potencial para a biofortificação (WELCH e GRAHAM, 2004). Além disso, Forbes *et al.* (1989) encontraram resultados concordantes entre diálise e ensaio clínico, indicando que este método *in vitro* seria uma boa alternativa para uma primeira avaliação da biodisponibilidade de ferro dos alimentos. Porém estes mesmos autores observaram diferenças interlaboratoriais no ferro dialisável, indicando a necessidade de grande controle durante a execução do procedimento *in vitro*.

### **Biofortificação de milho: alternativa na prevenção e combate à deficiência de ferro**

No combate à carência de ferro, o tratamento medicamentoso e suplementar, bem como a modificação no hábito alimentar são estratégias adotadas. Entretanto, a mudança de hábito é um objetivo muitas vezes difícil de alcançar (ZIMMERMANN e HURRELL, 2007). Outro problema é a dieta monótona consumida pelas

populações menos favorecidas nos países em desenvolvimento, que contribui para o desenvolvimento das deficiências nutricionais (MAYER *et al.*, 2008).

A fortificação dos alimentos é uma alternativa para o combate desta doença. Entretanto, em certas situações, pode não exercer os efeitos desejados, principalmente nas regiões rurais e menos favorecidas, onde o acesso aos alimentos industrializados é limitado, inviabilizando o recebimento do mineral adicionado durante o processamento (ZIMMERMANN e HURRELL, 2007). Outros fatores que contribuem para a ineficácia do programa de fortificação industrial são a utilização de sais com baixa biodisponibilidade do mineral e uso de sais que interagem com a matriz alimentar alterando as características do produto. Além disso, há falta de fiscalização quanto a adição de um sal biodisponível, na quantidade adequada, considerando os fatores antinutricionais (UAUY *et al.*, 2002). Ainda, segundo Davidsson e Nestel (2004), embora muitos países tenham experiência de longa data com tais medidas de intervenção, há poucas informações disponíveis a respeito da eficácia das mesmas.

A distribuição de suplementos e a fortificação de alimentos têm desconsiderado ainda as interações que podem ocorrer entre os minerais dos outros alimentos consumidos concomitantemente, vindo a interferir de forma negativa na biodisponibilidade dos mesmos, afetando o estado nutricional e a saúde dos indivíduos (LOBO e TRAMONTE, 2004).

Nesse contexto, a agricultura pode contribuir significativamente para reduzir as deficiências humanas de micronutrientes, com intervenções primárias sustentáveis, como o enriquecimento de alimentos por meio do melhoramento genético convencional ou por engenharia genética (POLETTI *et al.*, 2004; GENC *et al.*, 2005; WELCH e GRAHAM, 2005).

A biofortificação pode ser uma alternativa para fornecer um alimento com maior teor de ferro disponível ao ser humano (OIKEH *et al.*, 2003). Esta ainda é uma alternativa que pode atingir as populações rurais que não consomem, ou consomem pouco, produtos industrializados fortificados no processamento. Desta forma, conseguiria abranger uma maior parcela da população. Em paralelo, após o desenvolvimento do genótipo, a produção do alimento causaria menos gastos do que aqueles com a fortificação/suplementação, um fator positivo principalmente nos países em desenvolvimento, onde o governo tem grande intervenção arcando com parte dos custos (MAYER *et al.*, 2008).

Ainda, genótipos biofortificados apresentam o potencial de fornecer aos países em desenvolvimento benefícios contínuos, ano após ano. As sementes obtidas poderão ser adaptadas às condições de crescimento dos diversos ecossistemas. Sendo assim, a introdução de produtos agrícolas por meio de genótipos melhorados, que apresentem maiores concentrações de minerais e vitaminas, atuará de forma complementar às intervenções nutricionais existentes. Além disso, apresenta uma maior probabilidade de atingir indivíduos com pouco acesso aos produtos industrializados e aos sistemas de saúde (HARVEST PLUS, 2004).

Antes que um produto biofortificado seja disponibilizado para a população, alguns critérios devem ser observados, como apresentar boa produtividade e estabilidade em diferentes ambientes e climas; além do aumento no conteúdo do nutriente ser significativo, isto é, exercer efeito na saúde humana melhorando o estado nutricional (WELCH e GRAHAM, 2004). Assim, a avaliação do impacto nutricional deste produto deve ser realizada, o que na maioria das vezes não ocorre (HIRSCHI, 2008).

A biofortificação dos alimentos deve ser incentivada, visto ser uma alternativa no combate às carências nutricionais. Além disso, sementes com maior teor de mineral apresentam melhor desenvolvimento, favorecendo sua produtividade (WELCH e GRAHAM, 2004).

No Brasil, as pesquisas e o desenvolvimento de linhagens de milho biofortificadas com alto teor de carotenóides, ferro e zinco foi iniciado em 2004 na Embrapa Milho e Sorgo, como parte de um programa mundial de geração de culturas biofortificadas denominado *Harvest Plus*. O projeto nacional está sendo direcionado às regiões tropicais, especialmente na geração de variedades adaptadas ao plantio em regiões semi-áridas, uma vez que no Nordeste do Brasil há grande prevalência de deficiências nutricionais, além de concentrar maior consumo de milho e derivados. Os materiais adaptados para regiões tropicais do Brasil podem ser utilizados em outros continentes, como o africano, região do planeta mais atingida por deficiências nutricionais e onde o milho é muito consumido.

O milho é um cereal muito utilizado na alimentação brasileira, sendo as principais formas de consumo o grão, em espiga ou enlatado, creme de milho, flocos de milho e fubá (PAES, 2006). A estimativa da produção nacional do milho para 2009/2010 é de quase 52 milhões de toneladas, sendo Minas Gerais o terceiro maior produtor no Brasil (BRASIL, 2009).

O grão de milho tem peso médio de 250 a 300 mg, e é principalmente composto de amido. Sua composição também apresenta cerca de 9,5% de proteína (deficiente nos aminoácidos lisina e triptofano, entretanto, rico em metionina e cisteína), 9% de fibra alimentar (principalmente hemicelulose e celulose) e 4% de lipídio (PAES, 2006).

Este alimento contém como principal mineral o fósforo, porém, na forma de fitato, além de potássio e magnésio. Também contém outros minerais, no entanto em menor quantidade, como o cloro, cálcio, ferro, zinco, manganês, iodo, cobre, cobalto, cádmio, selênio e cromo; presentes principalmente no gérmen (PAES, 2006).

O conteúdo de ferro no milho apresenta grande variação. Em análise realizada em 301 linhagens de milhos provenientes da Embrapa Milho e Sorgo, os valores de ferro variaram de 20,6 a 29,9 ppm (GUIMARÃES *et al.*, 2005). Simic *et al.* (2009) encontraram uma média de 24,20 ppm. Em outro estudo que avaliou alimentos consumidos no sul da Etiópia, o teor de ferro encontrado em grão de milho branco inteiro e seco foi 44 ppm (ABEBE *et al.*, 2007), e em alimentos consumidos na China o milho moído continha 4,3 ppm de ferro (MA *et al.*, 2005). Ainda, estudo realizado por Hambidge *et al.* (2004) com genótipos de milho com menor teor de fitato e comuns, encontraram resultados que variaram de 18,1 a 20,0 ppm de ferro. Essas diferenças no conteúdo de ferro podem ser devido às diferentes concentrações do mineral nos solos, fator que altera o teor final nos alimentos (BÄNZIGER e LONG, 2000; OIKEH *et al.*, 2003). Além disso, cada estudo analisou diferentes genótipos de milho, o que demonstra a grande variedade genética na concentração de ferro entre os milhos cultivados no mundo.

Para o outro mineral que também é alvo da biofortificação, o zinco, constata-se grande variedade de concentração nos diversos estudos relatados na literatura. Oikeh *et al.* (2003) encontraram valores de 16,5 a 20,5 ppm; Hemalatha *et al.* (2007) já observaram valores menores de 14,8 ppm; e Simic *et al.* (2009) relataram valor médio de 21,71 ppm, variando de 16,35 a 28,56 ppm. Assim, para o zinco, a variabilidade de conteúdo encontrada também indica que o melhoramento genético convencional poderia ser utilizado para o desenvolvimento de genótipos com maior teor do mineral.

O milho naturalmente possui carotenóides em sua composição, principalmente zeaxantina, luteína, beta-criptoxantina, alfa e beta carotenos; que conferem a cor amarelada do grão (MENKIR *et al.*, 2008). Estudos recentes relatam

diferentes teores de carotenóides, variando de 2,01 a 19,63 ppm em amostras de variedades Crioulo e locais de Santa Catarina-Brasil (KUHNNEN, 2007); de 9,9 a 36,96 ppm em amostras fornecidas pelo Department of Crop Sciences, University of Illinois, Urbana IL, USA (HULSHOF *et al.*, 2007); e de 9,81 a 14,27 ppm em milho amarelo proveniente de três fornecedores nos Estados Unidos (LAYRISSE *et al.*, 1997). Esta variação no teor de carotenóides dependendo do genótipo analisado indica a possibilidade de aumentar o conteúdo deste nutriente utilizando o melhoramento genético convencional. Os carotenóides, principalmente os com atividade pró-vitamina A, influenciam positivamente na absorção de ferro por formarem complexos solúveis com o mineral que proporcionaria maior quantidade de ferro solúvel na fase intestinal, que estaria assim disponível para absorção (LAYRISSE *et al.*, 1997).

Também se verifica a presença de polifenóis no milho, variando de 51,29 a 1132 µg/g de farinha (KUHNNEN, 2007), o que deve ser considerado visto que alguns polifenóis apresentam influência negativa na biodisponibilidade de ferro.

Outro composto presente no milho que apresenta efeito negativo na biodisponibilidade de ferro é o fitato. No estudo realizado por Lorenz *et al.* (2007) com genótipos de milho de um germoplasma dos Estados Unidos, a quantidade de fitato apresentou valor médio de 1,15%. Um milho proveniente do sul da Etiópia apresentou 1,44% de fitato, sendo quantificado somente inositol penta- e hexafosfato (ABEBE *et al.*, 2007). Um fato a se observar nos resultados relatados é a técnica utilizada em que no primeiro estudo dosou-se por colorimetria e no segundo por cromatografia de alta eficiência (HPLC). Relata-se na literatura que o método da AOAC, assim como outros métodos colorimétricos, superestimam os valores de fitato por considerar os inositol mono, bi, tri, tetra, penta e hexafosfato, além de outros fosfatos como compostos fósforo-nucleotídeos e adenosina trifosfato; e por HPLC quantifica-se apenas os inositol tri, tetra, penta e hexafosfato (BRUNE *et al.*, 1992). Sabe-se que o inositol penta e hexafosfato que seriam os inibidores da absorção de ferro (BRUNE *et al.*, 1992) e o método da AOAC e outros colorimétricos não quantificam estas frações isoladamente. Assim, recomenda-se a quantificação do fitato por HPLC, pois esta técnica forneceria um resultado mais acurado. Todavia cabe ressaltar que uma limitação na utilização desta técnica é o custo elevado do equipamento, das colunas e dos padrões utilizados. Ainda, os resultados destes dois trabalhos indicaram que o método colorimétrico apresentou



resultado semelhante ao utilizando o HPLC para amostras de milho, podendo ser utilizado para se obter um valor aproximado do teor de fitato das amostras quando há limitação de recursos e equipamentos. Em paralelo, Raboy *et al.* (2000) verificaram que no milho cerca de 90% do fósforo está presente nos inositóis penta- e hexafosfato, o que pode ser a causa dos resultados semelhantes encontrados ao se utilizar o método colorimétrico e HPLC para este alimento.

A razão molar fitato:ferro é um parâmetro utilizado para avaliar indiretamente a biodisponibilidade de ferro, sendo que um valor maior que 1 significa que o alimento possui baixa biodisponibilidade (HALLBERG *et al.*, 1989). O estudo realizado na Etiópia (ABEBE *et al.*, 2007), apresentou razão molar fitato:ferro foi maior que 1 (27,8), indicando uma possível baixa biodisponibilidade de ferro presente no milho.

De acordo com o relatado acima, diversos estudos já estão sendo realizados utilizando linhagens e híbridos de milho com as características desejáveis do ponto de vista da biodisponibilidade. Hambidge *et al.* (2004) avaliaram a biodisponibilidade de zinco de genótipos de milho com menor teor de fitato em humanos, utilizando a farinha de milho em tortilhas. Os autores encontraram que os genótipos com menor teor de fitato apresentavam maior absorção fracional de zinco e maior absorção total de zinco, com influência do teor de fitato e razão molar fitato:zinco, indicando o efeito positivo da utilização de genótipos com menor conteúdo de fitato. Sabe-se que o ferro é um metal divalente, assim como o zinco, e portanto, apresentariam a mesma rota de absorção. Esta observação indica que o resultado relatado por Hambidge *et al.* (2004) para zinco possivelmente seria semelhante para o ferro.

Outros compostos que também são alvo dos estudos de biofortificação são os carotenóides, que também apresentam efeitos benéficos na biodisponibilidade de ferro (LAYRISSE *et al.*, 1997). Howe e Tanumihardjio (2006) relataram que ao fornecer para gerbrios um genótipo de milho biofortificado com maior teor de carotenóides, esta genótipo forneceu carotenóides pró-vitamina A tão biodisponíveis quanto suplementos de beta-caroteno, indicando que a biofortificação foi eficaz no fornecimento de carotenóides biodisponíveis aos animais.

Em um estudo realizado com arroz, outro cereal amplamente consumido no mundo, Haas *et al.* (2005) avaliaram o efeito do consumo deste alimento biofortificado em 192 mulheres filipinas por nove meses. Não houve mudança na

hemoglobina das participantes, todavia cabe ressaltar que as mulheres inclusas no estudo apresentavam hemoglobina acima de 10,5 mg/dL, o que explicaria este resultado. Além disso, sabe-se que a hemoglobina é o último estágio da deficiência, e somente um elevado aumento no consumo causaria grandes modificações neste parâmetro. Todavia, verificou-se que o consumo do arroz biofortificado causou aumento na ferritina sérica, que seria o primeiro parâmetro a se modificar com a deficiência de ferro. Ainda, mulheres com baixo ferro corporal (percentil 25) no início do experimento apresentaram aumento de 22  $\mu\text{mol/kg}$  de ferro após os nove meses de intervenção. Estes últimos resultados apresentados indicam que a biofortificação foi capaz de melhorar o estado nutricional de ferro, apesar de não exercer efeito na hemoglobina.

As plantas melhoradas geneticamente, que possuem maior conteúdo de ferro e zinco, apresentam um melhor desenvolvimento e maior resistência à doença e estresse, apresentando assim melhor produtividade em solos pobre ou deficiente em minerais. Estas características indicam um potencial efeito benéfico na utilização de plantas biofortificadas em países que possuem o solo deficiente, o que geralmente ocorre nos países em que as pessoas sofrem com a deficiência do mineral (WELCH, 2002)

### **Conclusão**

Existem diversos fatores que afetam a disponibilidade de ferro, o que denota a importância de se avaliar a biodisponibilidade antes de oferecer um alimento à população com o objetivo de prevenir e controlar a deficiência de ferro. O método de diálise parece fornecer bons resultados para avaliar a acessibilidade de minerais, sendo concordantes com alguns resultados relatados em estudos *in vivo*. Além disso, pelos estudos citados, pode-se observar a utilização deste método em grande variedade de alimentos, e na avaliação da interferência de diversos componentes da dieta.

Entretanto, devido a alguns resultados não coerentes encontrados entre o método *in vitro* e os observados em estudos realizados com animais e humanos, os dados devem ser avaliados com cautela. Esses resultados divergentes podem ser devido a fatores do próprio organismo que afetam a biodisponibilidade dos minerais, e que não são simuláveis pelos métodos *in vitro*.

Todavia, no melhoramento genético, os métodos *in vitro* poderiam ser utilizados como teste preliminar na avaliação da biodisponibilidade de minerais, porém são necessários estudos *in vivo* para as conclusões finais de qual genótipo deve ser oferecida à população.

Visto as características apresentadas pelo milho, contata-se que há grande variação dos mesmos dependendo do genótipo avaliado. Estas observações indicam a utilização promissora deste alimento nos programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de genótipos com maior teor de ferro biodisponível, maior conteúdo de carotenóides e menor de fitato.

## Referências Bibliográficas

ABEBE, Y.; BOGAL, A.; HAMBIDGE, K.M.; STOECKER, B.J.; BAILEY, K.; GIBSON, R.S. Phytate, zinc, iron and calcium content of selected raw and prepared foods consumed in rural Sidama, Southern Ethiopia, and implications for bioavailability. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, n.3-4, p.161-168, 2007.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16.ed. rev. 4. Washington, D.C., 1998. 2v. 1170p.

BÄNZIGER, M.; LONG, J. The potential for increasing the iron and zinc density of maize through plant-breeding. **Food and Nutrition Bulletin**, v.21, n.4, p.397-400, 2000.

BEISEIGEL, J.M.; HUNT, J.R.; GLAHN, R.P.; WELCH, R.M., MENKIR, A.; MAZIYA-DIXON, B.B. Iron bioavailability from maize and beans: a comparison of human measurements with Caco-2 cell and algorithm predictions. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.86, p.388-396, 2007.

BRASIL. **Panorama do milho**. 2009. [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acessado em 22/12/2009.

BREMNER, I.; BEATTIE, J.H. Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.54, n. 2, p.489-499, 2007.

BRIGIDE, P.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Antinutrients and "in vitro" availability of iron in irradiated common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Chemistry**, v.98, n.1, p.85-89, 2006.

BRUNE, M.; ROSSANDER-HULTEN, L.; HALLBERG, L.; GLEERUP, A.; SANDBERG, A. Iron Absorption from Bread in Humans: Inhibiting Effects of Cereal Fiber, Phytate and Inositol Phosphates with Different Numbers of Phosphate Groups. **Journal of Nutrition**, v.122, n.3, p.442-449, 1992.

CHERUKURI, S.; POTLA, R.; SARKAR, J.; NURKO, S.; HARRIS, Z.L.; FOX, P. L. Unexpected role of ceruloplasmin in intestinal iron absorption. **Cell Metabolism**, v.2, p.309-319, 2005.

CONRAD, M.E.; UMBREIT, J.N.; MOORE, E.G.; PETERSON, R.D.; JONES, M.B. A newly identified iron binding protein in duodenal mucosa of rats. Purification and characterization of mobilferrin. **Journal of Biological Chemistry**, v.265, p.5273-5279, 1990.

CONRAD, M.E.; UMBREIT, J.N.; PETERSON, R.D.; MOORE, E.G.; HARPER, K.P. Function of integrin in duodenal mucosal uptake of iron. **Blood**, v.81, p.517-521, 1993.

DAVIDSSON, L.; NESTEL, P. Efficacy and Effectiveness of Interventions to Control Iron Deficiency and Iron Deficiency Anemia. **International Nutritional Anemia Consultative Group**. Washington, 2004

DAVIDSSON, L.; ZIEGLER, E.E.; KASTENMAYER, K.; VAN DAEL, P.; BARCLAY, D. Dephytinisation of soyabean protein isolate with low native phytic acid content has limited impact on mineral and trace element absorption in healthy infants. **British Journal of Nutrition**, v.91, n. 2, p.287-293, 2007.

DORIA, E.; GALLESCHI, L.; CALUCCI, L.; PINZINO, C.; PILU, R.; CASSANI, E.; NIELSEN, E. Phytic acid prevents oxidative stress in seeds: evidence from a maize (*Zea mays* L.) low phytic acid mutant. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.967-978, 2009.

DRAGO, S.R.; VALENCIA, M.E. Mineral dialyzability in milk and fermented dairy products fortified with FeNaEDTA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.56, p.2553-2557, 2008.

FELIX, M.A.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Disponibilidade de ferro in vitro de grãos de soja tostados por diferentes tratamentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.78-83, 2008.

FORBES, A. L.; ARNAUD, M. J.; CHICHESTER, C. O.; COOK, J. D.; HARRISON, B. N.; HURRELL, R. F.; KAHN, S. G.; MORRIS, E. R.; TANNER, J. T.; WHITTAKER, P. Comparison of in vitro, animal, and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutritional Anemia Consultative Group Task Force report on iron bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.49, p.225-238, 1989.

FRAZER, D.M.; WILKINS, S. J.; BECKER, E.M.; VULPE, C.D.; MCKIE, A.T.; TRINDER, D.; ANDERSON, G.J. Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. **Gastroenterology**, v.123, p.835-844, 2002.

GANZ, T. Heparin-a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v.18, p.171-182, 2005.

GARCIA-CASAL, M.N.; PEREIRA, A.C.; LEETS, I., RAMIREZ,J.; QUIROGA, M.F. High Iron Content and Bioavailability in Humans from Four Species of Marine Algae. **Journal of Nutrition**, v.137, p.2691-2695, 2007.

GENC, Y.; HUMPHRIES, J.M.; LYONS, G.H.; GRAHAM, R.D. Exploiting genotypic variation in plant nutrient accumulation to alleviate micronutrient deficiency in populations. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.18, p.319-324, 2005.

GLAHN, R.P.; CHENG, Z.; WELCH, R.M.; GREGORIO, G.B. Comparison of Iron Bioavailability from 15 Rice Genotypes: Studies Using an in Vitro

Digestion/Caco-2 Cell Culture Model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3586-3591, 2002.

GUIMARÃES, P.E.O.; RIBEIRO, P.E.A.; PAES, M.C.D.; SCHAFFERT, R.E.; ALVES, V.M.C.; COELHO, A.M.; NUTTI, M.; VIANA, J.L.C.; NOGUEIRA, A.R.A.; SOUZA, G.B. **Caracterização de linhagens de milho quanto aos teores de minerais nos grãos**. Circular técnica 64. Sete Lagoas. Dezembro. 2005.

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.

HALLBERG, L.; BRUNE, M.; ROSSANDER, L. Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. **American Journal Clinical Nutrition**, v.49, n.1, p.140-144, 1989.

HALLBERG, L.; BRUNE, M.; ERLANDSSON, M.; SANDBERG, A.S.; ROSSANDER-HULTEN, L. Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.53, p.112-119, 1991.

HAMBIDGE, K. M.; HUFFER, J.W.; RABOY, V.; GRUNWALD, G.K.; WESTCOTT, J.L.; SIAN, L.; MILLER, L.V.; DORSCH, J. A.; KREBS, N.F. Zinc absorption from low-phytate hybrids of maize and their wild-type isohybrids. **American Journal Clinical Nutrition**, v.79, n.6, p.1053-1059, 2004.

HARO-VICENTE, J.; PÉREZ-CONESA, D.; RINCÓN, F.; ROS, G.; MARTÍNEZ-GRACIÁ, C.; VIDAL, M. Does ascorbic acid supplementation affect iron bioavailability in rats fed micronized dispersible ferric pyrophosphate fortified fruit juice? **European Journal of Nutrition**, v.47, n.8, p.470-478, 2008.

HARVEST PLUS. **Desenvolvendo Produtos Agrícolas Mais Nutritivos**. 2004. Disponível em: <http://www.harvestplus.org/pdfs/brochurepo.pdf>. Acesso em: 14 de dezembro de 2008.

HEMALATHA, S.; PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Zinc and iron contents and their bioaccessibility in cereals and pulses consumed in India. **Food Chemistry**, v.102, p.1328-1336, 2007.

HIRSCHI, K. Nutritional improvements in plants: time to bite on biofortified foods. **Trends in Plant Science**, v.13, n.9, p.459-463, 2008.

HOWE, J.A.; TANUMIHARDJO, S.A. Carotenoid-Biofortified Maize Maintains Adequate Vitamin A Status in Mongolian Gerbils. **Journal of Nutrition**, v.136, p.2562-2567, 2006.

HULSHOF, P.J.M.; KOSMEIJER-SCHUIL, T.; WEST, C.E.; HOLLMAN, P.C.H. Quick screening of maize kernels for provitamin A content. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, n.8, p.655-661, 2007.

INSTITUTE OF MEDICINE. **DRI – Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc.** National Academic Press, Washington, D.C., 2000. Disponível em URL: <http://www.nap.edu>.

JUDPRASONG, K., SIRIPINYANOND, A., SHIOWATANA, J. Towards better understanding of *in vitro* bioavailability of iron through the use of dialysis profiles from a continuous-flow dialysis with inductively coupled plasma spectrometric detection. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.22, p. 807-810, 2007.

KUHNEN, S. **Metabolômica e bioprospecção de variedades crioulas e locais de milho (*Zea mays* l.).** 2007. 267p. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2007.

LAPARRA, J.M.; GLAHN, R.P.; MILLER, D.D. Effect of tea phenolics on iron uptake from different fortificants by Caco-2 cells. **Food Chemistry**, v.115, p.974-981, 2009.

LAYRISSE, M.; GARCÍA-CASAL, M.N.; SOLANO, L.; BARON, M.A.; ARGUELLO, F.; LLOVERA, D.; RAMÍREZ, J.; LEETS, I.; TROPPER, E. The role of vitamin A on the inhibitors of nonheme iron absorption: Preliminary results. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.8, n.2, p.61-67, 1997.

LOBO, A.S.; TRAMONTE, V.L.C. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. **Revista de Nutrição**, v.17, p.107-113, 2004.

LORENZ, A.J.; SCOTT, M.P.; LAMKEY, K.R. Quantitative Determination of Phytate and Inorganic Phosphorus for Maize Breeding. **Crop Science**, v.47, n.2, p.600-604, 2007.

LUTEN, J.; CREWS, H.; FLYNN, A.; DAEL, P.V.; KASTENMAYER, P.; HURRELL, R.; DEELSTRA, H.; SHEN, L.; FAINVEATHER-TAIT, S.; HICKSON, K.; FARRÉ, R.; SCHLEMMER, U.; FRARHLICH, W. Interlaboratory trial on the determination of the *in vitro* iron dialysability from food. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.72, p.415-424, 1996.

MA, G.; JIN, Y.; PIAO, J.; KOK, F.; GUUSJE, B.; JACOBSEN, E. Phytate, Calcium, Iron, and Zinc Contents and Their Molar Ratios in Foods Commonly Consumed in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.26, p.10285-10290, 2005.

MACHADO, F. M. V. F.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; PIEDADE, S. M. S. Avaliação da disponibilidade de ferro em ovo, cenoura e couve e em suas misturas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.610-618, 2006.

MAYER, J.E.; PFEIFFER, W.H.; BEYER, P. Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, n.2, p.166-170, 2008.

MENKIR, A.; LIU, W.; WHITE, W.S.; MAZIYA-DIXON, B.; ROCHEFORD, T. Carotenoid diversity in tropical-adapted yellow maize inbred lines. **Food Chemistry**, v.109, p.521-529, 2008.

MILLER, D. D.; SCHRICKER, B. R.; RASMUSSEN, R. R.; VAN CAMPEN, D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.34, p.2248-2256, 1981.

MOURA, N.C.D.; 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**, v.26, p.270-276, 2006.

OIKEH, S.O.; MENKIR, A.; MAZIYA-DIXON, B.; WELCH, R.; GLAHN, R.P. Assessment of Concentrations of Iron and Zinc and Bioavailable Iron in Grains of Early-Maturing Tropical Maize Varieties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, n.12, p.3688-3694, 2003.

OLIVARES, M.; PIZARRO, F.; RUZ, M. New insights about iron bioavailability inhibition by zinc. **Nutrition**, v.23, p.292-295, 2007.

PABON, M.L.; LONNERDAL, B. Effects of type of fat in the diet on iron bioavailability assessed in suckling and weanling rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.15, p.18-23, 2001.

PAES, M.C.D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas, MG: Embrapa CNPMS, 6p. (Embrapa-CNPMS, circular técnica, 75), 2006.

PERALES, S.; BARBEÁ, R.; LAGARDA, M.A.J.S.; FARRÉ, R. Fortification of Milk with Calcium: Effect on Calcium Bioavailability and Interactions with Iron and Zinc. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.4901-4906, 2006.

POLETTI, S.; GRUISSEM, W.; SAUTTER, C. The nutritional fortification of cereals. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p.162-165, 2004.

PORRES, J. M.; STAHL, C. H.; CHENG, W. H.; FU, Y.; RONEKER, K. R.; POND, W.G.; LEI, X. G. Dietary intrinsic phytate protects colon from lipid peroxidation in pigs with a moderately high dietary iron intake. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.221, p.80-86, 1999.

PUSHPANJALI; KHOKHAR, S. In vitro availability of iron and zinc from some Indian vegetarian diets: correlations with dietary fibre and phytate. **Food Chemistry**, v.56, n.2, p.111-114, 1996.



RABOY, V.; GERBASI, P.F.; YOUNG, K.A.; STONEBERG, S.D.; PICKETT, S.G.; BAUMAN, A.T.; MURTHY, P.P.N.; SHERIDAN, W.F.; ERTL, D.S. Origin and Seed Phenotype of Maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. **Plant Physiology**, v.124, p.355-368, 2000.

RONG, L.I.; KANG-NING, W. Nixtamalization Effects on the Contents of Phytic Acid in the Varieties of Maize and the Bioavailability of Iron in Nixtamalized Maize to Young Pigs. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.8, n.6, p.905-909, 2009.

SARTORI, E.V. **Concentração de proteínas (fosvitina e lipovitulina) em gemas de ovos de galinhas (*Gallus gallus*) nos diferentes ciclos de postura e sua interferência na disponibilidade do ferro**. 2007. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2007.

SIMIC, D.; SUDAR, R.; LEDENCAN, T.; JAMBROVIC, A.; ZDUNIC, Z.; BRKIC, I.; KOVACEVIC, V. Genetic variation of bioavailable iron and zinc in grain of a maize population. **Journal of Cereal Science**, v.50, p.392-397, 2009.

UAUY, R.; HERTRAMPF, E.; REDDY, M. Iron Fortification of Foods: Overcoming Technical and Practical Barriers. **Journal of Nutrition**, v.132, n.4, p.849S-852, 2002.

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

VITALI, D.; VEDRINA DRAGOJEVIC, I.; SEBECIC, B.; VUJIC, L. Impact of modifying tea-biscuit composition on phytate levels and iron content and availability. **Food Chemistry**, v.102, p.82-89, 2007.

VITOLO, M.R. Anemia no Brasil: até quando? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.30, p.429-431, 2008.

WELCH, R.M. Breeding Strategies for Biofortified Staple Plant Foods to Reduce Micronutrient Malnutrition Globally. **Journal of Nutrition**, v.132, p.495S-499, 2002.

WELCH, R.M.; GRAHAM, R.D. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.396, p.353-364, 2004.

\_\_\_\_\_. Agriculture: the real nexus for enhancing bioavailable micronutrients in food crops. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.18, n.4, p.299-307, 2005.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005 : WHO global database on anaemia**. Geneva: WHO, 2008.

WYATT, C.J.; TRIANA-TEJAS, A. Soluble and Insoluble Fe, Zn, Ca, and Phytates in Foods Commonly Consumed in Northern Mexico. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.10, p.2204-2209, 1994.

YASUDA, K.; RONEKER, K.R.; MILLER, D.D.; WELCH, R.M.; LEI, X.G. Supplemental dietary inulin affects the bioavailability of iron in corn and soybean meal to young pigs. **Journal of Nutrition**, v.136, p.3033-3038, 2006.

ZIMMERMANN, M.B.; HURRELL, R.F. Nutritional iron deficiency. **The Lancet**, v.370, n.9586, p.511-520, 2007.

## **CAPÍTULO 2: BIODISPONIBILIDADE DE FERRO DE GENÓTIPOS DE MILHO: AVALIAÇÃO POR MÉTODOS *IN VITRO* E *IN VIVO*.**

### **Introdução**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, há aproximadamente 2 bilhões de pessoas anêmicas no mundo, ou seja, 24,8% da população mundial, nos diferentes estratos sociais. Ainda, de cada dez, nove estão nos países em desenvolvimento, e cerca de 50% dos casos podem ser atribuídos à baixa ingestão de ferro biodisponível. A anemia é considerada um problema de saúde pública mundial grave no grupo de gestantes e crianças pré-escolares, sendo atribuída esta classificação quando a prevalência é maior que 40% (WHO, 2008).

A fortificação dos alimentos é uma alternativa adotada para o combate desta doença. Entretanto, em certas situações, pode não alcançar os efeitos desejados, principalmente nas regiões rurais e menos favorecidas, onde o acesso aos alimentos industrializados é limitado (ZIMMERMANN e HURRELL, 2007). Outro fator que contribui para a ineficácia do programa de fortificação industrial é a utilização de sais com baixa biodisponibilidade do mineral e que interagem com a matriz alimentar alterando as características do produto; além da falta de fiscalização quanto a adição de um sal biodisponível, na quantidade adequada, considerando os fatores antinutricionais (UAUY *et al.*, 2002). Ainda, segundo Davidsson *et al.* (2007), embora muitos países tenham experiência de longa data com tais medidas de intervenção, há poucas informações disponíveis a respeito da eficácia das mesmas.

A biofortificação pode ser outra alternativa para fornecer um alimento com maior teor de ferro disponível para o ser humano, atuando de forma complementar as intervenções nutricionais existentes (OIKEH *et al.*, 2003). Por meio desta intervenção pode-se atingir as populações rurais que não consomem, ou consomem pouco os produtos industrializados fortificados no processamento, aumentando assim a sua abrangência (MAYER *et al.*, 2008). Em paralelo, os genótipos biofortificados apresentam o potencial de fornecer aos países em desenvolvimento benefícios contínuos, ano após ano. Ainda esta forma de intervenção apresenta maior probabilidade de atingir indivíduos com pouco acesso aos produtos industrializados e aos sistemas de saúde (HARVEST PLUS, 2004).

No Brasil, as pesquisas e o desenvolvimento de linhagens de milho biofortificadas com alto teor de ferro, zinco e carotenóides foi iniciado em 2004 na Embrapa Milho e Sorgo, como parte de um programa mundial de geração de genótipos biofortificados denominado *Harvest Plus*. O projeto nacional está sendo direcionado às regiões tropicais, especialmente na geração de genótipos adaptados ao plantio em regiões semi-áridas, uma vez que no Nordeste do Brasil há grande prevalência de deficiências nutricionais, além de concentrar maior consumo de milho e derivados.

Ao utilizar a biofortificação para aumentar o conteúdo de minerais, é importante relacioná-los ao conceito de biodisponibilidade, sendo esta a fração dos nutrientes ingeridos que é utilizada para funções fisiológicas normais ou de reserva. Fatores dietéticos e fisiológicos interferem na biodisponibilidade dos minerais, como a eficiência da digestão, o estado nutricional do indivíduo, o tempo de trânsito intestinal e alguns outros nutrientes ou substâncias como as fibras alimentares e o fitato (PUSHPANJALI e KHOKHAR, 1996). Desta forma, somente um elevado teor de ferro no alimento não significa que este será uma alternativa eficaz na prevenção e tratamento da sua deficiência, pois nem sempre há uma correlação positiva entre conteúdo de ferro e sua biodisponibilidade (OIKEH *et al.*, 2003; HIRSCHI, 2008).

As técnicas que podem ser utilizadas para avaliar a biodisponibilidade de ferro são a *in vitro* como a diálise, e as *in vivo* com animais (ratos ou porcos) e humanos. No método *in vitro* ocorre a simulação da digestão que ocorre no trato digestório. Após esta fase, na diálise, é mensurada a quantidade de ferro que consegue atravessar uma membrana de diálise com poro de tamanho conhecido, sendo denominado ferro dialisável (MILLER *et al.*, 1981; HEMALATHA *et al.*, 2007). Para os métodos *in vivo*, utilizando modelos animais, a técnica da depleção/repleção de hemoglobina proposto pela AOAC (1998) é recomendada e amplamente utilizada. Nesta técnica, a anemia é induzida e, posteriormente, os produtos-teste são oferecidos como fonte de ferro, avaliando-se o ganho de hemoglobina, e utilizando três diferentes níveis do mineral, sendo ao final feita a análise por regressão linear. Uma adaptação do método da AOAC (1998) é a utilização de apenas um nível de ferro e posterior cálculo da Eficiência na Regeneração de Hemoglobina (HRE) (HARO-VICENTE *et al.*, 2008).

A análise da biodisponibilidade de minerais é de suma importância para avaliar se o programa de biofortificação alcançará seus objetivos. Todavia, o uso de

técnicas *in vivo* nestes programas é inviável devido ao grande número de materiais desenvolvidos que devem ser avaliados, além da quantidade insuficiente de amostra nas fases iniciais de estudo dos programas. Assim, como uma forma de detectar os genótipos desenvolvidos mais promissores, propõe-se a utilização de técnicas *in vitro*, como a diálise, que se trata de um método mais barato e de fácil execução que as metodologias *in vivo*. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a biodisponibilidade de ferro de milho e a possível correlação entre os resultados obtidos por diálise e por ensaio biológico. Objetivou-se ainda verificar a influência do teor de fitato e a razão fitato:ferro na biodisponibilidade de ferro analisada pelos métodos *in vitro* e *in vivo*.

## **Materiais e Métodos**

### ***Material***

Milho

Foram utilizados grãos de genótipos de milho selecionados para apresentar menor conteúdo de fitato, fornecidos pelo Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Milho e Sorgo. A biodisponibilidade de ferro pelo método *in vitro* da diálise foi realizada em 13 genótipos, sendo 11 híbridos e 2 variedades. Para o ensaio biológico, foram selecionadas cinco genótipos (4 híbridos e 1 variedade), que apresentavam pelo menos 13,86 ppm de ferro a fim de se obter dietas com 12 ppm do mineral após a adição dos demais ingredientes essenciais, como mix de minerais sem ferro, mix de vitaminas, bitartarato de colina e L-cistina.

Os grãos de milho foram submetidos à secagem em estufa de ventilação forçada, marca Adamo, modelo 960-PID, a 65 °C por 24 h e, após resfriamento foram processados em moinho, marca Trapp - modelo TRF 90. Em seguida, a farinha obtida foi acondicionada em sacos de polietileno, fechado a vácuo e armazenados sob refrigeração a 4 °C.

### ***Disponibilidade de ferro in vitro – Método da diálise***

#### ***Diálise***

A determinação do ferro dialisável e solúvel foi realizado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). Alguns testes preliminares, porém

não satisfatórios, foram realizados no Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa e estão descritos no Apêndice 1.

Antes de realizar a digestão simulada e a diálise, os tubos de diálise sofreram um tratamento que consistia na remoção da glicerina lavando com água deionizada em erlenmeyer, sob agitação, por 6 horas, com troca de água após 3 horas; remoção dos compostos sulfúricos imergindo em solução de sulfito de sódio 0,3% (w/v) a 80°C por 1 minuto; lavagem com água quente (60°C) por 2 minutos; seguido de acidificação com solução de ácido sulfúrico 0,2% (v/v), e manutenção em meio ácido até a utilização. No momento de utilizar o tubo, os mesmos foram enxaguados com água deionizada.

Esta análise foi realizada em treze genótipos de milho, segundo método proposto por Miller *et al* (1981), com algumas adaptações (Figura 1). A técnica consistiu na simulação do processo de digestão e absorção do trato digestório. Foram usadas as enzimas pepsina (VETEC – código 1221) e pancreatina (VETEC – código 1220), além do extrato de bile (Sigma-Aldrich – B8631). Pesou-se 400 mg de amostra em tubo Falcon. Na digestão gástrica foi utilizada solução pepsina-HCl (para 100 mL de solução: 0,2 g de NaCl; 0,32 g de pepsina; adição de HCl 12 mol/L até atingir pH 1,2; volume completado com água deionizada); incubada juntamente com a amostra (milho) em banho-maria a 37°C por duas horas, sob agitação a 300 rpm. Na fase intestinal, neste mesmo recipiente, foi adicionado NaHCO<sub>3</sub> 3M até atingir pH 7. Posteriormente, adicionou-se solução de pancreatina-bile (para 100 mL de solução: 0,68 g de K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 g de pancreatina; 1,25 g de extrato de bile; adição de NaOH 0,2 mol/L até atingir pH 6,8; volume completado com água deionizada); e a incubação em banho-maria a 37°C por duas horas, sob agitação a 300 rpm. Ao final deste período, realizou-se a centrifugação das amostras a 4000 rpm por quinze minutos, e o sobrenadante foi armazenado. Este sobrenadante foi analisado quanto ao teor de ferro por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (Simultaneous Multielement AA Spectrometer. SIMAA 6000, Perkin Elmer), sendo denominado ferro solúvel.

Do sobrenadante foram retirados 2 mL que foram colocados no interior do tubo de diálise preparados previamente (dialysis tubing, high retention seamless cellulose tubing. Average flat width 32 mm. D0530-100FT, Sigma-Aldrich), e fechados com um nó em cada extremidade. Estes tubos foram submersos em béqueres contendo um litro de água deionizada, sob mesa agitadora a 150 rpm, por

sete horas para determinação do ferro dialisável. Optou-se por utilizar mais que duas horas (que seria o proposto por Miller *et al.* 1981), pois a quantidade de ferro dialisável neste tipo de amostra era muito pequena após este tempo, dificultando a comparação dos dados. Outra justificativa para a utilização de sete horas foi um estudo realizado no Instituto de Química da USP em que se demonstrou que com esse tempo já era o suficiente para a passagem de todo ferro dialisável pela membrana (dados não publicados). O conteúdo de ferro que ficou no interior do tubo de diálise foi analisado por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (Simultaneous Multielement AA Spectrometer. SIMAA 6000, Perkin Elmer).

#### *Determinação de ferro*

O ferro total, solúvel e o retido no tubo de diálise foram quantificados por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (Simultaneous Multielement AA Spectrometer. SIMAA 6000, Perkin Elmer), que permite a quantificação deste elemento em parte por bilhão (ppb). Para digestão das amostras utilizou-se forno microondas (Microwave Sample Preparation System, Multiwave 3000, Anton Paar). Para a digestão das amostras sólidas foram pesadas cerca de 200 mg de amostra, e para as líquidas foram pipetadas 2 mL de amostra. Neste processo era adicionado nos tubos com a amostra a ser digerida 2 mL de HNO<sub>3</sub>, 1mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 3 mL de água deionizada. O programa de aquecimento utilizado está descrito no Quadro 1.

Quadro 1- Programa de aquecimento para digestão ácida de amostra de milho realizada em forno microondas

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)
1	80	05	02
2	140	05	05
3	190	10	35
4	0	-	20

Para determinar o teor de ferro dialisável foi feito o cálculo da diferença do teor de ferro solúvel em 2 mL e do teor de ferro retido no interior do tubo de diálise

após as sete horas de diálise, para assim obter a quantidade de ferro que passou pelo poro do tubo.

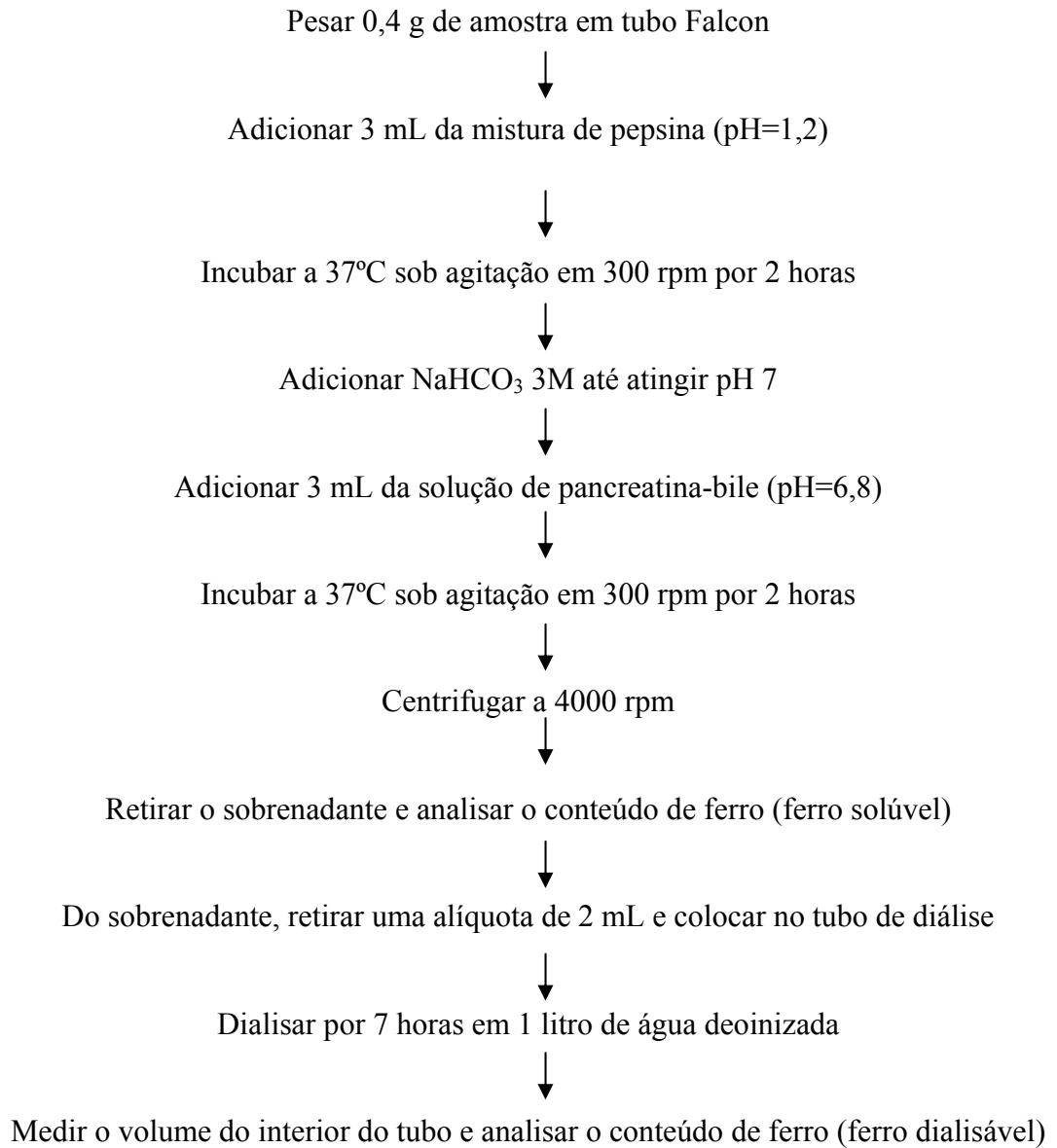


Figura 1- Fluxograma para determinação de ferro solúvel e ferro dialisável adaptado de Miller *et al.* (1981)



### *Determinação de fitato*

O teor de fitato do milho foi quantificado por método proposto por Haug e Lantzsch (1983), baseado na determinação colorimétrica do fósforo fítico.

Nesta técnica foram utilizadas duas soluções. A solução férrica (Solução 1) foi preparada dissolvendo, em béquer de 250 mL, 0,2 g de sulfato de Fe (III) e de amônio dodecaidratado em 100 mL de HCl 2 N. Após a dissolução, essa mistura foi vertida para um balão volumétrico de 1000 mL e completado o volume com água deionizada. A solução de 2,2'-bipiridina (Solução 2) foi preparada dissolvendo, em béquer de 50 mL, 10 g de 2,2'-bipiridina e 10 mL de ácido tioglicólico em água deionizada. A mistura foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL usando água deionizada para lavar as paredes do béquer, e completou-se o volume com água deionizada. Esta segunda solução estável por vários meses em temperatura ambiente.

Para a extração foi pesado 0,3 g de amostra em erlenmeyer de 125 mL. Acrescentou-se 50 mL de solução de HCl 0,2N, e agitou-se em agitador por 2 horas para extração. Após a esse procedimento, foi realizada uma filtração rápida em papel filtro. Essa solução é estável por 1 semana em temperatura ambiente.

Na análise de ácido fítico foi pipetado 1 mL do extrato anterior para tubo de centrífuga de 15 mL. Adicionou-se 2 mL da Solução 1. Os tubos tampados foram colocados dentro de béqueres de 250 mL com água fervente em banho-maria em ebulição por 30 min. Em seguida, os tubos foram esfriados em béquer com água gelada por 15 min, até ajustar à temperatura ambiente. O conteúdo dos tubos foram misturados e centrifugados por 30 min a 3000 rpm. Pipetou-se 2 mL do sobrenadante para tubos de centrífuga ou de ensaio de 15 mL e acrescentou-se 3 mL de solução de bipiridina. A absorvância foi mensurada a 519 nm em espectrofotômetro marca Varian - modelo CaryWin - UV. O teor de fósforo fítico total foi determinado por uma curva padrão (Anexo 2). A quantidade de ácido fítico foi determinada multiplicando-se o teor de fósforo fítico por 3,55; considerando que o ácido fítico possui 28% de fósforo.

Após a determinação do conteúdo de ferro e fitato foi realizado o cálculo da razão molar fitato:ferro, segunda o fórmula abaixo:

$$\text{Razão molar fitato:ferro} = [\text{Fitato (g)}/659,91] / [\text{Ferro (g)}/55,8]$$

Sendo 659,91 e 55,8 o peso molecular do fitato e o peso atômico do ferro, respectivamente.

### ***Biodisponibilidade de ferro in vivo – Ensaio biológico***

O ensaio biológico foi realizado no laboratório de Nutrição Experimental; a composição centesimal no laboratório de Análise de Alimentos; ambos do Departamento de Nutrição e Saúde. A determinação do ferro para esta parte do experimento foi feita no Laboratório de Espectrofotometria de Absorção Atômica do Departamento de Solos, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) (Protocolo nº 112/2009).

### ***Composição química e centesimal***

A composição química e centesimal foi determinada para as cinco amostras de milho utilizadas no ensaio biológico, e realizada em triplicata. Estes resultados foram utilizados para determinar a quantidade adicionada na dieta de albumina, amido dextrinizado, sacarose, óleo de soja, celulose e amido de milho, a fim de torná-las isocalóricas, e com quantidades semelhantes dos macronutrientes.

### **Umidade**

O teor de água foi determinado pelo método gravimétrico, segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005).

### **Cinzas**

O teor de cinzas foi determinado pela diferença de peso antes e após a calcinação (AOAC, 1998).

### **Lipídios totais**

O teor de lipídios totais foi determinado por extração utilizando o aparelho extrator de Soxhlet, segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005).

### Proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas pelo micro-método de Kjeldhal, segundo a AOAC (1998).

### Fibra alimentar

Os teores de fibra alimentar total e insolúvel foram determinados pelo método enzimático-gravimétrico, segundo AOAC (1998), utilizando-se para a hidrólise enzimática a amilase termorresistente, protease e amiloglicosidase. A fibra solúvel foi calculada pela diferença entre fibra alimentar total e fibra insolúvel.

### Carboidratos

Foram determinados por diferença percentual entre os teores de proteínas, lipídios, umidade, cinzas e fibras totais (AOAC, 1998).

### Ferro

#### a) *Oxidação da matéria orgânica e preparo da solução mineral*

Para este procedimento, 1 g de milho moído foi pesado ou 10 mL de amostra pipetada em tubo para digestão, em triplicata. Adicionou-se em cada tubo 10 mL de ácido nítrico concentrado. Posteriormente, as amostras foram aquecidas em bloco digestor da marca Gerhardt, com exaustão, até aproximadamente 150 °C, por 16 horas. Esta condição foi mantida, com adição de ácido nítrico concentrado, até a formação de uma solução límpida (GOMES, 1996). Após a digestão, o digerido foi transferido para um balão de 50 mL, completado com água deionizada, e a leitura feita no espectrofotômetro de absorção atômica de chama.

As vidrarias utilizadas neste método foram lavadas, enxaguadas com água destilada e desmineralizadas por meio de remolho por 12 horas em ácido nítrico 10%. Posteriormente, as vidrarias foram novamente enxaguadas com água deionizada e secas em estufa com circulação de ar (FERREIRA e GOMES, 1995).

#### b) *Quantificação de ferro*

A concentração de ferro da solução mineral preparada foi quantificada por meio de espectrofotometria de absorção atômica de chama, em espectrofotômetro GBC 908 AA (GOMES, 1996).

### Preparo das dietas

As dietas foram preparadas de acordo com AIN-93G (REEVES *et al.*, 1993), indicada para animais em fase de crescimento. Utilizou-se a albumina como fonte protéica, em substituição à caseína, devido ao seu menor teor de ferro contaminante, 3,75 mg/1000g e 10,9 mg/1000g, respectivamente. Os ingredientes foram pesados individualmente, em balança semi-analítica (marca GEHAKA com precisão de 0,01g) e balança analítica (marca SHIMADZU, São Paulo, com precisão de 0,001 g). Inicialmente foram misturados manualmente em vasilhames plásticos, previamente lavados e enxaguados com água deionizada, e a seguir em batedeira semi-industrial, por um período de 15 minutos em baixa rotação.

### Determinação do teor de ferro das dietas

O teor de ferro da dieta pronta foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica de chama, em espectrofotômetro GBC 908 AA (GOMES, 1996), como realizado para as amostras de milho utilizadas no ensaio biológico.

### Ensaio biológico

Foram utilizados 48 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade albinus, classe Rodentia), linhagem Wistar, recém-desmamados, com 21 dias de idade, oriundos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais apresentaram peso inicial médio de  $57,91 \pm 2,37$  g. Estes foram mantidos em gaiolas individuais, de aço inoxidável, em ambiente com temperatura controlada ( $21^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) e em ciclo claro-escuro de 12 horas.

#### a) Fase de depleção

Nessa fase, os animais receberam dieta AIN-93G (REEVES *et al.*, 1993) modificada (Tabela 2), utilizando mistura de minerais isenta de ferro e água deionizada *ad libitum* para a indução da anemia ferropriva, por 21 dias.

O ganho de peso dos animais e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente para o cálculo do ganho de peso, do consumo alimentar e do coeficiente de eficiência alimentar (CEA), segundo fórmula abaixo:

$$\text{CEA} = [\text{ganho de peso (g)}/\text{consumo alimentar (g)}] \times 100.$$

Ao fim deste período foi realizada a dosagem de hemoglobina de todos os animais, e estes foram divididos em grupos de oito ratos, de modo que os níveis médios de hemoglobina e de peso fossem os mais próximos possíveis entre os grupos.

b) Fase de repleção

Nesta segunda etapa foram utilizados como fonte de ferro cinco genótipos de milho e um grupo controle que recebeu sulfato ferroso (D1). Os genótipos de milho utilizados foram Caimbé (D2), 1F5924 (D3), 2E5305 (D4), 3E4824 (D5) e 2E4794 (D6). Foi adotado o nível de 12 mg/1000g de ferro, que corresponde a 34,3% das necessidades do rato. Utilizou-se este nível pois este seria o mais baixo conteúdo de ferro na dieta que possivelmente se detectaria uma diferença no ganho de hemoglobina entre os grupos.

A composição das dietas experimentais pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais nas duas fases do experimento (g/100g de mistura)

Ingredientes (marca/fornecedor)	Fase de	Fase de reposição					
	depleção	Sulfato	Caimbé	1F5924	2E5305	3E4824	2E4794
	AIN 93G modificada	Ferroso D1	D2	D3	D4	D5	D6
Albumina (Nutryclin Alimentos®)	20,0	13,9	4,9	3,8	4,3	5,5	3,2
Amido dextrinizado (Nutryclin Alimentos®)	13,2	13,2	2,3	0,35	2,5	12,3	4,85
Sacarose (Açúcar União®)	10,0	10,0	1,75	0,3	1,85	9,35	3,7
Óleo de soja ABC	7,0	7,0	3,9	3,9	3,8	4,8	3,6
Fibra (celulose microfina) (Synth)	5,0	11,7	2,6	0	1,6	2,1	2,2
Mistura minerais sem ferro **	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura de vitaminas (Rhoster®)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
L-Cistina (Rhoster®)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de colina (Rhoster®)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho (qsp) (Pink Alimentos)	39,25	39,15	-	-	-	-	-
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Vetec) (mg)	-	5,96	-	-	-	-	-
Milho*	-	-	79,5	86,6	80,9	60,9	77,4

\* Cada dieta recebeu uma genótipo de milho diferente.

\*\* Preparada no Laboratório de Nutrição Experimental-UFV-MG-Brasil.

Os animais receberam água deionizada *ad libitum* e em média 14 g de dieta pesada diariamente, por um período de 14 dias.

Nesta fase também foram monitorados ganho de peso e o consumo alimentar para o cálculo do CEA.

Ao término da fase de repleção foi realizada nova dosagem de hemoglobina dos animais para o cálculo do ganho de hemoglobina.

#### Determinação de hemoglobina

O sangue foi coletado após incisão da porção terminal da cauda do animal. A hemoglobina foi dosada pelo método de cianeto de metahemoglobina, proposto pela AOAC (1998), utilizando kit para diagnóstico colorimétrico *in vitro* (QUIMICA BÁSICA, Belo Horizonte, MG). Esse método baseia-se em reação colorimétrica, com reação entre o ferro presente na hemoglobina e o cianeto da solução de Drabkin, formando cianometahemoglobina, que possui coloração vermelha, cuja intensidade varia de acordo com o teor de hemoglobina presente no sangue analisado. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro UV-Visível, modelo SHIMADZU UV-1601, no comprimento de onda de 540 nm.

Para cálculo da concentração de hemoglobina das amostras de sangue foi utilizado como referência, o valor de leitura da absorvância de uma solução padrão de hemoglobina de concentração correspondente a 11,4 g/dL (QUIMICA BÁSICA, Belo Horizonte, MG).

#### Cálculo da Eficiência na Regeneração de Hemoglobina (HRE)

O HRE foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

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

Sendo:

$$\text{mg Fe da Hb inicial} = [\text{peso inicial (g)} \times \text{Hb inicial (g/dL)} \times 6,7 \times 0,335] / 1000$$

$$\text{mg Fe da Hb final} = [\text{peso final (g)} \times \text{Hb final (g/dL)} \times 6,7 \times 0,335] / 1000$$

Nesta equação considera-se que o volume do sangue corresponde a 6,7% do peso corporal do animal; e o conteúdo de ferro da hemoglobina é 0,335 (HAROVICENTE *et al.*, 2008). O consumo de ferro (Fe) foi calculado considerando-se a

quantidade total de dieta consumida e o conteúdo de ferro dessa dieta, sendo calculado para cada animal, segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Consumo de Fe} = \frac{\text{Consumo de dieta total na fase 2} \times \text{Ferro da dieta (mg/1000g)}}{1000}$$

Foi calculado ainda o valor biológico relativo do HRE, dividindo-se o valor de HRE dos grupos teste pelo valor do grupo que recebeu sulfato ferroso como fonte de ferro (RBV do HRE).

### ***Análise estatística***

Para a avaliação da biodisponibilidade de ferro com animais, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com oito repetições. Na análise qualitativa foi realizada análise de variância (ANOVA) e teste Dunnet *post hoc* para comparação dos grupos teste com o grupo controle que recebeu sulfato ferroso como fonte de ferro; e teste de Tukey *post hoc* para comparação das médias dois a dois entre os grupos que receberam os genótipos modificados, ao nível de 5%.

Utilizou-se correlação de Pearson para a comparação entre o ganho de hemoglobina e HRE, e para a correlação entre os dados do ensaio biológico e os resultados no ensaio *in vitro*. As correlações foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

As análises estatísticas foram realizadas no software SigmaPlot versão 11.0 (Systat Software, 2008).

## **Resultados**

### ***Disponibilidade in vitro – Ferro solúvel e dialisável***

A concentração de ferro total, ferro solúvel, ferro dialisável, fitato e razão molar fitato:ferro podem ser observados na Tabela 2.



Tabela 2 – Valores médios de ferro total, ferro solúvel, ferro dialisável, fitato e razão molar fitato ferro dos genótipos de milho

Amostra	Ferro (ppm)	Fe solúvel (µg/g de milho)	Fe solúvel (%)	Fe dialisável (µg/g de milho)	Fe dialisável (%)	Fitato (g/100 g)	Razão molar fitato:ferro
1F5924*	23,57	5,80	24,63	2,51	10,67	0,8542	30,64
Caimbé**	21,79	2,87	13,17	1,16	5,31	0,8031	31,16
1S1567*	16,41	4,79	29,21	2,26	13,79	0,6869	35,39
3F6245*	17,95	3,91	21,79	1,54	8,60	0,7734	36,43
1F5624*	18,36	4,72	25,72	1,68	9,14	0,8100	37,30
2E5305*	19,88	3,28	16,51	1,24	6,23	0,8906	37,88
3E4744*	17,24	4,37	25,32	2,03	11,76	0,7726	37,89
1F6265*	16,31	3,87	23,76	1,97	12,08	0,7849	40,69
Al Piratininga**	18,10	5,11	28,20	2,26	12,49	0,9112	42,57
2E4794*	18,99	5,27	27,72	2,28	12,00	1,0252	45,65
3E4824*	17,65	2,71	15,38	0,66	3,71	0,9703	46,48
3E5335*	15,07	5,97	39,63	2,88	19,14	0,9329	52,34
DKB390*	11,79	3,86	32,70	1,49	12,66	0,7726	55,41
Média±DP	17,93±2,93	4,35±1,05	24,90±7,22	1,84±0,62	10,58±4,05	0,85±0,10	40,76±7,52

\*Híbrido

\*\*Variedade

O teor de ferro dos genótipos variou de 11,79 a 23,57 mg/1000g (DKB390 e 1F5924, respectivamente). O teor de fitato das amostras variou de 0,77% (3E4744 e DKB390) a 1,03% (2E4794), e a razão molar fitato:ferro foi de 30,64 (1F5924) a 55,41 (DKB390).

O percentual de ferro solúvel apresentou valores que variaram de 13,17 a 39,63% para Caimbé e 3E5335, respectivamente. Quanto ao ferro dialisável o maior valor também foi encontrado para 3E5335 (19,14%), entretanto o menor valor foi de 3,71% para 3E4824. Ao avaliar todos os genótipos, cerca de 42% do ferro solúvel total foi dialisado, sendo um valor semelhante para toda amostra; com exceção de 3E4824, que obteve um valor de 24%.

O ferro total apenas se correlacionou significativamente com o percentual de ferro solúvel ( $r = -0,597$ ), sendo uma relação inversa; entretanto com baixo valor de  $r$ .

O teor de fitato e a razão molar fitato:ferro não se relacionaram com nenhum resultado encontrado na análise de solubilidade e diálise, com exceção do ferro solúvel em  $\mu\text{g/g}$  de milho, em que houve correlação significativa com a razão molar fitato:ferro ( $r = 0,577$ ).

Os dados de ferro solúvel e dialisável tanto em  $\mu\text{g/g}$  como em valor percentual, correlacionam-se significativamente ( $r = 0,944$  e  $r = 0,951$ ; respectivamente), apresentando resultados concordantes.

### ***Biodisponibilidade in vivo – Ensaio biológico***

#### **Milho**

A composição centesimal dos genótipos utilizados no ensaio biológico está apresentada na Tabela 3. Os teores de ferro e de fitato das amostras utilizadas no ensaio biológico podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 3 - Composição centesimal dos genótipos de milho utilizados no ensaio biológico, em base úmida (g/100g).

Amostra	Umidade	Cinzas	Carboidrato	Proteína	Lipídio	Fibra total	Fibra insolúvel	Fibra solúvel
Caimbé	7,30	1,61	65,95	9,77	3,94	13,30	12,36	0,94
1F5924	6,20	1,69	64,98	10,06	3,56	13,51	12,85	0,66
2E5305	6,41	1,53	64,48	10,20	4,00	12,52	11,28	1,24
3E4824	6,14	1,58	60,98	11,88	3,67	15,78	13,02	2,76
2E4794	6,03	1,65	61,91	12,18	4,33	13,90	12,54	1,36

Tabela 4 – Concentração de ferro, fitato e razão molar fitato:ferro dos genótipos de milho utilizados no ensaio biológico em base úmida (g/100g).

Amostra	Ferro (mg/1000g)	Fitato (g/100g)	Razão molar fitato:ferro
Caimbé	15,09	0,8031	45,00
1F5924	13,86	0,8542	52,11
2E5305	14,84	0,8906	50,75
3E4824	19,69	0,9703	41,67
2E4794	15,51	1,0252	55,89

As amostras 3E4824 e 2E4794 foram as que apresentaram o menor teor de carboidratos, entretanto o maior de proteína. O genótipo 2E4794 foi o que apresentou o maior conteúdo de lipídio. O conteúdo de fibra alimentar foi semelhante em todas as amostras variando de 12,36 a 13,02 g/100g, com o grande predomínio da fração insolúvel.

O genótipo 3E4824 apresentou a maior concentração de ferro por esta análise. Já o teor de fitato foi maior para 2E4794. Cabe ressaltar que a determinação de ferro desses genótipos utilizadas no ensaio biológico foi realizada em espectrômetro de absorção atômica de chama, enquanto que os resultados de ferro total no método *in vitro* foram determinados em espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite; por isso pode-se observar uma pequena diferença na concentração de ferro total nos genótipos utilizados nos dois ensaios.

#### Ensaio biológico

A concentração de ferro das dietas na fase de repleção indicou que houve diferença no teor do mineral (Tabela 6). Pelo teste de Dunnett a 5%, apenas Caimbé foi considerada igual ao controle (Sulfato ferroso), todos os outros grupos apresentaram teor significativamente menor. Ao utilizar o teste de Tukey para comparar apenas as dietas que continham os genótipos de milho, observou-se que a dieta composta por 3E4824 possuía teor de ferro menor que Caimbé, 1F5924 e 2E4794; e Caimbé maior que 2E5305, 3E4824 e 2E4794 (Tabela 6). Devido a estas diferenças na concentração de ferro das dietas, foi relevante a utilização do HRE, que permite a eliminação deste fator de confusão ao comparar os grupos, além disso, foram apresentados resultados do consumo de ferro e de ganho de hemoglobina por grama de ferro consumido.

Os dados de ganho de peso, consumo alimentar e CEA podem ser observados na Tabela 5. Os resultados apresentados mostram que não houve diferença no ganho de peso, consumo alimentar, e CEA, nas duas fases do experimento.

Tabela 5 – Valores médios de ganho de peso, consumo alimentar e CEA dos grupos experimentais na fase de depleção e repleção.

Grupo	Ganho de peso (g) *		Consumo alimentar *		CEA *	
	Depleção	Repleção	Depleção	Repleção	Depleção	Repleção
Sulfato ferroso	53,63	35,38	195,79	203,66	0,27	0,173
Caimbé	61,88	40,63	201,00	218,08	0,31	0,186
1F5924	59,50	44,38	192,51	216,47	0,31	0,204
2E5305	55,88	42,00	176,43	207,24	0,32	0,202
3E4824	54,25	42,00	185,40	207,58	0,29	0,202
2E4794	53,88	43,38	181,56	214,21	0,30	0,201

\* Não houve diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5%.

Confrontando os dados de consumo de ferro na segunda fase do ensaio biológico, observou-se que todos os grupos diferiram do controle com exceção do 1F5924. O grupo Caimbé foi o único a apresentar consumo de ferro maior que o controle. Comparando-se apenas os grupos experimentais, todos diferiram entre si, sendo que Caimbé foi o que apresentou maior consumo e 2E4794 o menor (Tabela 6).

O nível médio de hemoglobina no início da segunda fase foi  $5,91 \pm 1,30$  g/dL, variando de 3,93 g/dL a 10,92 g/dL. Não houve diferença significativa na hemoglobina inicial entre os grupos. Ao comparar-se a hemoglobina final e o ganho de hemoglobina entre os grupos, pelo teste de Dunnett a 5%, utilizando como controle o grupo Sulfato ferroso, não foi encontrada diferença significativa. Analisando o ganho de hemoglobina apenas nos grupos que receberam os diferentes genótipos de milho, também não se observou diferença. O ganho de hemoglobina por grama de Fe consumido foi maior no grupo 2E4794, e menor no grupo controle, entretanto não houve diferença estatística entre os grupos (Tabela 6).

Todos os grupos apresentaram um HRE maior que o controle, exceto Caimbé. Todavia ao confrontar apenas os grupos teste, não houve diferença estatisticamente significativa entre estes, porém podemos observar que 3E4824 e 2E4794 apresentaram valores mais altos que os outros grupos.

O RBV indicou que 3E4824 e 2E4794 foram os que apresentaram melhor valor de HRE em relação ao controle, seguido de 2E5305. O grupo Caimbé, que havia consumido a maior quantidade de ferro, foi a que proporcionou o menor valor de RBV.

Tabela 6 – Concentração de ferro na dieta, consumo de ferro, Ganho de hemoglobina (GHb), ganho de hemoglobina (GHb) por grama de Ferro consumido, HRE e RBV de HRE na fase de repleção.

Grupos	Concentração de Fe na dieta (mg/1000g)	Fe consumido (mg)	GHb (g/dL)	GHb por mg de Fe consumido (g/dL por mg)	HRE (%)	RBV de HRE
Sulfato ferroso	18,09	3,68	3,07	0,83	40,81	-
Caimbé	18,99 <sup>a</sup>	4,14 <sup>*a</sup>	3,97	0,97	48,18	1,18
1F5924	17,04 <sup>*ab</sup>	3,69 <sup>b</sup>	4,01	1,09	55,99*	1,37
2E5305	14,52 <sup>*cd</sup>	3,01 <sup>*d</sup>	3,49	1,17	59,26*	1,45
3E4824	13,05 <sup>*d</sup>	2,71 <sup>*e</sup>	3,24	1,19	60,70*	1,49
2E4794	15,55 <sup>*bc</sup>	3,33 <sup>*c</sup>	4,23	1,27	60,70*	1,49

As médias seguidas de asterisco diferem do grupo controle pelo teste de Dunnett a 5%.

As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Neste caso só foram comparadas os grupos que receberam as genótipos de milho na dieta.

HRE: Eficiência na Regeneração de Hemoglobina; RBV de HRE: Valor Biológico Relativo da Eficiência na Regeneração de Hemoglobina

Foram realizadas análises de correlação para verificar associações entre consumo de ferro, ganho de hemoglobina, ganho de hemoglobina por grama de ferro consumido e HRE. Não houve correlação entre consumo de ferro e ganho de hemoglobina.

Houve correlação positiva significativa entre ganho de hemoglobina por grama de ferro consumido e HRE ( $r = 0,883$ ;  $p < 0,001$ ), e ganho de hemoglobina e HRE ( $r = 0,723$ ;  $p < 0,001$ ), resultado que também pode ser observado na Figura 2.

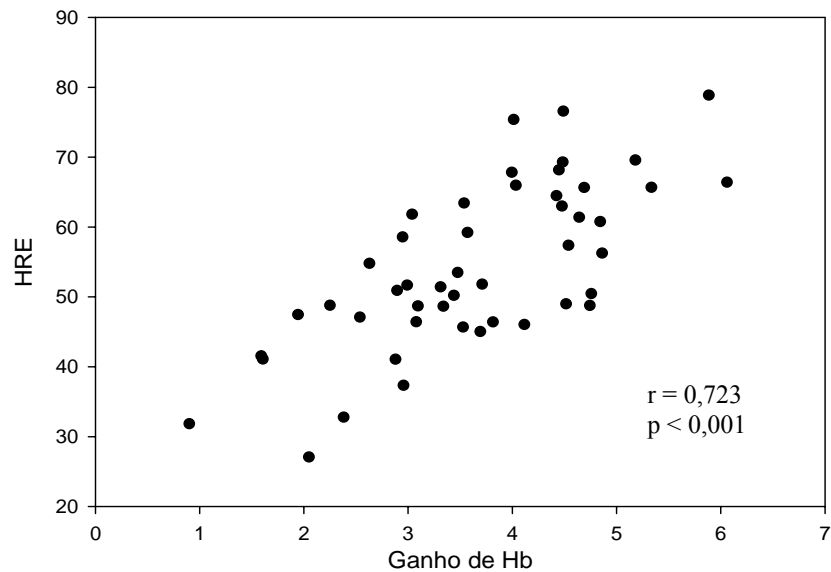


Figura 2 - Gráfico de Dispersão entre as variáveis Ganho de Hemoglobina e Eficiência na Regeneração de Hemoglobina

Ao avaliar as correlações com a razão fitato:ferro, não se observou associação com o ganho de hemoglobina e HRE. Enquanto para o teor de fitato, o ganho de hemoglobina e HRE não apresentaram associação significativa ao nível de 5%.

***Correlação entre os dados dos estudos in vitro e in vivo***

O ganho de hemoglobina por grama de ferro consumido e HRE não apresentaram correlação significativa com nenhum resultado obtido no estudo *in vitro*.

O ganho de hemoglobina não apresentou correlação significativa com nenhum valor obtido na diálise, ao nível de 5%. Porém foram observadas correlações positivas que variaram de 0,653 a 0,809 (Tabela 8).

Tabela 8 – Estimativa dos coeficientes de correlação entre ganho de hemoglobina do ensaio *in vivo* com resultados do ensaio *in vitro*.

	Ganho de hemoglobina (p-valor)
Fe solúvel ( $\mu\text{g/g}$ )	0,713 (p=0,176)
Fe solúvel (%)	0,653 (p=0,232)
Fe dialisável ( $\mu\text{g/g}$ )	0,809 (p=0,097)
Fe dialisável (%)	0,787 (p=0,114)

### Discussão

Em análise realizada em 301 linhagens de milhos provenientes da Embrapa Milho e Sorgo, os valores de ferro variaram de 20,6 a 29,9 mg/1000g (GUIMARÃES *et al.*, 2005), superiores aos genótipos em estudo que variariam de 11,79 a 23,57 mg/1000g. Todavia cabe ressaltar que as amostras utilizadas foram híbridos e variedades, e não linhagens, o que possivelmente explicaria o menor teor do mineral. Simic *et al.* (2009) encontraram uma média de 24,20 mg/1000g, também acima do presente trabalho. Em outro estudo que avaliou alimentos consumidos no sul da Etiópia, o teor de ferro encontrado em grão de milho branco inteiro e seco foi de 44 mg/1000g (ABEBE *et al.*, 2007) superior aos valores encontrados; já o oposto ocorreu em análise feita em alimentos consumidos na China em que o milho moído continha 4,3 mg/1000g de ferro (MA *et al.*, 2005). Ainda, estudo realizado por Hambidge *et al.* (2004) com genótipos de milho com menor teor de fitato e comuns, encontraram resultados que variaram de 18,1 a 20,0 ppm de ferro, dentro do intervalo observado neste estudo. Essas diferenças no conteúdo de ferro podem ser devido às diferentes concentrações do mineral nos solos, fator que altera o teor final nos alimentos (OIKEH *et al.*, 2003). Além disso, cada estudo analisou diferentes genótipos de milho, o que demonstra a grande variedade genética na concentração de ferro entre os milhos cultivados no mundo.

No estudo realizado por Lorenz *et al.* (2007), as quantidades de fitato apresentaram-se maiores que as do presente trabalho (1,15%). Em paralelo ao relatado



para as concentrações de ferro, o milho proveniente do sul da Etiópia apresentou elevada concentração de fitato (1,44%) (ABEBE *et al.*, 2007).

Um fato a se observar nos resultados relatados é a técnica utilizada em que no primeiro estudo dosou-se por colorimetria e no segundo por cromatografia de alta eficiência (HPLC). Relata-se na literatura que o método da AOAC, assim como outros métodos colorimétricos, superestimam os valores de fitato por considerar os inositóis mono, bi, tri, tetra, penta e hexafosfato, além de outros fosfatos, como compostos fósforo-nucleotídeos e adenosina trifosfato; e por HPLC quantifica-se apenas os inositóis tri, tetra, penta e hexafosfato (BRUNE *et al.*, 1992). Sabe-se que o inositol penta e hexafosfato que seriam os inibidores da absorção de ferro (BRUNE *et al.*, 1992) e o método da AOAC e outros colorimétricos não quantificam estas frações isoladamente. Estas colocações indicam que os valores de fitato encontrados por Lorenz *et al.* (2007) e no presente estudo poderiam ser menores ainda se utilizasse a determinação por HPLC. Assim, recomenda-se a quantificação do fitato por HPLC, pois esta técnica forneceria um resultado mais acurado. Todavia, cabe ressaltar que uma limitação na utilização desta técnica é o custo elevado do equipamento, das colunas e dos padrões necessários.

Apesar das limitações técnicas do método colorimétrico, os resultados de Lorenz *et al.* (2007) e Abebe *et al.* (2007) indicaram que, para amostras de milho, o método colorimétrico apresentou resultado semelhante ao obtido por HPLC, podendo ser utilizado para se obter um valor aproximado do teor de fitato das amostras quando há limitação de recursos e equipamentos. Este fato pode ter ocorrido para amostras de milho, pois cerca de 95% do fósforo deste alimento está presente na forma de inositol penta- e hexafosfato. (RABOY *et al.*, 2000)

A razão molar fitato:ferro de todas as amostras estudadas foi maior que 1, significando baixa biodisponibilidade de ferro (HALLBERG *et al.*, 1989). Nos estudo realizado na Etiópia (ABEBE *et al.*, 2007), a razão molar fitato:ferro também foi maior que 1 (27,8), entretanto menor que a encontrada no presente trabalho.

Ma *et al.* (2005) encontraram para arroz valores de ferro que variaram de 1,2 a 1,9 mg/1000g, e de fitato 0,055% a 0,183%, e ainda razão molar fitato:Fe de 39,4 a 83,27. Estas concentrações de ferro e a razão molar demonstraram que se comparado

ao arroz, outro cereal amplamente consumido, o milho apresentaria biodisponibilidade de ferro melhor.

Apesar dos valores encontrados para a razão molar fitato:ferro, os resultados encontrados no ensaio biológico indicaram que o ferro do milho foi tão biodisponível quanto o sulfato ferroso, pois promoveu o ganho de hemoglobina e HRE semelhantes. Este resultado indica que neste trabalho a razão molar fitato:ferro apresentada não refletiu de forma adequada a biodisponibilidade de ferro. Todavia deve-se observar que o rato, modelo animal utilizado, apresenta maior percentual de absorção de ferro que os homens, além de sofrer menor interferência dos fatores que conhecidamente em humanos inibem a absorção do ferro não-heme (REDDY e COOK, 1991).

Em paralelo, esperava-se que o fitato e a razão fitato:ferro também influenciassem a bioacessibilidade do ferro mensurada pela solubilidade e diálise, visto que o fitato é considerado um fitoquímico com efeito antinutricional, entretanto, não houve esta correlação. Esses resultados evidenciam que a técnica utilizada para determinar o fitato pode não ter sido a mais adequada, pois o método colorimétrico adotado não detecta apenas os inositolis penta e hexafosfato e também não diferencia qual inositol fosfato está sendo quantificado, como explicitado anteriormente. Outro fator que pode ter influenciado no resultado encontrado é a pequena diferença da razão molar fitato:ferro entre os genótipos estudados, que variaram de 30,64 a 55,41; o que talvez não permitiu a verificação das diferenças entre os grupos.

O valor de ferro dialisável em percentual foi um pouco maior que o relatado por Hemalatha *et al.* (2007) que encontraram 7,83% de ferro bioacessível em amostras de milho; enquanto que em mg/1000g o resultado do presente trabalho foi um pouco menor que os 2,51 mg/1000g encontrado por este autor. A genótipo de milho avaliada por Hemalatha *et al.* (2007) apresentava um conteúdo de ferro maior (32,1 mg/1000g), por isso ocorreram estas diferenças nos valores em percentual e mg/1000g. Pensando no consumo humano, o milho avaliado por Hemalatha *et al.* (2007) forneceria maior quantidade de ferro bioacessível que os analisados no presente trabalho.

Sobre a correlação entre ferro solúvel e ferro dialisável, diferente do presente estudo, Cámara *et al.* (2005) não encontraram correlação significativa entre estas duas variáveis, afirmando que a fração solúvel nem sempre é a dialisável.

Ainda, estes autores observaram a influência negativa do fitato na bioacessibilidade de ferro nos cereais, diferente do encontrado neste estudo. Cabe ressaltar que o método utilizado por este outro trabalho para quantificar fitato também não diferenciou entre os tipos de inosítois fosfato (HEMALATHA *et al.*, 2007), e também, não foi o mesmo protocolo utilizado no presente trabalho.

Nas análises *in vitro* do presente estudo não houve influência do ferro total nos valores de bioacessibilidade do mineral no milho, em que o teor de ferro total não foi determinante dos valores de ferro solúvel e dialisável (Tabela 2). Nesta mesma linha, não houve correlação significativa entre o consumo de ferro e ganho hemoglobina e HRE indicando que a maior quantidade de ferro na dieta não significa que este será absorvido, estando assim biodisponível. Felix *et al.* (2008) ao avaliarem a bioacessibilidade de ferro por diálise em grãos de soja também não encontraram relação positiva entre o teor de ferro dos grãos e o ferro dialisável.

Entretanto, Cámara *et al* (2005) ao avaliarem refeições escolares encontraram correlação linear positiva entre teor de ferro e ferro solúvel em  $\mu\text{g/g}$ ; e correlação inversa entre ferro total e ferro solúvel e dialisável em percentual. Todavia ao analisar somente os pratos à base de cereais, hortaliças e omelete de espinafre não houve correlação significativa entre teor de ferro e percentual de ferro dialisável. Velasco-Reynold *et al.* (2008) ao analisar a biodisponibilidade de zinco de refeições hospitalares por diálise também encontraram correlação positiva significativa entre zinco total e zinco dialisável em miligramas, entretanto não ocorreu o mesmo ao comparar o zinco dialisável em valor percentual. Pelos dados de literatura apresentados, pode-se observar que ainda não há concordância de resultados quanto à influência do teor do mineral total dos alimentos na biodisponibilidade do mesmo em estudos *in vitro*, todavia os resultados *in vivo* encontrados neste trabalho levam-nos a crer que tal associação não apresenta resultados significativos. Assim, possivelmente, o aumento na quantidade de ferro de um alimento não é o suficiente para aumentar o teor de ferro biodisponível.

Não houve grande diferença na composição centesimal entre os genótipos de milho estudadas. O teor de proteína e lipídio foi semelhante ao encontrado por Lorenz *et al.* (2007), que analisaram diferentes genótipos de milho submetidas ao

melhoramento genético para redução do teor de fitato. Naves *et al.* (2004) também encontraram resultados semelhantes para proteína e lipídio, porém o carboidrato foi maior (77,42%) que o relatado no presente estudo. Entretanto, essa diferença ocorreu devido ao método utilizado pelos autores na determinação de fibra total, em que foi empregada a quantificação de fibra bruta, técnica que subestima o teor de fibra total em relação ao método enzimático gravimétrico, utilizado no presente estudo.

Um componente do milho que também poderia influenciar os resultados de bioacessibilidade/biodisponibilidade do presente estudo e que não foi quantificado são os carotenóides. O milho apresenta diferentes teores de carotenóides variando de 2,01 a 19,63 mg/1000g em amostras de genótipos Crioulo e locais de Santa Catarina-Brasil (KUHNNEN, 2007), de 9,9 a 36,96 mg/1000g em amostras fornecidas pelo Department of Crop Sciences, University of Illinois, Urbana IL, USA (HULSHOF *et al.*, 2007); e de 9,81 a 14,27 mg/1000g em milho amarelo proveniente de três fornecedores nos Estados Unidos (LAYRISSE *et al.*, 1997). Os carotenóides, principalmente os com atividade pró-vitamina A, influenciam positivamente na absorção de ferro por formarem complexos solúveis com o mineral que proporcionaria maior quantidade de ferro solúvel na fase intestinal, que estaria assim disponível para absorção (LAYRISSE *et al.*, 1997).

O milho não é um alimento considerado boa fonte protéica, pois apresenta como aminoácidos limitantes a lisina e o triptofano (NAVES *et al.*, 1994). Entretanto, a substituição da fonte protéica padrão (albumina) do grupo controle pelo milho, não causou menor ganho de peso e CEA para os animais que receberam os alimentos teste. As semelhanças no ganho de peso e CEA entre os grupos indicaram que apesar da substituição, a proteína do milho foi capaz de suprir as necessidades dos ratos proporcionando um crescimento semelhante ao grupo controle.

O grupo que recebeu a genótipo Caimbé foi o que apresentou maior consumo de ferro, entretanto não houve maior ganho de hemoglobina e HRE, e ainda obteve o menor valor de RBV, indicando que este genótipo, possivelmente, apresenta algum componente que interfere na absorção de ferro e que não foi avaliado no presente estudo, como polifenóis (tanino), em que Kuhnen (2007) detectou concentração de fenóis totais que variaram de 516,29 a 1132,04 µg/g para amostras de milho.

O grupo que recebeu a genótipo 2E4794 foi a que apresentou maior ganho de hemoglobina por grama de ferro consumido, o que indica melhor biodisponibilidade de ferro. Isto também pode ser confirmado pelo maior valor de HRE e RBV. Porém esta foi a amostra que apresentou maior concentração de fitato e da razão molar fitato:ferro. Este resultado poder ter ocorrido devido a pequena diferença na razão molar entre os genótipos estudados no ensaio biológico (variando de 41,67 a 55,89), o que não causaria grandes diferenças nos resultados encontrados nos diferentes grupos. Sugere-se assim, a utilização de genótipos com maior diferença na razão molar para tentar verificar a influência deste fator na biodisponibilidade de ferro. Ainda, reforça-se o papel, na biodisponibilidade do mineral, dos diferentes teores de carotenóides dos genótipos de milho, como citado anteriormente (LAYRISSE *et al.*, 1997).

Em geral, apesar dos valores da razão molar fitato:ferro nas dietas teste serem elevados, o ganho de hemoglobina e HRE das genótipos de milho no geral não foram menores que o grupo controle, indicando biodisponibilidade semelhante ao controle que recebeu sulfato ferroso como fonte de ferro. O grupo que ingeriu sulfato ferroso não apresentava em sua composição nenhum ingrediente que continha fitato. Raboy *et al.* (2000) verificaram que cerca de 95% do inositol fosfato presente no milho era do tipo hexafosfato, entretanto, pelo método utilizado no presente estudo não podemos afirmar se os inositol fosfato quantificados são do tipo hexafosfato. Possivelmente, o conteúdo de carotenóides com atividade pró-vitamina A do milho apresentou influência na absorção de ferro. A falta de correlação significativa entre consumo de ferro e ganho de hemoglobina confirma que neste estudo não somente a quantidade de ferro determinou a biodisponibilidade, mas outros compostos presentes no alimento e na dieta como um todo.

O HRE e o ganho de hemoglobina por grama de ferro consumido, e HRE e o ganho de hemoglobina, neste estudo, apresentaram correlação significativa. Em estudo realizado por (HARO-VICENTE *et al.*, 2009), HRE e ganho de hemoglobina também apresentaram resultados concordantes. Pelos valores de r obtidos, pode-se afirmar que o ganho de hemoglobina por grama de ferro consumido apresentou valor mais concordante com HRE do que simplesmente o ganho de hemoglobina. Estes dois índices foram uma boa alternativa no presente trabalho, e em estudos em que não se

consegue controlar o consumo alimentar de ferro, pois leva em consideração a quantidade de ferro consumida para avaliar o ganho de hemoglobina.

Houve correlação inversa entre teor de fitato (Tabela 2) e HRE (Tabela 6), diferente do esperado. Todavia este resultado pode ter ocorrido devido aos valores próximos de fitato entre os genótipos, não apresentando influência nos diferentes resultados entre os grupos.

Apesar de não se encontrar influência do fitato na biodisponibilidade de ferro neste estudo, deve-se avaliar este resultado com cautela visto que é amplamente observado na literatura o efeito deste composto na disponibilidade de ferro, tanto em estudos *in vitro* (FRONTELA *et al.*, 2008; HEMALATHA *et al.*, 2007; PORRES *et al.*, 2005) como *in vivo* (RONG e KANG-NING, 2009; BRUNE *et al.*, 1992).

O ganho de hemoglobina, apesar de não apresentar correlações significativas com o ferro solúvel e dialisável, apresentou uma relação positiva com estes parâmetros. Forbes *et al.* (1989) encontraram resultados concordantes entre diálise e ensaio clínico, indicando que este método *in vitro* seria uma boa alternativa para uma primeira avaliação da biodisponibilidade de ferro dos alimentos. Porém estes mesmos autores observaram diferenças interlaboratoriais no ferro dialisável.

Em paralelo ao relatado acima, neste trabalho houve dificuldade em padronizar a metodologia segundo Miller *et al.* (1981), em que a reprodutibilidade não foi alcançada utilizando o protocolo citado no artigo. Para resolver este problema, foi realizado um treinamento em outro laboratório que já utiliza a técnica, todavia com algumas modificações. Alguns cuidados indispensáveis nesta metodologia são o tratamento adequado dos tubos de diálise antes da utilização, atenção na utilização de vidraria desmineralizada e no manuseio da amostra para evitar a contaminação com ferro, além de sempre utilizar água deionizada no processo. Também deve se estar atento quanto aos reagentes utilizados, para que estes não sejam fonte de contaminação.

Um fator que poderia gerar a significância das correlações entre os resultados *in vivo* e *in vitro* seria o acréscimo de mais genótipos no ensaio biológico, que não foi realizado neste estudo devido ao número reduzido de amostras que puderam ser utilizadas no estudo com os animais. Isto ocorreu por causa de problemas no cultivo do

milho, em que foi planejada a colheita de seis quilos, entretanto foram disponibilizados apenas um a três quilos de amostra de cada genótipo. Também poderia se explorar melhor os dados se fosse utilizado genótipos de milho com maior variação no teor de fitato.

Considerando os resultados apresentados, e o hábito alimentar no Brasil, em que o milho é muito consumido na forma de polenta, podemos fazer uma relação entre uma porção deste prato e o ferro dialisável. O genótipo que apresentou o maior teor de ferro possuía 21 mg/1000g, assim uma porção de polenta, que contém 30 g de farinha de milho, forneceria 0,63 mg de ferro. Considerando que em média 10,58% do ferro foi dialisável, em uma porção de polenta 0,067 mg do ferro estaria bioacessível. Este valor contribuiria para atender 0,8 % das necessidades de um homem adulto (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001). Ao comparar este resultado com o consumo de 80 gramas de feijão, que possui aproximadamente 9,84 mg de ferro e 0,52 mg de ferro bioacessível (BRIGIDE e CANNIATTI-BRAZACA, 2006), pode-se observar que o milho ainda apresenta pouca contribuição no consumo de ferro. Entretanto, combinado com outros alimentos que possuem ferro, pode contribuir para o consumo adequado deste mineral.

### **Conclusão**

Os resultados apresentados indicaram que os genótipos de milho estudados apresentaram ferro biodisponível, visto que as amostras selecionadas apresentaram valores semelhantes ao grupo controle (sulfato ferroso) quanto ao ganho de hemoglobina, ganho de hemoglobina por grama de ferro consumido e eficiência na regeneração de hemoglobina. Entretanto, a quantidade de ferro desse alimento e os resultados do ensaio *in vitro* indicaram que ainda deve ser feita uma melhor seleção de genótipos quanto ao conteúdo de ferro e fitato. Ainda, neste sentido, o conteúdo de ferro total das amostras foi semelhante ou menor que outras amostras de milho já presentes no mercado consumidor no mundo.

Também foi observado que, neste estudo, o teor de fitato e a razão molar fitato:ferro não apresentaram correlação com os resultados obtidos nas análises de biodisponibilidade de ferro, tanto *in vitro* como *in vivo*. O método da diálise pode ser

uma alternativa na seleção dos genótipos para o melhoramento genético visto que os resultados são concordantes com o ensaio biológico. Todavia, devido à falta de significância estatística das correlações, mostra-se necessário o desenvolvimento de outro estudo com um maior número de genótipos no ensaio biológico para melhor elucidação destas associações.



### Referências Bibliográficas

ABEBE, Y.; BOGAL, A.; HAMBIDGE, K.M.; STOECKER, B.J.; BAILEY, K.; GIBSON, R.S. Phytate, zinc, iron and calcium content of selected raw and prepared foods consumed in rural Sidama, Southern Ethiopia, and implications for bioavailability. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, n.3-4, p.161-168, 2007.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16ed. rev. 4. Washington, D.C., 2v. 1170p. 1998.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 13ed., AOAC, Washington, D.C., 1984.

BRIGIDE, P.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Antinutrients and "in vitro" availability of iron in irradiated common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Chemistry**, v.98, p.85-89, 2006.

BRUNE, M.; ROSSANDER-HULTEN, L.; HALLBERG, L.; GLEERUP, A.; SANDBERG, A. Iron Absorption from Bread in Humans: Inhibiting Effects of Cereal Fiber, Phytate and Inositol Phosphates with Different Numbers of Phosphate Groups. **Journal of Nutrition**, v.122, n.3, p.442-449, 1992.

CÁMARA, F.; BARBERÁ, R.; AMARO, M. A.; FARRÉ, R. Calcium, iron, zinc and copper transport and uptake by Caco-2 cells in school meals: Influence of protein and mineral interactions. **Food Chemistry**, v.100, p.1085-1092, 2007.

CHEN, O. S.; BLEMINGS, K. P.; SCHALINSKE, K.L.; EISENSTEIN, R.S. Dietary Iron Intake Rapidly Influences Iron Regulatory Proteins, Ferritin Subunits and Mitochondrial Aconitase in Rat Liver. **Journal of Nutrition**, v.128, n.3, p.525-535, 1998.

DAVIDSSON, L.; ZIEGLER, E.E.; KASTENMAYER, K.; VAN DAEL, P.; BARCLAY, D. Dephytinisation of soyabean protein isolate with low native phytic acid content has limited impact on mineral and trace element absorption in healthy infants. **British Journal of Nutrition**, v.91, n. 2, p.287-293, 2007.

FELIX, M. A.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Disponibilidade de ferro in vitro de grãos de soja tostados por diferentes tratamentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.78-83, 2008.

FERREIRA, J.; GOMES, J.C. **Gerenciamento de Laboratórios de Análises Químicas**. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 1995. 378 p.

FORBES, A. L.; ARNAUD, M. J.; CHICHESTER, C. O.; COOK, J. D.; HARRISON, B. N.; HURRELL, R. F.; KAHN, S. G.; MORRIS, E. R.; TANNER, J. T.; WHITTAKER, P. Comparison of in vitro, animal, and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutritional Anemia Consultative Group Task Force report on iron bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.49, p.225-238, 1989.

FRONTELA, C.; HARO, J. F.; ROS, G.; MARTI, X.; NEZ, C. Effect of Dephytinization and Follow-on Formula Addition on in Vitro Iron, Calcium, and Zinc Availability from Infant Cereals. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.56, p.3805-3811, 2008.

GOMES, J.C. **Análise de alimentos**. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos, 1996. 126 p.

GUIMARÃES, P.E.O.; RIBEIRO, P.E.A.; PAES, M.C.D.; SCHAFFERT, R.E.; ALVES, V.M.C.; COELHO, A.M.; NUTTI, M.; VIANA, J.L.C.; NOGUEIRA, A.R.A.; SOUZA, G.B. **Caracterização de linhagens de milho quanto aos teores de minerais nos grãos**. Circular técnica 64. Sete Lagoas. Dezembro. 2005.

HALLBERG, L.; BRUNE, M.; ROSSANDER, L. Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. **American Journal Clinical Nutrition**, v.49, n.1, p.140-144, 1989.

HAMBIDGE, K. M.; HUFFER, J.W.; RABOY, V.; GRUNWALD, G.K.; WESTCOTT, J.L.; SIAN, L.; MILLER, L.V.; DORSCH, J. A.; KREBS, N.F. Zinc absorption from low-phytate hybrids of maize and their wild-type isohybrids. **American Journal Clinical Nutrition**, v.79, n.6, p.1053-1059, 2004.

HARO-VICENTE, J. F.; REZ-CONESA, D.; BRAQUEH, F.R.; ROS, G. Iron absorption and haemoglobin status of rats fed a ferrous bisglycinate-fortified growing-up milk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, p.2107-2114, 2009.

HARO-VICENTE, J.; PÉREZ-CONESA, D.; RINCÓN, F.; ROS, G.; MARTÍNEZ-GRACIÁ, C.; VIDAL, M. Does ascorbic acid supplementation affect iron bioavailability in rats fed micronized dispersible ferric pyrophosphate fortified fruit juice? **European Journal of Nutrition**, v.47, n.8, p.470-478, 2008.

HARVEST PLUS. **Desenvolvendo Produtos Agrícolas Mais Nutritivos**. 2004. Disponível em: <http://www.harvestplus.org/pdfs/brochurepo.pdf>. Acesso em: 14 de dezembro de 2008.

HAUG, W.; LANTZSCH, H. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereals products. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 34, p. 1423-1426, 1983.

HEMALATHA, S.; PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Zinc and iron contents and their bioaccessibility in cereals and pulses consumed in India. **Food Chemistry**, v.102, p.1328-1336, 2007.

HIRSCHI, K. Nutritional improvements in plants: time to bite on biofortified foods. **Trends in Plant Science**, v.13, n.9, p.459-463, 2008.

HULSHOF, P.J.M.; KOSMEIJER-SCHUIL, T.; WEST, C.E.; HOLLMAN, P.C.H. Quick screening of maize kernels for provitamin A content. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, n.8, p.655-661, 2007.

INSTITUTE OF MEDICINE. **DRI – Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. National Academic Press, Washington, D.C., 2000. Disponível em URL: <http://www.nap.edu>.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. Ed. São Paulo, 2005. 1018p.

KATSUMATA, S.I.; KATSUMATA-TSUBOI, R.; UEHARA, M.; SUZUKI, K. Severe Iron Deficiency Decreases Both Bone Formation and Bone Resorption in Rats. **Journal of Nutrition**, v.139, n.2, p.238-243, 2009.

KUHNEN, S. **Metabolômica e bioprospecção de variedades crioulas e locais de milho (*Zea mays* L.)**. 2007. 267p. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2007.

LAYRISSE, M.; GARCÍA-CASAL, M.N.; SOLANO, L.; BARON, M.A.; ARGUELLO, F.; LLOVERA, D.; RAMÍREZ, J.; LEETS, I.; TROPPER, E. The role of vitamin A on the inhibitors of nonheme iron absorption: Preliminary results. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.8, n.2, p.61-67, 1997.

LORENZ, A.J.; SCOTT, M.P.; LAMKEY, K.R. Quantitative Determination of Phytate and Inorganic Phosphorus for Maize Breeding. **Crop Science**, v.47, n.2, p.600-604, 2007.

MA, G.; JIN, Y.; PIAO, J.; KOK, F.; GUUSJE, B.; JACOBSEN, E. Phytate, Calcium, Iron, and Zinc Contents and Their Molar Ratios in Foods Commonly Consumed in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.26, p.10285-10290, 2005.

MAYER, J.E.; PFEIFFER, W.H.; BEYER, P. Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, n.2, p.166-170, 2008.

MILLER, D. D.; SCHRICKER, B. R.; RASMUSSEN, R. R.; VAN CAMPEN, D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.34, p.2248-2256, 1981.

NAVES, M.M.V.; SILVA, M.S.; CERQUEIRA, F.M.; PAES, M.C.D. Avaliação química e biológica da proteína do grão em genótipos de milho de alta qualidade protéica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.34, n.1, p.1-8, 2004.

OIKEH, S.O.; MENKIR, A.; MAZIYA-DIXON, B.; WELCH, R.; GLAHN, R.P. Assessment of Concentrations of Iron and Zinc and Bioavailable Iron in Grains of Early-Maturing Tropical Maize Varieties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, n.12, p.3688-3694, 2003.

PORRES, J. M.; STAHL, C. H.; CHENG, W. H.; FU, Y.; RONEKER, K. R.; POND, W.G.; LEI, X. G. Dietary intrinsic phytate protects colon from lipid peroxidation in pigs with a moderately high dietary iron intake. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.221, p.80-86, 1999.

PUSHPANJALI; S. KHOKHAR. In vitro availability of iron and zinc from some Indian vegetarian diets: correlations with dietary fibre and phytate. **Food Chemistry**, v.56, n.2, p.111-114, 1996.

RABOY, V.; GERBASI, P.F.; YOUNG, K.A.; STONEBERG, S.D.; PICKETT, S.G.; BAUMAN, A.T.; MURTHY, P.P.N.; SHERIDAN, W.F.; ERTL, D.S. Origin and Seed Phenotype of Maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. **Plant Physiology**, v.124, p.355-368, 2000.

REDDY, M.B.; COOK, J.D. Assessment of dietary determinants of nonheme-iron absorption in humans and rats. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.54, p.723-728, 1991.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C., JR. 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.

RONG, L.I.; KANG-NING, W. Nixtamalization Effects on the Contents of Phytic Acid in the Varieties of Maize and the Bioavailability of Iron in Nixtamalized Maize to Young Pigs. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.8, n.6, p.905-909, 2009.

SIMIC, D.; SUDAR, R.; LEDENCAN, T.; JAMBROVIC, A.; ZDUNIC, Z.; BRKIC, I.; KOVACEVIC, V. Genetic variation of bioavailable iron and zinc in grain of a maize population. **Journal of Cereal Science**, v.50, p.392-397, 2009.

SYSTAT SOFTWARE. **SigmaPlot for Windows**. Version 11.0. 2008. (Software).

TOAIARI, S.D.A.; YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; SOUZA, R.F.S. Biodisponibilidade de ferro do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e da farinha de mandioca fortificada com ferro em ratos. **Revista de Nutrição**, v.18, p.291-299, 2005.

UAUY, R.; HERTRAMPF, E.; REDDY, M. Iron Fortification of Foods: Overcoming Technical and Practical Barriers. **Journal of Nutrition**, v.132, n.4, p.849S-852, 2002.

VELASCO-REYNOLD, C.; NAVARRO-ALARCON, M.; LOPEZ-GA DE LA SERRANA, H.; PEREZ-VALERO, V.; LOPEZ-MARTINEZ, M. Iron Dialyzability from Hospital Duplicate Meals: Daily Intake. **Biological Trace Element Research**, v.130, p.241-248, 2009.

VITOLLO, M. R. Anemia no Brasil: até quando? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.30, p.429-431, 2008.

WHO - World Health Organization. **Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005 : WHO global database on anaemia**. Geneva: WHO, 2008.

ZIMMERMANN, M. B.; HURRELL. R.F. Nutritional iron deficiency. **The Lancet**, v.370, n.9586, p.511-520, 2007.

## Apêndice 1

### Testes preliminares

Antes da realização da diálise foram realizados alguns testes para padronização da metodologia, que ainda não é utilizada no Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa. As enzimas utilizados no ensaio realizado no IQ-USP foram os mesmo usados nestes testes.

Foram utilizadas duas soluções digestivas neste procedimento, que devem ser preparados no dia da utilização. A solução pepsina-HCl era composta de 1,6 gramas de pepsina dissolvida em 10 mL de HCl 0,1N. A solução de pancreatina bile era composta de 0,04 g de pancreatina e 0,25 g de bile dispersos em 10 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0,1M. Preparava-se um volume de solução de acordo com a quantidade de amostras que seriam submetidas a digestão simulada.

Inicialmente, utilizou-se a metodologia proposta por Miller *et al.* (1981), com algumas adaptações feitas por Luten *et al* (1996). A técnica consiste na simulação do processo de digestão e absorção gastrointestinal. Na digestão gástrica foi utilizada solução pepsina-HCl que foi incubada juntamente com a amostra (milho) em banho-maria a 37°C por duas horas, sob agitação. Na fase intestinal, neste mesmo recipiente, foram colocados os tubos de diálise contendo água e NaHCO<sub>3</sub> 0,1M equivalente à acidez titulável, mensurada anteriormente (técnica detalhada no próximo parágrafo). Os béqueres então foram selados com parafilme e incubados a 37°C em banho-maria sob agitação até pH em torno de 5 (aproximadamente 40 minutos). Posteriormente, acrescentou-se a solução de pancreatina-bile e a incubação continuou por mais 2 horas. Ao final deste período de incubação, os tubos de diálise foram removidos, enxaguados com água deionizada e o conteúdo do tubo de diálise foi analisado quanto ao teor de ferro por espectrofotometria de absorção atômica. O protocolo da diálise pode ser melhor observado na Figura 3.

A acidez titulável foi mensurada de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005). À solução resultante da fase gástrica foi adicionada a solução de pancreatina-bile, e posteriormente realizou-se a titulação com NaOH 0,5 M

até atingir pH de 7,5. No procedimento da diálise, foi utilizado o  $\text{NaHCO}_3$  equivalente em moles ao NaOH gasto na titulação.

Teve-se o cuidado de lavar as vidrarias utilizadas na diálise, enxaguar com água destilada e desmineralizar por meio de remolho por 12 horas em ácido nítrico a 10%. Posteriormente, as vidrarias foram enxaguadas com água deionizada e secas em estufa com circulação de ar.

No primeiro teste foi adicionado 1,5 mL de solução de pepsina e 10 mL da solução pancreatina-bile, o que não resultou numa boa repetição do resultado da diálise, com valores que variaram de 1,35 a 13,06% de ferro dialisável para uma mesma amostra (1F5624). Depois se aumentou a quantidade da solução de pancreatina-bile de 10 para 15 mL, e ainda assim não foram obtidos resultados satisfatórios, com valores negativos até 9,71% de ferro dialisável. Depois as amostras foram passadas em peneira de granulometria de 40 mesh, e foram obtidos valores que foram de -0,49 a 3,58%. A partir desses resultados apresentados para uma mesma amostra depois de algumas modificações, pode-se perceber que a metodologia ainda não está bem estabelecida.

Também foi testado colocando-se o digerido final no interior do tubo de diálise, seguindo o fluxograma da Figura 4. Todavia, ao utilizar este protocolo não era possível a transferência completa dos sólidos para o tubo de diálise, visto que a o milho não dissolvia na água. Esta limitação inviabiliza a utilização deste protocolo desta forma.

Diante desses resultados, optou-se por realizar a parte do ensaio *in vitro* no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, onde esta metodologia já está bem estabelecida.



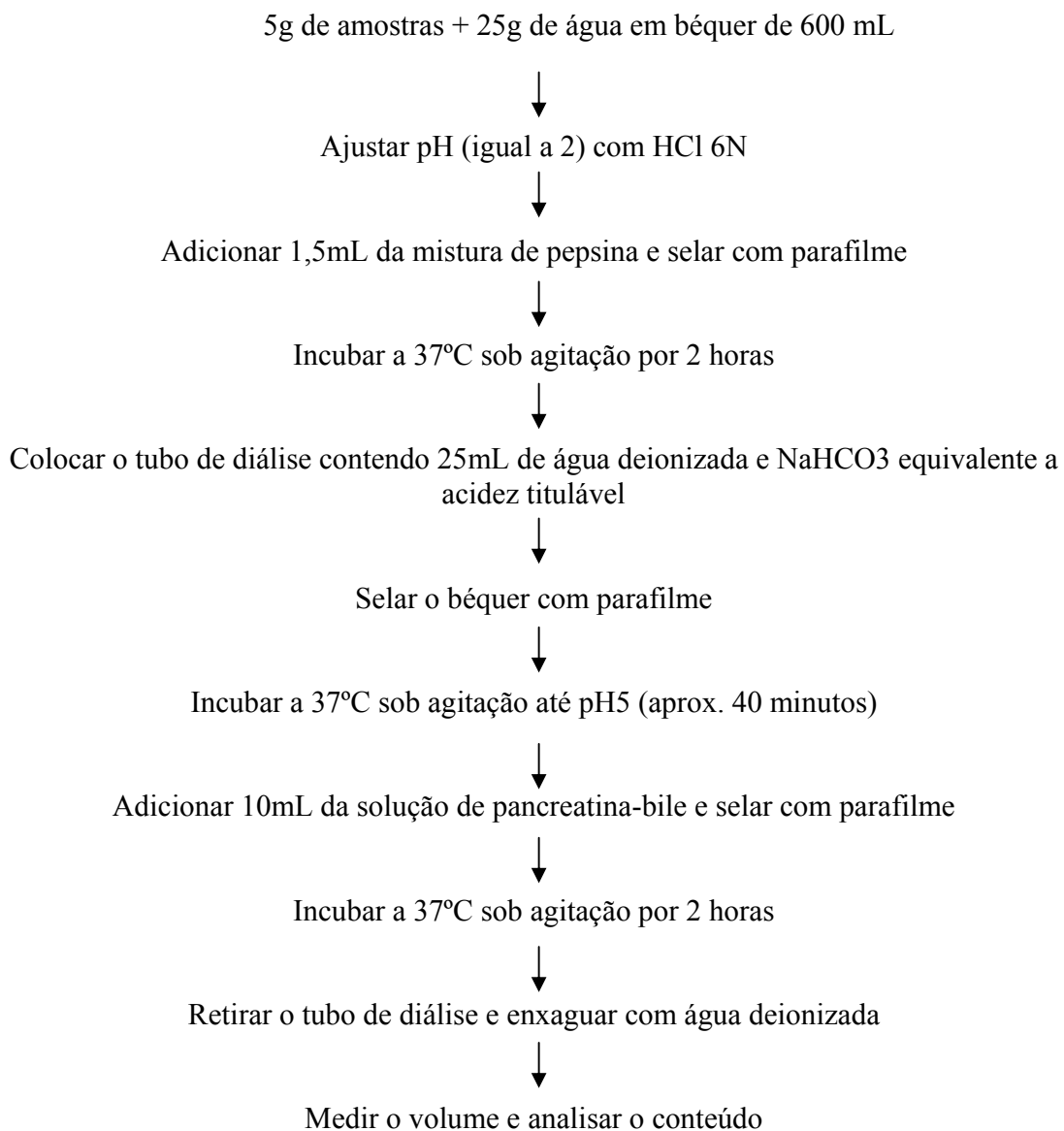


Figura 3- Fluxograma para determinação de ferro dialisável segundo Miller *et al.* (1981) com modificações de Luten *et al* (1996).

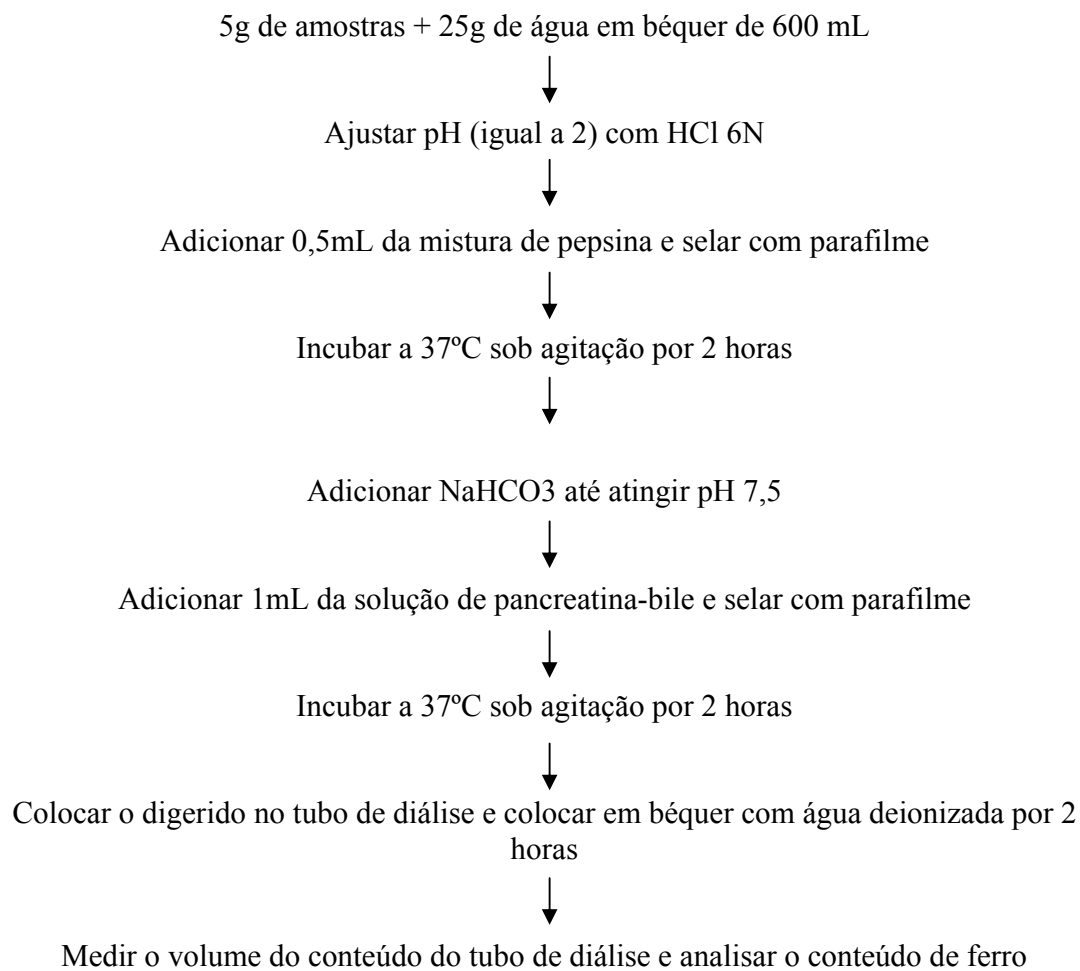


Figura 4- Fluxograma para determinação de ferro dialisável adaptado.

## Apêndice 2

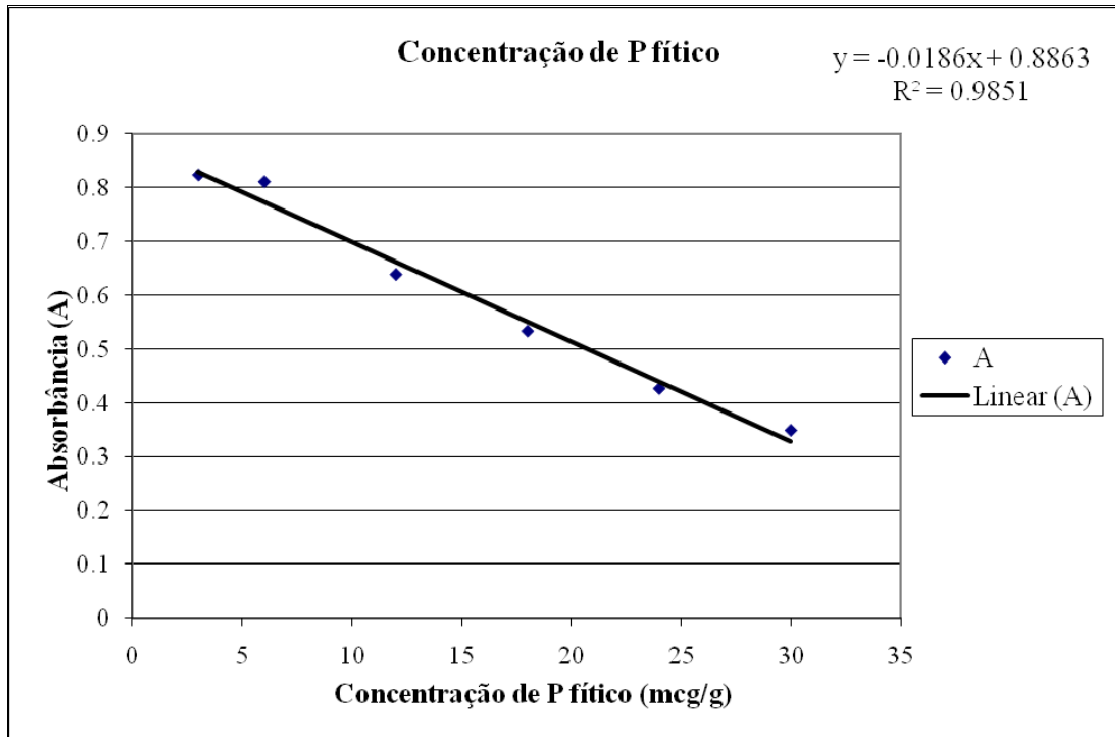


Figura 5- Curva padrão para determinação de fósforo fítico