

LUCÍA DE LOS ANGELES RAMÍREZ CÁRDENAS

INTERAÇÃO DO COBRE NO METABOLISMO DO FERRO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

LUCÍA DE LOS ANGELES RAMÍREZ CÁRDENAS

INTERAÇÃO DO COBRE NO METABOLISMO DO FERRO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 31 de maio de 2001

Prof. José Carlos Gomes
(Conselheiro)

Prof^a. Josefina Bressan Rezende Monteiro
(Conselheira)

Prof. Gilberto Paixão Rosado

Prof. Paulo Roberto Cecon

Prof^a. Neuza Maria Brunoro Costa
(Orientadora)

Aos meus pais,
Carlos Alberto e Margarita Raquel,
pelo amor e constante apoio durante esta jornada.

AGRADECIMENTO

A Deus, pela companhia constante.

À Universidade Central do Equador pelos conhecimentos adquiridos que me permitiram continuar com meu crescimento acadêmico.

Ao governo brasileiro pela concessão da bolsa de estudo através da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Universidade Federal de Viçosa e aos Departamentos de Tecnologia de Alimentos e de Nutrição e Saúde, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À professora Neuza Maria Brunoro Costa, pela confiança em mim depositada e pelo apoio no momento mais crítico de meu mestrado, pois sem sua ajuda não teria sido possível a realização desta pesquisa. Pela amizade, orientação, incentivo e disponibilidade sempre constantes. Por

enriquecer a minha vida não só com conhecimentos científicos senão também com lições de vida.

À professora June Ferreira Maia Parreiras, pela amizade, atenção e pelo apoio dispensados nas primeiras etapas de meu mestrado.

À professora Josefina Bressan Rezende Monteiro, pela participação, colaboração e pelas sugestões dadas.

Aos professores José Carlos Gomes, Gilberto Paixão Rosado e Paulo Roberto Cecon pela colaboração e pelas sugestões.

Ao professor Fernando Pinheiro pela amizade, paciência, disponibilidade, sugestões e, sobretudo, pela ajuda fundamental na parte estatística deste trabalho.

Às minhas colegas de curso, em especial à Luciana Sant'Ana, pelos conselhos e disponibilidade permanentes no desenvolvimento deste trabalho. À Eveline, Maria do Rosário, Lorena, Dayse, Ferlando, Teresa, pela colaboração e auxílio nas diversas etapas do experimento.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde, especialmente ao Adão, Terezinha, Ricardo, Mimorina, pela ajuda e alegria permanentes.

Ao Carlos Alves do Departamento de Solos pela valiosa colaboração e pela amizade. Ao Valério do Departamento de Tecnologia de Alimentos pela ajuda na realização das análises.

Ao Laboratório Santa Rita de Cássia e em especial ao farmacêutico Nelson, pela grande colaboração nas análises e pela amizade.

Aos amigos e colegas do Departamento de Tecnologia de Alimentos principalmente a Cleuza e Luciana Neri, pelo carinho e simpatia.

Ao Paulo Sobrinho pelo apoio na parte estatística e pela amizade.

À Elisabete Valadares pelo carinho e por me proporcionar um lar chamado Hotel Estudantil, onde morei o primeiro ano da minha permanência no Brasil. Pela alegria permanente e por ser a minha irmã brasileira, me apoiando em todas as decisões da minha vida. A Jésus Valadares pela acolhida na sua família, e por me oferecer carinho e apoio constantes. A toda a família Valadares de quem me sinto ser uma integrante a mais.

Quando as coisas ficam difíceis ninguém pode estimar o valor de se poder falar a uma amiga. À Roxana pela grande capacidade de ouvir e de compartilhar. Pelo carinho e a amizade de todo este tempo.

À Patrícia e Luciana Leal minhas companheiras de apartamento e amigas, por todos os momentos compartilhados, pelas sugestões acadêmicas e pessoais e, sobretudo, pela família que formamos. Em especial para Luciana, pois sua presença tanto no seminário como na defesa de meu trabalho foi inestimável, apoio que só é capaz de oferecer uma grande amiga.

À Alair, pelo sorriso matinal das segundas e quintas feiras, pelas palavras de consolo e de otimismo.

Ao Germán Romo por acreditar em mim e pelo estímulo constante para meu crescimento profissional.

Para Juan Francisco Gabela, Maria Fernanda, Carmen Rosa e Patrícia, embora longe, sempre perto de cada acontecimento na minha vida com a disposição e o carinho necessários para me ajudar a vencer todas as dificuldades.

Para a Fabiene, Flavinha, Juliana Barreto, Juliana Castro, Luciana Almeida, Tati, Imaculada e todas as meninas do Hotel Estudantil, pela atenção permanente e por cada demonstração de afeito que recebi.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa e para fazer da minha permanência no Brasil uma lembrança inesquecível.

BIOGRAFIA

LUCÍA DE LOS ÁNGELES RAMÍREZ CÁRDENAS, filha de Carlos Alberto Ramírez e Margarita Raquel Cárdenas, nasceu em Quito capital do Equador, província do Pichincha, em 8 de agosto de 1966.

Em julho de 1992, gradou-se de Farmacêutica Bioquímica pela Universidade Central do Equador, em Quito, Equador.

No período de março de 1993 a março de 1995, trabalhou na HOECHST ETECO, empresa farmacêutica alemã, no departamento de Controle de Qualidade.

No período de março de 1995 a março de 1999, trabalhou na PRONACA (Processadora Nacional de Aves), empresa equatoriana, no departamento de Controle de Qualidade.

Em abril de 1999, iniciou o Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se aos exames finais de defesa de tese em maio de 2001.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE QUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Importância do ferro na nutrição humana	5
2.1.1. Características e funções	5

2.1.2.	Ferro corporal	7
2.1.3.	Mecanismos de absorção e transporte de ferro	8
2.1.3.1.	Absorção do ferro não heme	9
2.1.3.2.	Transporte	10
2.1.3.3.	Absorção do ferro heme	11
2.1.4.	Regulação da absorção	12
2.1.5.	Fatores dietéticos e biodisponibilidade	14
2.1.6.	Armazenamento	16
2.1.7.	Excreção	17
2.1.8.	Ferro nos eritroblastos – Formação da hemoglobina	17
2.1.9.	Deficiência – Anemia ferropriva	18
2.1.10.	Toxicidade	20
2.2.	Importância do cobre na nutrição humana	21
2.2.1.	Propriedades químicas	21
2.2.2.	Cobre nos alimentos	21
2.2.3.	Metabolismo	22
2.2.3.1.	Absorção	22
2.2.3.2.	Transporte	23
2.2.3.3.	Excreção	24
2.2.4.	Toxicidade	25
2.2.5.	Bases bioquímicas da deficiência de cobre	26
2.2.5.1.	Interação do cobre no metabolismo do ferro	27
2.2.5.2.	Sistema cardiovascular	29
3.	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1.	Preparo de arroz e do feijão	34
3.2.	Caracterização físico – química	35
3.2.1.	Minerais	35
3.2.1.1.	Oxidação da matéria orgânica e preparo das soluções minerais	35
3.2.1.2.	Determinação dos teores de minerais	35
3.3.	Composição e preparo das dietas elaboradas	36
3.4.	Ensaio biológico para analisar a interação do cobre no	

metabolismo do ferro.....	38
3.4.1. Fase de depleção	38
3.4.2. Fase de repleção	39
3.4.3. Análises	39
3.4.3.1. Hemoglobina	39
3.4.3.2. Hematócrito	40
3.4.3.3. Ferro sérico	40
3.4.3.4. Hemoglobina glicosilada	41
	Página
3.4.4. Modelo experimental	41
3.4.5. Análises dos dados	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Caracterização em Cobre e Ferro	43
4.1.1. Arroz e feijão	43
4.1.2. Dietas elaboradas	45
4.2. Avaliação da influência do cobre no metabolismo do ferro.....	46
4.2.1. Fase de depleção	46
4.2.2. Fase de repleção	46
4.2.3. Ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar	62
5. RESUMO E CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APÊNDICE	78

LISTA DE QUADROS

	Página
1. Distribuição molecular do ferro no corpo humano segundo o sexo .	8
2. Principais cuproenzimas e suas funções.....	26
3. Composição das dietas (g/100g da mistura).....	37
4. Níveis de cobre nas dietas elaboradas (ppm).....	37
5. Teor de cobre e ferro em amostras cozidas e desidratadas de arroz e feijão, em base seca (mg/100g).....	44
6. Teor de cobre e ferro nas dietas, em base úmida (mg/Kg)	46

7. Valores médios de hemoglobina final (Hbf), ganho de hemoglobina (GHb), hematócrito (HEMAC), ferro sérico (Fe) e hemoglobina glicosilada (Hbg) ao final da fase de repleção	47
8. Médias do ganho de hemoglobina (GHb), hematócrito (HEMAC), ferro sérico (Fe), hemoglobina glicosilada (Hbg) nas dietas padrão e experimental	49
9. Resumo da análise de variância da regressão para ganho de hemoglobina (GHb), hematócrito (HEMAC), ferro sérico (Fe), hemoglobina glicosilada (Hbg), em função de diferentes níveis de cobre nas dietas padrão e experimental.....	50
10. Valores médios de ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) obtidos de ratos alimentados durante a fase de repleção	63
11. Médias de ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) obtidos de ratos alimentados durante a fase de repleção	63

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Relações postuladas entre deficiência de cobre, peroxidação, glicação e respostas mediadas pelo óxido nítrico.....	32
2. Estimativa do ganho de hemoglobina (G^{Hb}) em função de níveis de cobre (C) nas dietas padrão e experimental	51
3. Estimativa do hematócrito (HEMAC) em função de níveis de cobre (C) nas dietas padrão e experimental	52
4. Estimativa do ferro sérico (F^e) em função de níveis de cobre (C) nas dietas padrão e experimental	53

5. Estimativa da hemoglobina glicosilada (Hb ^g) em função de níveis de cobre (C) na dieta padrão	60
6. Estimativa da hemoglobina glicosilada (Hb ^g) em função de níveis de cobre na dieta experimental	61

RESUMO

RAMIREZ CÁRDENAS, Lucía de los Angeles, M.S. Universidade Federal de Viçosa, maio de 2001. *Interação do cobre no metabolismo do ferro*. Orientadora: Neuza Maria Brunoro Costa. Conselheiros: José Carlos Gomes e Josefina Bressan Rezende Monteiro.

A anemia ferropriva é um dos mais importantes problemas nutricionais, tanto nos países desenvolvidos, como nos países em desenvolvimento, podendo estar associada à baixa ingestão de ferro ou ao consumo de ferro de baixa biodisponibilidade. Pode ainda ser devida à deficiência de cobre, mesmo que os níveis de ingestão de ferro sejam adequados. O objetivo deste trabalho

foi avaliar a interação do cobre no metabolismo do ferro em ratos anêmicos. A anemia foi induzida pelo consumo de uma dieta sem ferro e sem cobre, por 22 dias. Posteriormente, os animais foram alimentados por 15 dias com dietas padrão e experimental, contendo uma mesma concentração de ferro (24 ppm) e diferentes níveis de cobre (0, 2, 4, 6 ou 12 ppm). Na dieta padrão foi utilizado sulfato de cobre e de ferro para a obtenção dos níveis requeridos desses minerais. Na dieta experimental foi utilizada uma mistura de arroz e feijão para prover 25% dos níveis de cobre. O restante de cobre e ferro foi suprido pelas mesmas fontes inorgânicas da dieta padrão. Foi utilizado um modelo fatorial, sendo os 9 tratamentos dispostos no delineamento em blocos casualizados com 8 repetições. A interação dos níveis de cobre no metabolismo do ferro foi avaliada através da análise de regressão da recuperação dos níveis de hemoglobina, hematócrito, ferro sérico e hemoglobina glicosilada. Foi observado um aumento do ganho de hemoglobina, hematócrito e ferro sérico conforme o incremento da concentração do cobre, chegando a um valor máximo ao redor de 6 ppm. Baixos níveis hematológicos podem ter sido provocados por uma deficiência de ceruloplasmina e citocromo c oxidase, enzimas cobre dependentes requeridas no metabolismo do ferro. Tanto a deficiência quanto o excesso de cobre resultam em anemia, porém, um excesso, até o limite de 12 ppm foi menos prejudicial que a ausência de cobre na dieta. Foi observado ainda que à medida que se aumenta a concentração de cobre na dieta padrão se diminui a glicosilação não enzimática de hemoglobina até a concentração em torno de 6 ppm, produzindo-se o efeito contrário com o aumento posterior da concentração de cobre. Foram observadas diferenças entre as dietas quanto aos níveis de hemoglobina e hemoglobina glicosilada ($p < 0,05$), implicando na menor biodisponibilidade desses minerais na dieta de arroz e feijão. A influência do cobre no metabolismo do ferro deve ser levada em consideração para os programas de prevenção e tratamento de anemias, especialmente em populações cuja base da alimentação é composta por alimentos com baixa biodisponibilidade desses minerais.

ABSTRACT

RAMÍREZ CÁRDENAS, Lucía de los Angeles, M.S. Universidade Federal de Viçosa, May 2001. *Copper interaction on iron metabolism*. Adviser: Neuza Maria Brunoro Costa. Committee Members: José Carlos Gomes and Josefina Bressan Rezende Monteiro.

Iron deficiency anemia is one of the most important nutritional problems in developed and in developing countries and it is usually associated either to the low levels of iron intake or to the consumption of low bioavailable iron sources. It can also be due to copper deficiency, even on adequate levels of iron consumption. The objective of the present work was to evaluate the

interaction of copper on iron metabolism in anemic rats. The anemia was induced by the administration of a copper and iron depleted diet for 22 days. Then, the animals were fed by 15 days with control or experimental diets, containing the same iron concentration (24 ppm) and different levels of copper (0, 2, 4, 6 or 12 ppm). Copper and iron sulfate was added to the control diet to obtain the requested levels of the minerals. In the experimental diet a mixture of rice and bean was used to provide 25% of copper level. Copper and iron concentration were completed with the same inorganic sources of the control diet. A factorial model was used and the 9 treatments were randomly assigned to 8 blocks. The interaction of copper levels on iron metabolism was evaluated by regression analysis of the hemoglobin, hematocrit, serum iron and glycosylated hemoglobin repletion. An increase on the levels of hemoglobin, hematocrit and serum iron was observed according to the increment of copper concentration, attaining a maximum value of about 6 ppm. Low hematologic levels was probably due to ceruloplasmin and cytochrome c oxidase deficiency, copper-dependent enzymes requested on iron metabolism. Both, copper deficiency and copper excess result in anemia, however an excess until the limit of 12 ppm was less harmful than the absence of copper in the diet. As copper concentration in the control diet increases, non-enzymatic hemoglobin glycosylation diminishes until the concentration about 6 ppm. An opposite effect is observed with the subsequent increase on copper concentration in the diet. A difference ($p < 0.05$) between the two diets was observed in terms of hemoglobin and glycosylated hemoglobin levels. This suggests a lower bioavailability of those minerals in a rice and bean diet. The influence of copper on iron metabolism should be taken in consideration for prevention programs and treatment of anemias, especially in populations whose basic diet is composed by foods with low mineral bioavailability.

1. INTRODUÇÃO

Para o pleno desenvolvimento e adequado funcionamento, o organismo humano necessita de mais de 50 nutrientes, os quais não podem ser sintetizados. Aí estão incluídos vitaminas, minerais, fibras, água, aminoácidos, ácidos graxos e açúcares (FERREIRA, 1999). Os micronutrientes são um grupo de componentes dietéticos caracterizados pela baixa quantidade em que são encontrados na dieta, mas que não obstante são necessários para diversas funções importantes para a manutenção da saúde. Vitaminas e minerais traços são as classes principais de micronutrientes na dieta. É de enorme interesse a proporção destas combinações que estão disponíveis nos alimentos para a utilização pelo corpo, ou seja, para que estejam biodisponíveis. Existem várias situações em que a deficiência parece acontecer na presença de uma provisão dietética aparentemente adequada (JACKSON, 1997).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), cerca de um terço da população mundial, sofre de deficiência de micronutrientes. Os grupos populacionais mais afetados por estas deficiências são as crianças, os idosos,

as gestantes, as lactantes e as populações de baixa renda. Dentre as mais importantes deficiências estão as de ferro, iodo, vitamina A, vitaminas do complexo B, vitamina C, selênio, zinco e cálcio. A carência desses nutrientes prejudica a nutrição e a saúde, a resistência às infecções, o desenvolvimento físico, o aprendizado e a capacidade de trabalho de seus portadores. Estas deficiências podem e são comprovadamente prevenidas por uma alimentação balanceada e variada (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA..., 1990; FUNDO DAS NAÇÕES...- UNICEF, 1993; CONSÓRCIO..., 1994; FUNDO DAS NAÇÕES...- UNICEF, 1998).

Estima-se que cerca de dois bilhões de indivíduos sofrem de carência de ferro ou níveis baixos de hemoglobina, o que torna essa deficiência o principal problema nutricional e o de maior prevalência não só nos países em desenvolvimento, mas também nos desenvolvidos, constituindo um problema de saúde pública mundial. Nos países em desenvolvimento as causas desta deficiência estão relacionadas com consumo insuficiente de formas de ferro biodisponíveis, infecções intestinais, parasitoses, deficiência de vitaminas A e C. Esta deficiência estabelece então uma situação de risco que inclui a população tanto dos estratos sociais mais privilegiados, como dos mais carentes, especialmente o grupo materno-infantil. Como pode existir deficiência de ferro sem a presença de anemia, a ocorrência de carência de ferro na população apresenta uma magnitude ainda maior do que a prevalência da anemia ferropriva. A anemia é uma doença sistêmica, que afeta diversos órgãos e funções. Considera-se a ocorrência de anemias nutricionais como um problema de importância epidemiológica relevante, em que a anemia carencial ferropriva é atualmente, a patologia de maior prevalência em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento (MAYER e ADIELS-TEGMAN, 1985; VANNUCCHI et al., 1992; DE ANGELIS e CTENAS, 1993; WALTER, 1994; BATISTA-FILHO e FERREIRA, 1996).

Segundo a ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (1972), a anemia ferropriva ocorre como resultado de um desequilíbrio no balanço entre a quantidade de ferro biologicamente disponível e a necessidade orgânica.

A baixa ingestão de ferro e a baixa biodisponibilidade desse mineral ingerido, ou seja, a pequena quantidade de ferro da dieta, que é de fato metabolizável constituem as principais causas da anemia ferropriva. A

biodisponibilidade desse micronutriente tem-se mostrado extremamente variável. Muitos fatores como a forma atômica, a composição da dieta com a qual está sendo consumido, as necessidades individuais, entre outros, influenciam sua absorção (BAYNES e BOTHWELL, 1990).

Dados do Ministério da Saúde mostram que, no Brasil, a anemia ferropriva tem uma prevalência de 40%, em média, afetando, principalmente, crianças, adolescentes e gestantes, sendo a deficiência de ferro, especialmente em lactentes e pré-escolares, um dos problemas nutricionais mais sérios do país (ROMANI et al., 1991; DE ANGELIS e CTENAS, 1993), considerando como maior fator causal, a baixa biodisponibilidade do ferro ingerido, pois o consumo de ferro é predominantemente não hemínico, já que a base da alimentação da população brasileira é constituída por arroz, feijão, fubá de milho, derivados do trigo e farinha de mandioca. As leguminosas combinadas aos cereais representam uma importante fonte de diversos nutrientes para vários segmentos populacionais. Na dieta básica brasileira, o arroz polido ocupa o segundo e o feijão o nono lugar na lista dos itens alimentares mais consumidos, com pequena variação no consumo entre as diferentes regiões do país (ANUÁRIO ESTATÍSTICO..., 1992). Particularmente na região da *Zona da Mata* de Minas Gerais, o arroz e o feijão constituem a base da alimentação de cerca de 100% da população, sendo introduzidos precocemente na alimentação infantil, tanto na classe sócio-econômica baixa quanto nos estratos sociais mais favorecidos (SALGADO et al., 1983; MAFFIA et al., 1990).

Uma avaliação de vários itens alimentares que constituem o alicerce da dieta básica da população brasileira mostrou que esta dieta é incapaz de fornecer as quotas necessárias e seguras de cálcio, magnésio, ferro, zinco, selênio e cobre sendo estes minerais, portanto, os que se apresentam mais deficitários (FERREIRA, 1995; FERREIRA, 1999).

Além da ingestão de baixos níveis de ferro ou de ferro com baixa biodisponibilidade, a deficiência de ferro pode ser devida à deficiência de cobre, ainda que os níveis de ingestão de ferro sejam adequados. Observações nutricionais feitas nos anos cinqüenta em suínos deficientes em cobre identificaram uma anemia hipocrômica-microcítica, apesar da presença de ferro dietético em quantidade suficiente. A administração oral de ferro

adicional, não corrigiu a anemia, ao invés, resultou em acumulação de ferro no enterócito duodenal. Presume-se que a deficiência de cobre bloqueia a saída de ferro do enterócito, devido à deficiência de ceruloplasmina, proteína do soro, cobre-dependente com atividade ferroxidase (WOOD e HAN, 1998).

O cobre é essencial para a absorção e utilização do ferro, e desta maneira para a formação da hemoglobina e a prevenção da anemia. Na deficiência de cobre há uma diminuição da mobilização do ferro de alguns tecidos, resultando em uma acumulação do ferro (EVANS e ABRAHAM, 1973).

A deficiência de cobre na dieta provoca uma série de alterações no corpo, depressão da função de enzimas cobre dependentes, antioxidantes, permitindo a acumulação de radicais livres provenientes do oxigênio. O cobre desempenha um importante papel no metabolismo de carboidratos, e sua deficiência leva a uma diminuição deste metabolismo, o que provoca a acumulação de açúcares favorecendo a glicosilação de proteínas degradando sua estrutura e função (FIELDS, et al., 1984a; SAARI, 2000).

Doenças associadas com modificação das proteínas através de reações não enzimáticas têm sido reconhecidas. Glicosilação não enzimática de proteínas como hemoglobina A, colágeno, albumina, tubulina, proteínas de membrana (dos eritrócitos), proteínas do soro, cristalino dos olhos, proteínas glomerulares renais, mielina, e outras proteínas com uma variedade de açúcares especialmente glicose, tem sido estabelecida como consequência da coexistência in vivo de glicose e os grupos aminos livres de proteínas (KOENIG, et al., 1977; VLASSARA, et al., 1981; SHAKLAI, et al., 1984; ARAI, et al., 1987; NJORGE, et al., 1988).

A proposta deste trabalho foi estudar a influência do cobre no metabolismo do ferro em ratos anêmicos, avaliando parâmetros como formação de hemoglobina, hematócrito, concentração de ferro sérico e formação de hemoglobina glicosilada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância do Ferro na Nutrição Humana

2.1.1. Características e funções

O ferro é um nutriente essencial para todos os organismos vivos, com exceção de certos membros do gênero das bactérias *Lactobacillus* e *Bacillus*. Nesses organismos as funções do ferro são desempenhadas por outros metais de transição especialmente manganês e cobalto. Para todas as outras formas de vida, o ferro é um componente essencial ou um cofator para centenas de proteínas e enzimas (BEARD e DAWSON, 1997).

A alta prevalência da deficiência nutricional do ferro, estando este nutriente presente em abundância na natureza pode ser explicada por seu comportamento em soluções aquosas, onde sob condições redutoras a forma ferrosa predomina. Seu estado de oxidação, na maioria das formas naturais é 2^{+} (ferroso) ou 3^{+} (férico). O íon ferroso é totalmente hidrossolúvel nos níveis fisiológicos de pH, mas, na presença de oxigênio molecular, pode ser oxidado para o estado férrico, e este sofre uma hidrólise progressiva produzindo o

hidróxido férrico insolúvel (CRICHTON e CHARLOTEAUX-WAUTERS, 1987; MILLER, 1996; WORWOOD, 1996).

Além de constituinte da hemoglobina, o ferro faz parte de inúmeras outras proteínas com atividade enzimática, sendo o ferro necessário para a síntese e atividade destas proteínas, que podem ser agrupadas pelo tipo da estrutura do ferro que contém, em enzimas heme e não-heme. Heme é uma coenzima que contém um átomo de ferro. As proteínas heme incluem hemoglobina, mioglobina, citocromos, catalases e peroxidases. As peroxidases e catalases possuem quatro grupos heme e constituem um dos principais sistemas de proteção à peroxidação de lipídios das membranas. O ferro em enzimas não-heme geralmente é ligado a átomos de enxofre de resíduos de cisteína. Estas enzimas são denominadas proteínas ferro-enxofre. Incluem flavoproteínas como nicotinamida adenina dinucleótide (NADH) dehidrogenase, aconitase e succinildeidrogenase. As enzimas não heme também podem conter um átomo simples de ferro (fenilalanina hidroxilase, lisil hidroxilase), e ferro com ponte de oxigênio (Fe-O-Fe). O metabolismo aeróbio depende do ferro devido a seu papel nos grupos funcionais da maioria das enzimas do ciclo de Krebs, como um portador de elétrons nos citocromos, e como meio de transporte do O₂ e CO₂ na hemoglobina (BRODY, 1994; FAIRBANKS, 1994; YIP e DALLMAN, 1997; HURRELL, 1997a; MARTINEZ, et al., 1999; BAYNES e STIPANUK, 2000).

O ferro participa de importantes funções como: formação dos glóbulos vermelhos, transporte de O₂ e CO₂, transferência de elétrons, reações de oxidação – redução, produção de energia celular, proteção ao sistema imunológico, conversão de β -caroteno em vitamina A, síntese do colágeno, formação de purinas (ácido nucléico), remoção de lipídios do sangue, detoxificação de drogas no fígado, produção de anticorpos, síntese da carnitina (oxidação de ácidos graxos na mitocôndria), síntese de DNA e divisão celular e absorção de vitamina D em crianças com anemia ferropriva (BEARD, e DAWSON, 1997; HURRELL, 1997a; MARTINEZ, et al., 1999; BAYNES e STIPANUK, 2000).

2.1.2. Ferro corporal

O ferro no corpo é de aproximadamente 40 mg/kg nas mulheres e 50 mg/kg em homens (BAYNES e STIPANUK, 2000).

A distribuição molecular de ferro no corpo humano é resumida no Quadro 1. Porém, a concentração varia em função da idade, peso, sexo, concentração de hemoglobina, tamanho do compartimento de reserva, e os tecidos específicos e órgãos dentro do indivíduo que está sendo examinado (FAIRBANKS, et al., 1994; BEARD e DAWSON, 1997).

O ferro está repartido em dois compartimentos principais, isto é ferro funcional e ferro de armazenamento (BEARD e DAWSON, 1997). O ferro funcional ou essencial está predominantemente composto pelo ferro na hemoglobina das células vermelhas do sangue, o ferro na mioglobina no músculo, e um certo número de proteínas e enzimas (BAYNES e STIPANUK, 2000).

Aproximadamente 85 a 90% do ferro não armazenado está presente na massa de eritrócitos. A quantidade de ferro que se encontra nessa forma é de aproximadamente 35 mg/kg de peso no homem. O restante do ferro corporal, 0 a 20 mg/kg de peso, é encontrado

ligado às proteínas ferritina e hemossiderina e constitui a reserva de ferro do organismo, que pode ser mobilizada de acordo com as necessidades (SGARBIERI, 1987; BEARD e DAWSON, 1997). A distribuição deste ferro de armazenamento não é uniforme, assim o fígado contém 60% da ferritina do corpo. O restante 40% é encontrado em tecidos do músculo e células do sistema retículo endotelial. Normalmente, 95% do ferro armazenado no fígado é encontrado nos hepatócitos como ferritina. A hemossiderina constitui os 5% restantes e é encontrada predominantemente nas células Kupffer dos lisossomos. Porém, durante a sobrecarga de ferro, a massa de hemossiderina no fígado ultrapassa 10 vezes a taxa de ferritina (BEARD e DAWSON, 1997). O tamanho deste compartimento de armazenamento é influenciado notoriamente pela idade, sexo, tamanho do corpo, estado férreo do indivíduo, pela perda férrea excessiva como hemorragias, maior demanda como na gravidez, ou sobrecarga do ferro no corpo com na hemocromatose. As mulheres e crianças têm freqüentemente pouco ferro de armazenamento (FAIRBANKS, et al., 1994).

Quadro 1 - Distribuição molecular do ferro no corpo humano segundo o sexo

		Masculino (mg/kg)	Feminino (mg/kg)
FERRO FUNCIONAL (Essencial)	Hemoglobina	31	28
	Mioglobina	4	3
	Enzimas Heme	1	1
	Enzimas não heme	1	1
	Ferro Transferrina	0,05	0,05
	Sub-total	37	33
FERRO NÃO ESSENCIAL (armazenamento)	Ferritina	9	4
	Hemossiderina	4	1
	Sub-total	13	5
Total		50	38

Fonte: BEARD e DAWSON, 1997.

2.1.3. Mecanismos de Absorção e Transporte do Ferro

A absorção intestinal do ferro reflete a combinação de três determinantes: o conteúdo férreo na dieta, sua biodisponibilidade, e a capacidade das células da mucosa para absorver o ferro (BAYNES e STIPANUK, 2000).

A passagem do ferro pelo enterócito envolve transporte do metal através de três barreiras importantes: a membrana apical, a translocação através do citosol e a liberação do ferro na membrana basolateral e daí para a circulação. Embora parte do ferro da dieta possa ser absorvido passivamente por via paracelular, o transporte transcelular, dependente de energia, representa a via regulada e mediada por carreadores, que controla a absorção de ferro. Embora a via paracelular seja menor, quantidades significantes de ferro podem ser absorvidas quando o conteúdo de ferro da dieta é alto, visto que não há mecanismos reguladores para essa via (WOOD e HAN, 1998).

O ferro dietético é classificado em duas formas, de acordo com seu mecanismo de absorção: ferro-hemínico e ferro não-hemínico (DE ANGELIS e CTENAS, 1993).

2.1.3.1. Absorção do Ferro Não Heme

O balanço normal de ferro é regulado pela sua absorção intestinal. O ferro inorgânico é solubilizado e ionizado pelo suco gástrico (que contém pepsina e ácido clorídrico), é reduzido a Fe^{2+} e quelado. As substâncias que formam quelatos de baixo peso molecular, tais como ácido ascórbico, açúcares e aminoácidos promovem a absorção de Fe (FAIRBANKS, 1994; BEARD e DAWSON, 1997).

Os quelatos podem ser absorvidos ou excretados, dependendo da natureza do complexo ferro-quelato. Se esse complexo se mantém solúvel e o ferro ligado fracamente, o ferro pode ser liberado nas células da mucosa e ser absorvido. Entretanto, se o ferro for fortemente ligado ao quelato e insolúvel, ele será excretado como parte do quelato (FAIRBANKS, 1994).

A absorção pode ocorrer em qualquer local do intestino delgado, mas é mais eficiente no duodeno e pode ser grandemente modificada pela presença dos ligantes. Antes de ser captado pela borda em escova das células da mucosa, os átomos de ferro devem primeiro atravessar a camada de muco. O próprio muco tem a propriedade de ligar ferro. O Fe^{2+} é mais solúvel do que o Fe^{3+} , portanto o Fe^{2+} atravessa a camada de muco mais rapidamente para alcançar a borda em escova, onde é oxidado a Fe^{3+} , antes de entrar nas células epiteliais (FAIRBANKS, 1994).

Na membrana celular da borda em escova das células epiteliais o Fe^{3+} é ligado a proteínas ligantes de ferro, que transferem o ferro para dentro da célula. Diversos estudos têm tentado identificar essas proteínas ligantes. Uma dessas proteínas é a mucina (glicoproteína do muco), que também se liga ao zinco, porém com menor afinidade (FAIRBANKS, 1994; BENITO e MILLER, 1998).

O transporte do ferro através do enterócito parece envolver outras duas proteínas ligantes, semelhantes a transferrina. Uma é a integrina e a outra a mobilferrina, esta última pode também se ligar ao cálcio, cobre e zinco, o que

pode explicar a interação existente na absorção desses elementos (FAIRBANKS, 1994; BEARD e DAWSON, 1997).

De acordo com essa hipótese, a mucina se liga ao ferro no estômago, em pH ácido, tornando-o solúvel e disponível para absorção no pH mais alcalino no duodeno. Integrina, localizada nas vilosidades intestinais, parece facilitar o seu transporte para dentro da célula. Mobilferrina recebe o ferro da integrina que age como uma proteína protetora de ferro no citosol até a membrana basolateral (BENITO e MILLER, 1998).

A maioria do ferro que é absorvido de lúmen intestinal passa rapidamente através das células da mucosa em forma de moléculas pequenas. Quando o ferro alcança o plasma, ele é oxidado a Fe^{3+} pela ceruloplasmina e então captado pela transferrina (FAIRBANKS, 1994).

2.1.3.2. Transporte

No sangue e em outros fluidos corporais, o ferro é transportado pela transferrina, uma glicoproteína, que possui vida média de oito a dez dias. Essa proteína se liga ao ferro que é liberado do enterócito para o sangue, para a linfa ou, ainda, que é secretado do macrófago após degradação da hemoglobina. A transferrina possui dois sítios de ligação para o Fe^{3+} , quando os dois estão ocupados com ferro, a transferrina é chamada *transferrina saturada*. Normalmente, apenas um terço da transferrina está saturada de ferro numa mistura de transferrina mono – e biférrica. Quando a transferrina está 100% saturada, a maioria do excesso de ferro é depositado na ferritina dos hepatócitos, o primeiro órgão através do qual o sangue flui. É ligado a essa proteína que o ferro circula pelo organismo, podendo também estabelecer outro parâmetro de avaliação nutricional. A transferrina ligada ao ferro é transportada através da membrana basolateral da célula da mucosa. O ferro é então levado ao fígado, baço e medula óssea, assim como para os tecidos que precisam de ferro (DE ANGELIS e CTENAS, 1993; FAIRBANKS, 1994).

As membranas das células possuem receptores para a transferrina. Chegando à superfície da célula onde o ferro será utilizado, o complexo ferro-transferrina se liga ao receptor (uma glicoproteína) e o complexo transferrina-ferro-receptor é interiorizado por endocitose. A ligação ocorre em depressões

na superfície da célula. Durante a endocitose, as depressões se transformam em vesículas (receptossomas), dentro das quais as enzimas lisossomais liberam o Fe^{3+} e a apotransferrina (molécula sem ferro), que é levada de volta à superfície da célula retornando em seguida à circulação, para continuar com seu ciclo. Este processo ocorre em todas as células do organismo, principalmente nas células da medula óssea (síntese de hemoglobina), dentro dos eritrócitos, o ferro se une a protoporfirina nas mitocôndrias. Ressalte-se que a maior parte do complexo transferrina ferro plasmático é usado nos eritrócitos. Pequenas quantidades de ferro são distribuídas a outras células, para formação de mioglobina, citocromos, peroxidases ou outras proteínas funcionais que contêm ferro. Uma menor quantidade é utilizada em outros locais, como no parênquima hepático, onde é armazenado como ferritina. Quando o acúmulo de ferro aumenta, a ferritina se transforma em hemossiderina. A ferritina armazena mais de 50% do total de ferro do organismo, principalmente no fígado, baço e medula óssea. Os seus níveis aumentam quando o armazenamento de ferro está elevado (DE ANGELIS e CTENAS, 1993; FAIRBANKS, 1994).

2.1.3.3. Absorção do Ferro Heme

Heme é solúvel no ambiente alcalino, conseqüentemente nenhuma proteína ligante é necessária para sua absorção no lúmen intestinal (BEARD e DAWSON, 1997).

O ferro heme é absorvido por um mecanismo diferente do descrito acima para ferro não heme. A maioria do ferro heme é ingerido na forma de hemoglobina e mioglobina. O heme pode ser absorvido intacto (como metaloporfirina) diretamente pelas células da mucosa, após remoção da globina pelas enzimas proteolíticas gástrica e duodenais ou a porção protéica pode ser removida no epitélio da mucosa. Uma vez dentro da célula, o ferro é liberado do heme provavelmente pela enzima heme-oxigenase, formando Fe^{2+} e protoporfirina e, a partir de então é processado de maneira análoga ao ferro não heme. O ferro atravessa a célula para ser liberado no plasma como Fe^{3+} (FAIRBANKS, 1994; BEARD e DAWSON, 1997; HURRELL, 1997a; HURRELL, 1997b).

Apenas uma pequena porção do ferro heme que entra na célula chega até a veia porta como ferro heme. A absorção do ferro heme é aumentada na deficiência de ferro. A absorção não é aumentada pelo ácido ascórbico nem é reduzida por substâncias como o fitato. Sua absorção é ligeiramente inibida pela administração simultânea de ferro inorgânico e ferro não heme (FAIRBANKS, 1994).

2.1.4. Regulação da absorção

O corpo regula a homeostase do ferro controlando a absorção e não modificando a excreção como acontece com a maioria dos outros metais. (HURRELL, 1997a).

O mecanismo regulador que influencia a absorção férrea apesar da procura intensiva não tem sido identificado completamente. Mas parecem ser importantes na regulação da absorção fatores relacionados com a mucosa intestinal, fatores somáticos e fatores intraluminais (DE ANGELIS e CTENAS, 1993; FAIRBANKS, 1994; BEARD e DAWSON, 1997).

Como foi previamente mencionado, a maior parte da absorção férrea acontece no duodeno e jejuno superior. O enterócito então teria o papel principal na absorção de ferro, mas a regulação é ainda controversa. A absorção do ferro está regulada pelas *características da mucosa*. As células da mucosa parecem estar condicionadas à quantidade de ferro liberada pela dieta, ocorrendo uma redução da absorção frente a elevadas concentrações do ferro na alimentação. A regulação da absorção do ferro não heme parece ser controlada pelos locais de absorção da borda em escova do lúmen, enquanto que a regulação da absorção do ferro heme parece residir no mecanismo transcelular e nos locais de transferência da membrana basolateral (DE ANGELIS e CTENAS, 1993; BAYNES e STIPANUK, 2000). Estas áreas também se adaptam durante a deficiência férrea para promover a absorção, sendo importante a superfície de absorção. Por conseguinte, a remoção cirúrgica de qualquer parte do duodeno ou jejuno superior ou fatores que estimulem modificações do enterócito como a presença de células epiteliais defeituosas diminuem a absorção. Desordens clínicas que afetam a absorção férrea a este nível incluem síndromes de má absorção como esteatorréia e

espru tropical (DE ANGELIS e CTENAS, 1993; BEARD e DAWSON, 1997; BENITO e MILLER, 1998).

A regulação da absorção do ferro envolve também *fatores somáticos* que alertam ao enterócito sobre a necessidade da absorção férrea. É claro que o estado férreo de um indivíduo está relacionado inversamente com a quantidade de ferro absorvida. Recentes investigações mostraram que a deficiência de ferro é o indutor somático mais potente da absorção de ferro heme e não heme, sendo o mecanismo desconhecido. Um possível fator que estaria contribuindo é a heme oxigenase intestinal que é ativada por deficiência férrea somática (BEARD e DAWSON, 1997). Existe então um aumento da absorção durante a deficiência férrea, em hemocromatose, durante a etapa final da gravidez, e quando a eritropoiese é estimulada (após sangramento e hemólise, incluindo eritropoiese ineficaz), como em anemias ou estados de hipoxia, e a absorção é diminuída em sobrecarga de ferro, e em doenças crônicas como artrite reumática (DE ANGELIS e CTENAS, 1993; FAIRBANKS, 1994).

A quantidade de ferro intracelular regula, dentro de certos limites, a quantidade de ferro intraluminal que entra na célula. O ferro nas células epiteliais do intestino pode entrar no corpo de acordo com as necessidades, ou pode permanecer dentro destas células para limitar a absorção e ser eliminado quando as células são descamadas. Um pouco de ferro é incorporado em ferritina nas células da mucosa de pacientes férreo-deficientes, e a absorção é aumentada. Reciprocamente, em indivíduos férreo-adequados, as células da mucosa formadas estão bem abastecidas com ferro, mas contém uma pequena quantidade de apotransferrina; o transporte de ferro no plasma está limitado e o ferro celular é excretado quando a descamação acontece (FAIRBANKS, 1994).

Fatores intraluminais que diminuem a absorção do ferro incluem rápido tempo de trânsito, aquilia, síndrome de má absorção, precipitação em pH alcalino, fatores antinutricionais, presença de outros minerais, ingestão de antiácidos. As secreções gastrintestinais têm uma enorme importância, assim o ácido clorídrico (HCl) solubiliza o ferro férrico, facilitando sua absorção; a bile aumenta a absorção do ferro, pela ação de substâncias redutoras; e o bicarbonato, que, secretado pelo pâncreas reduz a absorção do ferro (BIANCHI et al., 1992; DE ANGELIS e CTENAS, 1993; FAIRBANKS, 1994).

2.1.5. Fatores dietéticos e biodisponibilidade

A quantidade de ferro nos alimentos não reflete necessariamente sua absorção pelo intestino humano e sua biodisponibilidade para o organismo. Por exemplo, enquanto o ferro hemínico é absorvido ao redor de 20 a 30%, o ferro não-hemínico contido nos cereais e leguminosas é absorvido em quantidade inferior a 5% (VANNUCCHI, et al., 1992).

A forma orgânica, denominada ferro heme, está presente em tecidos animais e as formas inorgânicas ou ferro não heme, estão presentes em tecidos animais como também em todos os vegetais que contêm ferro (CARPENTER e MAHONEY, 1992). O ferro heme tem elevada absorção e não é influenciado pelos fatores que interferem na absorção do não-hemínico, como a ionização e a capacidade de se ligar a outras substâncias (DE ANGELIS e CTENAS, 1993).

Entre os fatores dietéticos, o ácido ascórbico e a carne são os *estimuladores* da biodisponibilidade do ferro não-heme mais importantes. O aumento do efeito positivo do ácido ascórbico, que pode estar presente de forma natural nos alimentos ou ser adicionado como cristais durante o processamento é dose-dependente, mas a natureza desta relação é afetada pela composição da refeição. A presença de ácido ascórbico pode aumentar a absorção do ferro não heme em até seis vezes. O ácido ascórbico pode ser oxidado durante o processamento, armazenamento ou durante a cocção dos alimentos, perdendo seu poder positivo na absorção do ferro. Age principalmente de duas formas: como agente redutor, reduzindo o ferro da forma férrica para a forma ferrosa, solúvel, prevenindo a formação do hidróxido férrico, insolúvel; além de manter sua solubilidade no meio alcalino do intestino delgado superior, o ácido ascórbico aumenta o transporte de ferro através da membrana do enterócito e, como agente quelador, na liberação do complexo ferro-transferrina e na formação de quelato com ferro férrico em pH ácido, que permanece solúvel no meio alcalino do intestino delgado (DE ANGELIS e CTENAS, 1993; HURRELL, 1997b; BENITO e MILLER, 1998).

Muitos estudos confirmam o efeito positivo de tecidos musculares na absorção do ferro não-hemínico, especialmente de alimentos que contêm

fatores inibidores, como feijão e milho (DE ANGELIS e CTENAS, 1993). O nível alto de cisteína das proteínas do tecido animal seria a causa do efeito promotor na absorção (HURRELL, 1997a). As proteínas miofibrilares actina e miosina contêm um número significativo de resíduos de cisteína por molécula, e é possível que estas proteínas proporcionem lugares de união ao ferro no trato gastrointestinal de maneira que permanece solúvel. O potencial para quelar o ferro e reduzir o ferro férrico à forma ferrosa mais solúvel poderia explicar o aumento da absorção que exerce cisteína, além disto a estimulação da secreção do suco gástrico induzida pela carne e o tempo que tarda em alcançar um pH menor que 3, é significativamente menor que com outro tipo de proteínas (HURRELL, 1997a, MARTINEZ, et al., 1999).

A frutose forma quelato solúvel com o ferro, aumentando sua absorção. Durante seu metabolismo na célula intestinal, frutose origina piruvato e lactato, ambos promotores da absorção de ferro (HAZELL, 1985).

O ácido fítico está extensamente presente nos grãos em cereais e sementes de legumes e é o fator principal na baixa biodisponibilidade de ferro destes alimentos. Está acumulado na porção externa do grão de trigo e é significativamente reduzido durante a moagem (HURRELL, 1997a; BENITO e MILLER, 1998). O ácido fítico (hexafosfato de inositol) e as pectinas abundantes em frutos são capazes de reduzir a absorção intestinal do ferro formando complexos insolúveis (MARTINEZ, et al., 1999).

Um outro grupo que influencia negativamente a biodisponibilidade do ferro são os compostos fenólicos: flavonóides, ácidos fenólicos, polifenóis e taninos. Estes são particularmente altos em bebidas como chá, café, chás de erva, cacau e vinho tinto. A interferência na absorção de ferro pelos compostos fenólicos é provavelmente causada pela formação do complexo ferro fenólico no lúmen do trato gastrointestinal, tornando o ferro menos biodisponível para a absorção (DE ANGELIS e CTENAS, 1993; HURRELL, 1997a; BENITO e MILLER, 1998).

Os estudos confirmaram que a proteína de soja, albumina de ovo e caseína são importantes inibidores da absorção férrea. O efeito inibitório da proteína de soja pode ser devido à formação conglicina (7s) durante a digestão, fração que liga o ferro. O efeito inibitório da caseína poderia ser atribuído à presença do complexo caseína-fosfopeptídeos no processo

digestivo que liga o ferro formando um composto insolúvel (HURRELL, 1997a; HURRELL, 1997b). A maior parte do ferro do ovo encontra-se na gema, ligado fortemente a uma proteína chamada fosvitina, razão da baixa biodisponibilidade desse mineral no ovo. A fosvitina também reduz a absorção do ferro de outros alimentos presentes na refeição (MILLER e McNEAL, 1983; HAZELL, 1985; MARTINEZ, et al., 1999).

O cálcio inibe a absorção do ferro heme e não-heme. Parece interferir na transferência destes dois tipos de ferro através de uma via intracelular comum para ambos elementos (MARTINEZ, et al., 1999).

2.1.6. Armazenamento

Quando a quantidade excede às necessidades, o ferro é armazenado intracelularmente como ferritina e hemossiderina, principalmente nos macrófagos (retículo endotelial) do fígado, baço, medula óssea e outros órgãos. Ferritina é a forma básica de armazenamento da molécula de ferro, hemossiderina parece resultar da agregação parcial de ferritina, despojada de seu componente protéico (FAIRBANKS, 1994).

Hemossiderina é tradicionalmente diferenciada de ferritina pela solubilidade desta última em meio aquoso e a insolubilidade de hemossiderina. Quimicamente, elas diferem em que hemossiderina contém ligeiramente mais ferro (perto do 30% por peso) que ferritina. Imunologicamente parecem ser idênticas. No fígado e baço de animais normais, existe uma quantidade um pouco maior de ferritina do que de hemossiderina. Com o aumento das concentrações de ferro tisular, essa relação é invertida. O ferro de ambas formas pode ser mobilizado para síntese de hemoglobina, em casos de necessidade (FAIRBANKS, 1994).

2.1.7. Excreção

O corpo tem uma limitada capacidade para excretar ferro. A perda férrea pode variar consideravelmente com o sexo do indivíduo. Diariamente a perda de ferro no adulto homem está entre 0,90 e 1,05 mg ou

aproximadamente 0,013 mg/kg do peso do corpo independente de variações climáticas. Esta perda ocorre a partir do trato gastrointestinal, pele e trato urinário. Sendo o trato gastrointestinal a principal rota, 0,6mg/dia, oriundos de esfoliação das células da mucosa (ferritina) e o extravasamento das células vermelhas (hemoglobina) (DE ANGELIS e CTENAS, 1993; FAIRBANKS, 1994; BEARD e DAWSON, 1997).

Nos casos de deficiência férrea estas perdas podem ser reduzidas em 50%, enquanto que na sobrecarga de ferro são aumentadas ligeiramente (BAYNES e STIPANUK, 2000). Na mulher, a perda pela menstruação está estimada em 1,5 mg/dia. Anticoncepcionais reduzem esta perda e dispositivos intrauterinos aumentam. As perdas podem ser aumentadas em indivíduos com úlceras gastrointestinais, parasitas intestinais e hemorragias, administração de corticosteróides, aspirina e drogas antiinflamatórias não esteroidais (BEARD e DAWSON, 1997; BAYNES e STIPANUK, 2000).

2.1.8. Ferro nos eritroblastos – Formação da hemoglobina

Dentro do citosol dos eritroblastos o ferro é transportado à mitocôndria para ser incorporado ao heme ou à ferritina. No interior da mitocôndria, o ferro é inserido dentro da molécula de protoporfirina (constituída por quatro núcleos pirrólicos formados a partir da ligação de succinil-CoA com a glicina) formando o heme, em uma reação catalisada pela enzima heme sintetase. A inibição da liberação do ferro da transferrina, feita pelo heme, é um importante mecanismo de controle da taxa de síntese de hemoglobina dentro do eritroblasto. Cada molécula heme combina-se com uma longa cadeia polipeptídica, chamada globina, sintetizada pelos ribossomos, formando uma subunidade de hemoglobina (FAIRBANKS, 1994; GUYTON e HALL, 1997). Cada cadeia tem um peso molecular de 16.000, aproximadamente; quatro delas se unem fracamente para formar a molécula total de hemoglobina. A forma de hemoglobina mais encontrada no homem adulto é a hemoglobina A, que é a combinação de duas cadeias alfa e duas cadeias beta (GUYTON e HALL, 1997).

O ferro se encontra estabilizado no estado ferroso, o que permite que possa se unir de forma reversível ao oxigênio, sendo que oito átomos de

oxigênio podem ser transportados por cada molécula de hemoglobina (GUYTON e HALL, 1997; MARTINEZ, et al., 1999).

A quantidade de ferro usada para produção de hemoglobina em um adulto normal é de cerca de 20 a 25 mg/dia. Em condições de estimulação máxima, a medula óssea pode aumentar em até seis vezes sua capacidade de síntese (FAIRBANKS, 1994).

A maneira como o organismo conserva e reutiliza o ferro é uma importante característica do metabolismo desse mineral. Mais de 90% do ferro da hemoglobina é repetidamente reciclado. A hemoglobina possui uma vida média de 120 dias, passado este período, o mecanismo de reciclagem é feito através da fagocitose dos eritrócitos velhos (FAIRBANKS, 1994). A hemoglobina liberada das hemácias, quando elas se rompem, é quase que imediatamente fagocitada por macrófagos em muitas partes do organismo, mas principalmente no fígado (células de Kupffer), baço e medula óssea. Durante as horas e até dias seguintes, os macrófagos liberam o ferro da hemoglobina de volta para o sangue, a fim de ser transportado pela transferrina para a medula óssea, para a produção de novas hemácias, ou para o fígado e outros tecidos para estoque na forma de ferritina. A porção porfirina da molécula de hemoglobina é convertida pelos macrófagos, através de uma série de etapas, no pigmento biliar bilirrubina, que é liberada para o sangue e, mais tarde, secretada pelo fígado na bile (GUYTON e HALL, 1997).

2.1.9. Deficiência – Anemia ferropriva

A deficiência de ferro ocorre quando a quantidade de ferro total do organismo está diminuída. A deficiência pode ser causada por ingestão inadequada, absorção deficiente, perda sangüínea crônica ou aumento das necessidades, como na infância, adolescência, e gravidez. Geralmente, a deficiência de ferro é caracterizada por três estágios, cada um mudando gradativamente para o outro, de acordo com a gravidade da deficiência (CARPENTER e MAHONEY, 1992; FAIRBANKS, 1994; LYNCH e BAYNES, 1996; BEARD e DAWSON, 1997; SIMÕES, et al., 1999):

- a) Depleção de ferro: Decréscimo das reservas de ferro no fígado, baço, medula óssea (baixos níveis de ferritina e hemossiderina), pequeno aumento da transferrina livre e valores normais de hemoglobina.
- b) Eritropoiese deficiente: O nível de saturação de transferrina cai e torna-se insuficiente para a manutenção de uma taxa ótima de eritropoiese; a concentração de protoporfirina dos eritrócitos torna-se elevada, indicando um desequilíbrio entre a produção de protoporfirina e o suprimento intracelular de ferro. Contudo, o suprimento de ferro ainda é suficiente para manter 95% do nível normal de hemoglobina.
- c) Anemia ferropriva: o terceiro estágio é caracterizado pelo esgotamento total das reservas de ferro, levando a uma produção insuficiente de hemoglobina, com o desenvolvimento de anemia microcítica e hipocrômica.

A deficiência de ferro vai se estabelecendo lentamente, sendo o parâmetro mais sensível para o diagnóstico a ferritina plasmática, pois é ela que avalia a quantidade de ferro armazenada. A anemia é estabelecida quando o número e o tamanho dos glóbulos vermelhos, assim como a quantidade de hemoglobina, estão modificados em relação ao normal e no caso de anemia ferropriva caracterizada por ser microcítica e hipocrômica. Porém, outras causas como a deficiência de cobre pode levar igualmente a este quadro (DE ANGELIS e CTENAS, 1993).

A maioria dos sintomas comuns em anemias são: cansaço, fadiga, palidez, diminuição da capacidade de trabalho físico, alteração da termorregulação e menor capacidade de concentração. O tempo de restabelecimento das funções cardiorespiratórias normais em indivíduos anêmicos, após o esforço, é prolongado. Sintomas gastrointestinais como falta de apetite, flatulência, incômodo epigástrico, náuseas, vômitos, constipação ou diarreia são comuns (FAIRBANKS, 1994; MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998). Também se observa uma diminuição do sistema imune. Em crianças, esta depleção é normalmente o resultado do crescimento rápido associado com perdas de sangue e inadequada ingestão de ferro. Fatores de alto risco para desenvolver a anemia por deficiência férrea incluem rápida introdução de leite de vaca na alimentação do infante, consumo de fórmulas não fortificadas com

ferro, baixo peso de nascimento, e nascimento prematuro (GUPTA et al., 1999).

Deficiência férrea materna foi associada com retardamento de desenvolvimento fetal em animais experimentais. Em humanos, risco aumentado de nascimento prematuro, baixo peso ao nascer, e morbidez infantil foram encontrados em estudos de mães com deficiência de ferro. A etiologia destas complicações é desconhecida, embora a absorção de fetotoxinas como também cádmio (e provavelmente chumbo) é aumentada em mulheres grávidas (BEARD e DAWSON, 1997).

Mesmo em discretas deficiências de ferro, ocorre depleção de várias enzimas ferro-dependentes no organismo, sendo que o grau varia de acordo com o tipo de enzima (FAIRBANKS, 1994).

2.1.10. Toxicidade

O ferro pode ser extremamente tóxico se ingerido em altas doses. A toxicidade do ferro também pode surgir por causa da absorção crônica ou acumulação de ferro em quantias que excedem o transporte de ferro normal e o mecanismo de armazenamento. Esta situação acontece durante a hemocromatose primária, uma desordem genética relativamente comum que consiste na deposição exagerada de ferro em certos tecidos causando dano às células principalmente no fígado (BEARD e DAWSON, 1997).

Muitas pesquisas indicam que o ferro sob certas condições tem um papel principal na patogênese de numerosas doenças. As reações com o ferro estão intimamente relacionadas com a transferência de elétrons isolados e, por isso, acontece a formação de radicais livres, os quais podem promover peroxidação lipídica, danos às moléculas do ácido desoxirribonucleico (DNA), formação de tumores, desordens hepáticas, neuromusculares, intestinais, artrite e formação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada, que é potencialmente aterogênica. O ferro catalisa tanto o estágio de iniciação como o de propagação da peroxidação lipídica. A fim de evitar a toxicidade do ferro livre, potencialmente todas as células vivas possuem um mecanismo para transporte e armazenamento intracelular do excesso de ferro, em uma forma

não tóxica (FIELDS, et al., 1993; DE ANGELIS e CTENAS, 1993; MILLER, 1996).

2.2. Importância do Cobre na Nutrição Humana

2.2.1. Propriedades Químicas

O cobre nutricionalmente essencial, tem dois estados de oxidação, Cu^{1+} e Cu^{2+} , e pode trocar de uma valência a outra durante a ação enzimática. Raramente existe como Cu^{3+} , altamente instável e é de significado biológico questionável. O Cu^{1+} é instável em solução sendo altamente insolúvel, fortemente complexado e oxidado prontamente por O_2 a Cu^{2+} . O Cobre é encontrado freqüentemente nos sistemas biológicos como Cu^{2+} (TURNLUND, 1994; HARRIS, 1997).

2.2.2. Cobre nos alimentos

As fontes mais ricas de cobre são crustáceos e moluscos, especialmente ostras, e as carnes de órgãos, como fígado de boi, seguidos por nozes, legumes, farelo de trigo, girassol, vinho seco, chocolate, cogumelos, caju, frutas secas. Tomate, bananas, uvas e batatas têm quantidades intermediárias. As fontes mais pobres são e queijo, leite de vaca, açúcar branco, e mel que raramente contêm mais que 0,5 ppm de cobre. Outras frutas, ovos, carne de boi, carne de carneiro, muitos peixes, pão branco ou integral, e muitos cereais matinais são também fontes relativamente pobres (UNDERWOOD, 1977; DICHÍ e BURINI, 1991; TURNLUND, 1994; HARRIS, 1997).

As melhores fontes de cobre na alimentação brasileira são: fígado de boi, feijão e algumas frutas, por exemplo, manga, kiwi, banana e goiaba (FERREIRA, 1999).

2.2.3. Metabolismo

2.2.3.1. Absorção

De 1 a 2 mg de cobre ingeridos diariamente, só a metade aproximadamente é absorvida. A maioria do cobre na dieta está ligado e são as secreções do estômago que o dissocia permitindo a sua absorção em pequenas quantidades ainda neste órgão. Porém, a maior porção passa ao duodeno e jejuno, onde a absorção principal acontece. Devido ao fato da alcalinidade do intestino trabalhar contra a solubilidade, o cobre deve se complexar com aminoácidos, ácidos orgânicos, ou outros quelantes para permanecer solúvel nesta região da área intestinal sendo, portanto, o pH crucial para a eficiente absorção deste mineral (TURNLUND, 1994; HARRIS, 1997; PEDROSA e COZZOLINO, 1999).

Quando os níveis de cobre na dieta são baixos, a absorção é devida, provavelmente, a um mecanismo de transporte ativo, e quando os níveis são altos a difusão passiva é importante. Desta forma, percebe-se que o nível de cobre na dieta influencia fortemente a absorção que pode ser regulada pelas necessidades de cobre e com metalotioneína envolvida neste processo (TURNLUND, 1994).

Metalotioneína é uma proteína de baixo peso molecular com grande afinidade por metais divalentes semelhantes incluindo Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} e Cd^{2+} . Muitas pesquisas desenvolvidas indicam que doses altas de zinco aumentam o conteúdo na mucosa de enxofre formando a proteína tioneína. Zinco parece operar ao nível de regulação de expressão genética de tioneína e age para aumentar a produção de seu mRNA. Ao cessar a provisão de cobre na dieta e a reserva de cobre do corpo se ligar a metalotioneína a depleção de cobre pode resultar (SOLOMONS, 1988). Metalotioneína liga o cobre mais fortemente que o zinco, sendo o zinco substituído por cobre. De acordo com este conceito, cobre de metalotioneína é excretado sem ser absorvido e se reduz a absorção de cobre (HALL, 1979). Concentrações altas de metalotioneína no intestino oferece proteção contra sobrecarga de cobre acidental e assim protege o organismo contra a toxicidade do cobre (HARRIS, 1997).

Durante o processo de absorção *in vivo*, o cobre pode ser colocado em compartimentos para não contatar metalotioneína; os íons podem interagir no local de absorção do lúmen intestinal (REEVES, et al., 1993a).

O mecanismo da interação de ácido ascórbico e cobre não está completamente elucidado. Porém, acredita-se que níveis altos de ácido ascórbico reduzem Cu^{2+} para Cu^{1+} que se absorve menos, sendo a fase inicial de absorção prejudicada (VAN CAMPEN e GROSS, 1968).

Forma química, estado de valência, e concentrações relativas de outros metais determinam a quantidade absorvida. Fibras de frutas e hortaliças como também fitatos de grãos prejudicam a absorção intestinal de cobre, mas isto apresenta controvérsia (DICHI, 1991; HARRIS, 1997).

Fatores endógenos e alguns componentes dietéticos influenciam de formas distintas a captação de cobre pelo lúmen intestinal. As proteínas, D e L –aminoácidos, citrato e fosfatos aumentam esta captação (PEDROSA e COZZOLINO, 1999).

O tipo de carboidrato da dieta constitui também um fator importante na utilização do cobre, sendo a frutose o mais investigado, principalmente em estudos de deficiência deste mineral (REISER *et al.*, 1983; FIELDS *et al.*, 1984a).

2.2.3.2. Transporte

O cobre absorvido é transportado do intestino ligado principalmente à albumina, transcupreína, e ligantes de baixo peso molecular (alguns complexos de aminoácidos, especialmente cistina e histidina). A maioria é levado ao fígado e uma pequena quantidade aos rins, onde é provavelmente filtrado pelos glomérulos e reabsorvido nos túbulos, sendo só um pouco de cobre excretado na urina; o papel do cobre nos rins é desconhecido (DICHI, 1991; TURNLUND, 1994).

A captação hepática de cobre ocorre por processo de saturação, e no fígado a maior parte do cobre é convertido em *ceruloplasmina* que constitui 90% do *pool* de cobre do plasma (PEDROSA E COZZOLINO, 1999). Ceruloplasmina é sua proteína de transporte, sendo seu papel considerado

análogo ao de transferrina, a proteína de transporte férrea (TURNLUND, 1994; HARRIS, 1997).

O cobre é liberado do fígado ao sangue ligado a ceruloplasmina (TURNLUND, 1994). No transporte de cobre, ceruloplasmina reconhece receptores na superfície de membrana das células do plasma, em tecidos e em órgãos (HARRIS, 1991) ligando-se a estes receptores; o cobre é reduzido de íon cúprico (Cu^{2+}) a cuproso (Cu^{1+}) na superfície da membrana, dissociado de ceruloplasmina e liberado nas células (TURNLUND, 1994; PEDROSA e COZZOLINO, 1997). A proteína não penetra, um mecanismo que difere da endocitose usada por transferrina. O desacoplamento de cobre da proteína requer um agente redutor exógeno e possivelmente uma mudança de conformação na estrutura tridimensional de ceruloplasmina, permitindo ao cobre como íon livre entrar, provavelmente complexado com a membrana ou com um agente interno de ligação do cobre (HARRIS, 1997).

2.2.3.3. Excreção

A principal rota de excreção do cobre é através da bile, no trato gastrointestinal. Pouco deste cobre é reabsorvido. A origem do cobre biliar continua sendo indefinível. A excreção biliar é um processo saturável que procede contra um gradiente de concentração (TURNLUND, 1994; HARRIS, 1997). O cobre biliar combina-se com uma pequena quantidade de cobre das células intestinais, pancreáticas e de fluidos intestinais, e com cobre dietético não absorvido sendo eliminado então nas fezes. A excreção biliar do cobre parece ser outro ponto de regulação no controle da homeostase na retenção de cobre. Animais e humanos aumentam a excreção endógena de cobre quando a dieta tem elevada concentração, diminuindo a excreção durante deficiência de cobre ou quando cobre dietético é baixo. A regulação homeostática de absorção e excreção de cobre protege contra deficiência e toxicidade de cobre. Existem outras rotas de excreção de menor importância. Os humanos saudáveis excretam apenas de 0,2 a 0,5 μmol (10 a 30 μg) de cobre na urina, mas as perdas urinárias podem aumentar notadamente em algumas condições, como no caso da presença de defeitos tubulares renais (TURNLUND, 1994).

2.2.4. Toxicidade

Sob condições de um consumo excessivo e crônico de cobre, a toxicidade só acontece quando a capacidade do fígado para ligar e seqüestrar o cobre é excedida. A quantidade de cobre dietético exigido para causar toxicidade não é ainda completamente estabelecida, mas se tem observado moléstias gastrointestinais com consumos de pelo menos 5 mg de cobre por dia. As conseqüências da toxicidade de cobre são dor epigástrica, náusea, vômito, diarreia, fraqueza, falta de concentração, e anorexia nas primeiras fases da intoxicação, que podem progredir a coma, oligúria, necrose hepática, colapso vascular, e morte (TURNLUND, 1994; FLEET, 2000).

As duas alterações mais conhecidas no metabolismo de cobre em humanos são a doença de Menkes e a doença de Wilson. A doença de Menkes (síndrome de cabelo de aço) é uma doença genética que envolve retardamento mental e morte antes dos 3 anos de idade. Basicamente existe um defeito na absorção de cobre pelo intestino, em vez de passar à circulação sangüínea o cobre é acumulado nas células da mucosa intestinal (BRODY, 1994; TURNLUND, 1994).

A doença de Wilson é uma expressão de um erro congênito no metabolismo de cobre que afeta a homeostase deste mineral. A anormalidade é herdada como uma característica recessiva que ocorre em qualquer sexo, em adolescentes e em adultos jovens, mas raramente em crianças. A doença resulta de defeitos no transporte de cobre. Esta anormalidade genética conduz a uma excessiva acumulação de cobre no fígado, cérebro, rins e córnea, junto com um baixo nível de ceruloplasmina no soro, altos níveis de cobre no soro não ligado a ceruloplasmina, aumento urinário de cobre e diminuição do cobre fecal. O progresso da enfermidade pode ser controlado por administração de agentes quelantes do mineral, que levem o cobre dos tecidos. A mais utilizada é a penicilamina, que pode ser administrada oralmente. Depois de um tratamento inicial com esta droga a doença pode ser tratada com zinco, que diminui a absorção de cobre (UNDERWOOD, 1977; BRODY, 1994; TURNLUND, 1994).

2.2.5. Bases bioquímicas da deficiência de cobre

O cobre livre não é encontrado em grandes quantidades no corpo humano. Ao contrário, quase todo o cobre no nosso corpo está ligado a proteínas de transporte (ceruloplasmina e cobre-albumina), proteínas de armazenamento (metalotioneína), ou enzimas que contêm cobre. O cobre é essencial para o funcionamento destas enzimas cobre-dependentes, as principais enzimas e suas funções estão resumidas no Quadro 2.

Quadro 2- Principais cuproenzimas e suas funções

Enzima	Função
Citocromo c oxidase	Produção de energia, fosforilação oxidativa.
Superóxido desmutase	Proteção antioxidante, inativação de radicais livres.
Tirosinase	Formação de melanina, pigmento do cabelo e pele.
Dopamine α -hidroxilase	Produção de catecolaminas, formação de neurotransmissor norepinefrina.
Lisil oxidase	Formação de colágeno e de elastina.
Fator V da coagulação	Mecanismo de coagulação.
Ceruloplasmina	Proteção antioxidante, metabolismo do ferro e transporte de cobre.
Metalotioneína	Armazenamento de cobre.
Amina oxidase	Desaminação oxidativa.
Neurocupreína	Modulação da atividade da monoxigenase.

Fonte: Adaptado de PEDROSA e COZZOLINO, 1999 e SAARI, et al., 1995

Bioquimicamente, a maioria de cuproenzimas pertence à classe de oxidases que são enzimas que catalisam a transferência de elétrons de um substrato para o oxigênio molecular. Porém, funções não-enzimáticas como liberação neurohormonal, transporte de oxigênio, e a regulação da expressão genética, também precisam de cobre (HARRIS, 1997).

Ceruloplasmina tem sido estudada extensivamente por seu papel em oxidações biológicas (oxidação de aminas aromáticas, fenóis e outras substâncias incluindo ferro ferroso), funções antioxidantes e distribuição do cobre nos tecidos. O tamanho grande da proteína previne a sua perda no filtrado glomerular e desta forma a perda do cobre ligado na urina. Contém 6 átomos de cobre, a metade está no estado cúprico e o resto no estado cuproso (O'DELL, 1976; BRODY, 1994; TURNLUND, 1994; HARRIS, 1997).

2.2.5.1. Interação do cobre no metabolismo do ferro

O papel do cobre no metabolismo do ferro é variado e extenso (HARRIS, 1997). A primeira investigação que conduziu ao reconhecimento do cobre como um nutriente essencial foi na tentativa de identificar a causa de anemia ferro-resistente em animais de laboratório. Neste estudo, a anemia de ratos alimentados com uma dieta de leite integral, suplementada com ferro, foi curada alimentando os animais com cobre (HART, 1928). Estudos posteriores mostraram que reticulócitos de suínos cobre-deficientes assimilaram pobremente o ferro e apresentaram dificuldade na síntese heme (WILLIAMS, et al., 1976). Uma condição anêmica prevalente em crianças peruanas revelou ser provocada por uma quantidade restrita de cobre na dieta (CORDANO e GRAHAM, 1966). Estes dados mostram claramente que animais e humanos necessitam cobre para utilizar ferro (HARRIS, 1997).

A anemia observada em ratos cobre-deficientes e suínos foi hipocrômica e microcítica com hiperplasia normoblástica da medula óssea, hipoferremia e aumento do ferro ligado ao plasma (SMITH et al., 1944; LAHEY et al., 1952; SAARI, et al., 1995). Estas mudanças foram iguais às observadas na deficiência de ferro, e as semelhanças morfológicas e bioquímicas entre estes dois estados de deficiência sugerem que a anemia por deficiência de cobre foi o resultado de um defeito no metabolismo do ferro (GUBLER, 1952). A participação do cobre na anemia poderia ocorrer na mobilização do ferro tecidual, na formação do heme mitocondrial e diminuindo a sobrevivência das hemácias (DICI, 1991).

A hipótese da função ferroxidase de ceruloplasmina, enunciada primeiro na metade dos anos 60, foi a primeira tentativa para unir o metabolismo férreo

com as funções biológicas do cobre (HARRIS, 1995a). Pesquisas desenvolvidas evidenciam que ceruloplasmina está envolvida no metabolismo do ferro, sendo sugerido também que esta proteína e ferritina trabalham juntas para reduzir os níveis de ferro ferroso no plasma inibindo a peroxidação lipídica (BRODY, 1994; PEDROSA e COZZOLINO, 1999). A oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} , realizada por ceruloplasmina, é indispensável para a ligação do ferro com a proteína transportadora transferrina, sendo posteriormente entregue às células para ser utilizado em diferentes processos como na síntese heme nos órgãos eritropoiéticos (FLEET, 2000).

Proponentes da hipótese de ferroxidase consideram a ceruloplasmina indispensável para a mobilização e distribuição do ferro nos tecidos. É importante mencionar que alguns pesquisadores se opõem a este argumento por considerar que a oxidação espontânea do ferro é tão rápida que a presença de uma enzima não serviria para algum propósito útil, fundamentando este argumento no fato que pacientes com a doença de Wilson raramente sofrem de anemia, apesar de ter em níveis baixos ou inexistentes de ceruloplasmina no soro (HARRIS, 1995a).

Recentes investigações identificaram indivíduos com falta de habilidade para produzir ceruloplasmina (aceruloplasminêmicos) (FLEET, 2000). A deficiência hereditária de ceruloplasmina com hemossiderose (aceruloplasminemia) é uma desordem recessiva autossômica no metabolismo do cobre-ferro devido a mutações no gene da ceruloplasmina. Estudo realizado em mulheres de 59 anos com esta doença exibiram uma tríade clínica; diabetes mellitus, degeneração da retina e distúrbios neurológicos. A biópsia do fígado revelou excessivo armazenamento do ferro nos hepatócitos e por ressonância magnética do cérebro se observou aumento do conteúdo do ferro (HARRIS, 1998; YAZAKI, et al., 1998). Outra pesquisa sobre esta doença revelou também um incremento na peroxidação lipídica no plasma (MIYAJIMA, et al., 1996).

Outra enzima cobre dependente, Citocromo c oxidase desempenha uma função importante no metabolismo intracelular do ferro que parece estar evidenciada por seu papel no sistema de transferência de elétrons (WILLIAMS, et al., 1976). Assim, se observa um defeito na utilização do ferro pela mitocôndria deficiente em cobre (DICI e BURINI, 1991).

Há evidências de que a deficiência de cobre diminui a vida média das hemácias o que poderia ser por uma peroxidação lipídica da membrana dos glóbulos vermelhos provocada pela acumulação de radicais livres ante uma escassa atividade da superóxido desmutase. A fragilidade osmótica diminuída e aumento da viscosidade das hemácias (pela existência de uniões cruzadas entre os componentes da membrana) poderiam justificar a menor sobrevivência destas células e contribuir para a anemia na deficiência de cobre (DICHÍ e BURINI, 1991; O'DELL, 1991; SAARI, 1995).

O aparecimento da anemia pode ocorrer tanto em situações com excesso como em deficiência de cobre. O mecanismo preciso pelo qual o excesso de íons cobre causa anemia hemolítica não é conhecido, sendo a peroxidação lipídica sugerida como um provável mecanismo (DICHÍ e BURINI, 1991).

2.2.5.2. Sistema Cardiovascular

A deficiência de cobre na dieta causa uma diversidade de alterações cardiovasculares. Efeitos sistêmicos incluem pressão alta, intensificação da inflamação, anemia, reduzida coagulação sangüínea e, possivelmente, arteriosclerose. Efeitos em órgãos específicos ou tecidos incluem integridade estrutural debilitada do coração e vasos sangüíneos, deterioração do uso de energia pelo coração, habilidade reduzida do coração para contrair, alteração da habilidade dos vasos sangüíneos para controlar o crescimento de seus diâmetros e alteração na estrutura e função das células sangüíneas circulantes. Em alguns casos, a causa de um defeito pode ser atribuída diretamente a atividade reduzida de uma enzima cobre-dependente específica (SAARI, 2000).

Porém, foram implicados três mecanismos de dano não específicos em defeitos cardiovasculares de deficiência de cobre. Eles são peroxidação, a interação de radicais livres derivados de oxigênio com lipídios e proteínas (possivelmente DNA); glicação (glicosilação não enzimática de proteínas); e nitração (interação do óxido nítrico e seus metabólitos com peptídeos e proteínas). Embora independentemente estes mecanismos apresentem grande potencial para causar prejuízo no organismo, a possibilidade que eles podem interagir é uma razão de extrema preocupação. O fato que pelo menos dois

destes mecanismos estejam associados com diabetes e envelhecimento sugere que a deficiência de cobre possa exacerbar déficits associados com estas duas condições (SAARI, 2000).

Uma revisão da literatura em diabetes, envelhecimento, peroxidação, glicação, e nitração permitiu a formulação de uma hipótese que é representada através da Figura 1 (SAARI, 2000), onde basicamente a partir de uma deficiência em cobre, que provoca como primeiras alterações a diminuição do metabolismo do ferro e da função das enzimas antioxidantes se desencadeiam uma série de reações que provocam alterações no funcionamento normal do organismo.

A porção superior da Figura 1 [vias (1) a (3)] representa os efeitos da deficiência de cobre (*CuD*) que provoca **alteração do metabolismo do ferro (1)** podendo contribuir para a catálise do ferro na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), radicais livres (FIELDS, et al., 1993). A deficiência de cobre causa também a **redução da atividade antioxidante de enzimas cobre-dependentes (2)** permitindo a formação de espécies reativas de oxigênio produzidas pelo metabolismo. Estes dois acontecimentos, 1 e 2, permitem a acumulação de radicais livres, oxigênio-derivados, iniciando-se a peroxidação de lipídios, oxidação de proteínas e dano do DNA (3), causando prejuízo das funções associadas (SAARI, 2000).

A porção mediana da Figura 1 [vias (4) a (10)] sugere como a deficiência de cobre, em grande parte por produção de espécies reativas de oxigênio, pode aumentar a produção de óxido nítrico (NO) e conseqüentemente diminuir a função cardiovascular. Esta produção depende da habilidade das ROS para induzir expressão da iNOS por ativação da transcrição nuclear (4) (RUBBO et al., 1996) e a expressão de iNOS é aumentada em corações cobre-deficientes (Saari e Bode, 1999 citados por SAARI, 2000). Com outros modelos experimentais, tem-se determinado que o óxido nítrico prejudica uma diversidade de funções em decorrência da deficiência de cobre. Por exemplo (5), o óxido nítrico elevado diminui as contrações do coração (BALLIGAND et al., 1993), a função mitocondrial (WOLIN et al., 1997), reduz a coagulação (Wu e Thiagarajan, 1996 citados por SAARI, 2000), aumenta a formação de edema (MAYHAN, 1994) e, altas concentrações, causam dano das células do pâncreas e reduz a produção de insulina (CORBETT et al., 1993). Os

aumentos concomitantes de superóxidos e óxido nítrico podem conduzir a um aumento de peroxinitrito (OONO^-), este poderia causar as patologias atribuídas ao óxido nítrico ou contribuir a peroxidação ou nitratação (6) (BECKMAN e KOPPENOL, 1996).

Talvez o mais insidioso efeito das patologias anteriores associadas com a produção do óxido nítrico elevado é o efeito no pâncreas (7). A elevação de glicose no sangue pode produzir a glicosilação de proteínas (9), fenômeno conhecido que ocorre na deficiência de cobre. Duas notáveis proteínas suscetíveis a glicação são superóxido desmutase e insulina. Os produtos finais da glicosilação avançada aumentam a expressão de iNOS (10) (ROJAS et al., 1996). E finalmente, a glicose pode autooxidar-se (8) (HUNT, et al., 1988).

A mais baixa porção da Figura 1 [vias (11) a (14)] sugere como a deficiência de cobre, em virtude da elevação da peroxidação e glicação, contribui para a redução da vasodilatação dos vasos sanguíneos por interação com o óxido nítrico de processos dependentes. Parte do esquema (11) está baseado nos dados obtidos em pesquisas de deficiência de cobre, ou seja, a interação do óxido nítrico endotelial com superóxidos, produzindo peroxinitritos que interferem com a mobilização de cálcio, todos estes fenômenos finalmente reduzem a vasodilatação dependente do óxido nítrico. Estudos independentes da presença de cobre mostram que o peroxinitrito pode diminuir a vasodilatação (12). Os produtos finais da glicosilação avançada podem eliminar o NO (13) enquanto interagindo com receptores vasculares podem conduzir a patologias vasculares, aterosclerose e diminuição da vasodilatação (SAARI, 2000).

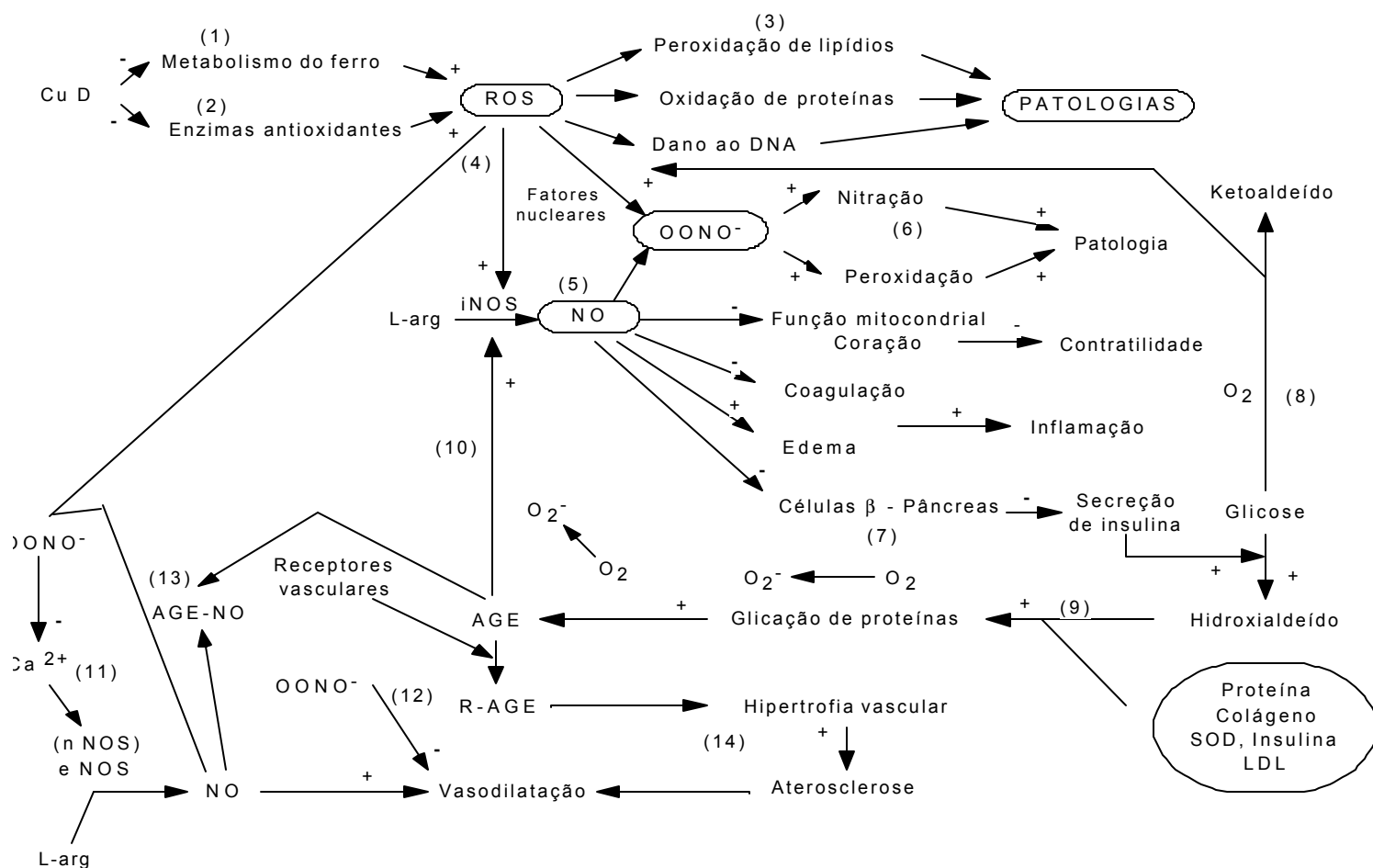


Figura 1 - Relações postuladas entre deficiência de cobre, peroxidação, glicação e respostas mediadas pelo óxido nítrico.

Números em parênteses são pontos de referência para as vias discutidas. Sinais de + e de - indicam se um determinado efeito é aumentado ou reduzido respectivamente pelo processo que precede. Abreviações: CuD, estado de deficiência de cobre; Fe, ferro; ROS, espécies reativas de oxigênio; iNOS, óxido nítrico sintase inducível (ou NOS (2)); NO, óxido nítrico; OONO⁻, peroxinitrito; O₂, oxigênio; O₂⁻, superóxido; Ca⁺⁺, cálcio livre; AGE, produtos finais da glicosilação, avançada; RAGE, receptor - AGE; nNOS, óxido nítrico sintase neural (ou NOS (1)); eNOS, óxido nítrico sintase endotelial (ou NOS (3)); L-arg, L-arginina; SOD, superóxido desmutase; LDL, lipoproteínas de baixa densidade.

Fonte: SAARI, 2000

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde, Pigmentos Naturais e Secagem do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Laboratório de Espectrofotometria de Absorção Atômica do Departamento de Solos, da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Preparo do arroz e do feijão

O arroz polido (*Oryza sativa* L.) e o feijão vermelho (*Phaseolus vulgaris* L.), foram adquiridos no comércio de Viçosa (MG). Ambos foram previamente coccionados: o arroz em panela comum, por cerca de 30 minutos e o feijão, sem remolho, em panela de pressão doméstica, durante 40 minutos. Após o cozimento, foram

secos em estufa de ar circulante (24 h/60°C), sendo, em seguida, moídos em moinho de faca.

3.2. Caracterização físico-química

O teor de proteína, lipídios e fibra para arroz polido e feijão vermelho foram obtidos da literatura (OLIVEIRA, 1997).

3.2.1. Minerais.

3.2.1.1. Oxidação da matéria orgânica e preparo das soluções minerais

Em erlenmeyer de 125 mL foram pesadas com precisão de 0,1 mg ao redor de 1 g de amostra (arroz, feijão, dietas elaboradas), em triplicata, procedendo-se à oxidação da matéria orgânica, por via úmida, por adição de 15 mL de mistura nitroperclórica, na proporção de três partes de ácido nítrico para uma parte de ácido perclórico (ambos ácidos concentrados). Aquecendo em chapa, com exaustão até fervura branda ($\pm 120^{\circ}\text{C}$). Mantendo esta condição, adicionando mais mistura nitroperclórica quando foi necessário até a formação de uma solução límpida. Depois desta digestão, as soluções foram levadas a volume de 25

mL, utilizando-se água deionizada, estando prontas para a determinação mineral (FERREIRA, 1999).

Toda a vidraria utilizada foi lavada em água corrente, deixada de molho de um dia para outro, em solução ácida preparada com HCl e pH < 1,0, depois enxaguada três vezes em água corrente, três vezes em água destilada e três vezes em água deionizada (FERREIRA e GOMES, 1995; FERREIRA, 1999).

3.2.1.2. Determinação dos teores de Minerais

A concentração de ferro e cobre no arroz, feijão e nas dietas foi quantificada analiticamente, nas soluções preparadas, através de espectrofotometria de absorção atômica, em espectrofotômetro GBC 908 AA. Utilizaram-se também curvas de calibração elaboradas com soluções-padrões de concentrações conhecidas, próprias para trabalho em absorção atômica.

3.3. Composição e preparo das dietas elaboradas

A composição das dietas elaboradas está mostrada no Quadro 3.

A dieta controle (C) consistiu de uma adaptação da dieta AIN-93G (REEVES et al., 1993b), sem ferro e sem cobre para a indução da anemia.

As dietas testemunha (T_1) e padrão (T_2 a T_5) foram elaboradas a partir da dieta controle (C) e o $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como fontes de cobre e ferro respectivamente. Na dieta experimental (T_6 a T_9) foi adicionado arroz e feijão na proporção 50:50, provendo esta mistura 25 % da concentração de cobre e o restante de cobre e de ferro completado pela adição de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, respectivamente.

Com exceção da dieta controle que não sofreu adição de ferro e de cobre, as demais foram formuladas com a mesma concentração de ferro (24 ppm) e diferentes níveis de cobre como se indica no Quadro 4. O nível zero visou avaliar o efeito da deficiência de cobre, o nível 6 ppm é o requerido para o rato (REEVES et al., 1993b) e o nível de 12 ppm foi estabelecido para se avaliar possíveis efeitos tóxicos de níveis excessivos de cobre no metabolismo de ferro. O teor de ferro utilizado é suficiente para recuperar o nível de hemoglobina.

Os ingredientes foram misturados em batedeira semi-industrial (LIEME), com baixa rotação, por 30 min. As dietas prontas foram acondicionadas em sacos de polietileno e armazenadas a 10°C. As dietas adicionadas de arroz e feijão tiveram os teores de caseína, óleo de soja e fibra ajustados, de forma que as dietas fossem isoprotéicas e isocalóricas.

Quadro 3- Composição das dietas (g/100 g da mistura)

Dietas	
Controle Padrão	Experimental
Testemunha	

Ingredientes	C, T ₁	T ₂ – T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉
Caseína	20,00	20,00	19,13	18,27	17,40	14,81
Amido dextrinizado	13,20	13,20	13,20	13,20	13,20	13,20
Sacarose	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Óleo de soja	7,00	7,00	6,96	6,92	6,88	6,76
Fibra	5,00	5,00	4,54	4,07	3,61	2,22
Minerais	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Vitaminas	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
L – cistina	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho (q.s.p.)	100	100	100	100	100	100
Arroz	-	-	2,70	5,40	8,11	16,22
Feijão	-	-	2,70	5,40	8,11	16,22

Fonte: Adaptado de REEVES et al., 1993b.

Quadro 4- Níveis de cobre nas dietas elaboradas (ppm)

Dietas	0
Testemunha	T ₁
Padrão	-
Experimental (Arroz + Feijão)	-

3.4. Ensaio biológico para analisar a interação do cobre no metabolismo do ferro

Utilizaram-se 88 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe *Rodentia*), da linhagem Wistar, recém desmamados, pesando entre 70 e 90 gramas.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente de temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luz controladas, em ciclo claro-escuro de 12 horas.

O ensaio foi realizado em duas fases: Fase de depleção e Fase de repleção, segundo metodologia da AOAC (1984).

3.4.1. Fase de depleção

Um grupo de oito animais foi avaliado no início desta fase a fim de se determinar o nível de hemoglobina (Basal I), sendo o sangue coletado, por meio de secção da porção terminal da cauda, por gotejamento.

Durante 22 dias, 80 animais receberam a dieta controle (C) para induzir anemia ferropriva. Esta dieta e água deionizada foram oferecidas *ad libitum*. Os pesos dos animais e seu consumo alimentar foram registrados semanalmente.

Após o período de depleção, de 8 animais escolhidos por sorteio, se determinou o nível de hemoglobina e hematócrito, obtendo-se as amostras de sangue da cauda da mesma forma mencionada anteriormente. Posteriormente estes animais foram submetidos a uma atmosfera de dióxido

de carbono por um tempo adequado que evitou a morte, procedendo-se à incisão das cavidades abdominal e torácica para coleta de sangue por punção cardíaca, utilizando seringas descartáveis de 10 mL para cada animal. Nestas amostras de sangue se analisou ferro sérico e hemoglobina glicosilada. Os dados obtidos destas análises constituíram o Basal II. Dos 72 animais restantes se determinou a concentração da hemoglobina em sangue colhido da cauda, utilizando este resultado para a distribuição dos animais nos tratamentos e para o cálculo final do ganho de hemoglobina.

3.4.2. Fase de repleção

Após a fase de depleção, os 72 animais anêmicos foram subdivididos, em 8 blocos experimentais com 9 animais cada um, de acordo com o peso e concentração de hemoglobina. Os animais foram mantidos em suas respectivas dietas por 15 dias, tempo durante o qual os animais receberam água deionizada *ad libitum*, e ingestão de dieta controlada variando entre 15 e 16 g por dia. Os pesos dos animais foram monitorados semanalmente, bem como a ingestão alimentar, calculando-se assim o ganho de peso e o

coeficiente de eficiência alimentar (CEA
= ganho de peso (g) / consumo
alimentar (g)).

Ao final deste período, foram realizadas novas dosagens de hemoglobina, e hematócrito nos animais como descrito anteriormente com sangue colhido da cauda. Foi calculado então o ganho de hemoglobina pela diferença entre os valores obtidos nas fases de repleção e depleção. Foi ainda colhida amostra de sangue dos ratos por punção cardíaca para determinação dos níveis de hemoglobina glicosilada e ferro sérico.

3.4.3. Análises

3.4.3.1. Hemoglobina

A determinação da hemoglobina sangüínea foi feita pelo método do cianeto de metahemoglobina (HiCN), proposto pela ASSOCIATION... – AOAC (1984), utilizando o kit para diagnóstico colorimétrico *in vitro* da ANALISA DIAGNOSTICA LTDA (Cat. 243, Belo Horizonte – MG). Após secção de um pequeno segmento da porção terminal da cauda de cada animal, o sangue foi gotejado em placa de vidro e rapidamente coletado com micropipeta. Os 20 μ L de sangue foram então misturados a 5 mL de uma solução de cianeto e ferricianeto de potássio (solução de Drabkin). Neste método (NELSON e MORRIS, 1995) o íon ferroso (Fe^{2+}) da hemoglobina é oxidado para o estado férrico (Fe^{3+}) pelo ferricianeto de potássio, formando a metahemoglobina, esta combina com o cianeto de potássio formando o cianeto de metahemoglobina, cuja concentração foi medida a 540 nm em espectrofotômetro BAUSCH & LOMB SPECTRONIC 20. A cor resultante nesta reação é de intensidade proporcional ao teor da hemoglobina no sangue.

3.4.3.2. Hematócrito

O hematócrito foi determinado diretamente por centrifugação utilizando o micrométodo (NELSON e MORRIS, 1995). O tubo de microhematócrito (capilar) foi colocado no extremo terminal da cauda que foi cortada e

preenchido por capilaridade, considerando um mínimo de 5 cm. A extremidade vazia foi selada com massa de modelar. O tubo cheio foi colocado nos sulcos radiais na cabeça da centrífuga de microhematócrito com a ponta selada voltada para fora e o fundo contra o apoio de borracha para evitar quebras. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 8000 rpm.

Após a centrifugação, o comprimento da coluna de sangue, incluindo o plasma, e da coluna de eritrócitos isolada foram medidos em cada caso com uma escala graduada, sendo obtido o valor do hematócrito conforme as instruções do fabricante do aparelho utilizado (Centrífuga de bancada – Microhematócrito, SIGMA 1-15).

3.4.3.3. Ferro sérico

As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos para retirada do soro. Utilizou-se um kit para a determinação quantitativa de ferro ionizado em soro, para uso diagnóstico in vitro da marca In Vitro Diagnóstica Ltda (Cat : 015, Itabira - MG).

O primeiro passo neste procedimento analítico foi a dissociação do ferro da transferrina em meio ácido tamponado. Na presença de ácido tioglicólico o ferro foi reduzido a Fe^{2+} . O próximo passo foi a reação do ferro reduzido com um cromogênio para produzir um complexo ferro-cromogênio. O cromogênio foi o ácido 3-2-(piridil)-5,6-bis (4-fenilsulfônico)-1,2,3-triazina, desenvolvendo-se um complexo molecular de coloração rósea, cuja intensidade é proporcional à concentração de íons Fe^{3+} presentes na amostra e possui pico de absorção em 565 nm (WOO e CANNON, 1995).

3.4.3.4. Hemoglobina glicosilada

Cerca de 3 mL do sangue obtido por punção cardíaca foi coletado em um tubo de ensaio contendo EDTA como anticoagulante. A hemoglobina glicosilada então foi analisada nesta amostra utilizando o kit de In Vitro Diagnóstica (Cat: 024, Itabira –MG), para uso diagnóstico IN VITRO. Este teste se fundamenta no método de troca iônica. O sangue é hemolizado por uma formulação de tampão especial contendo íons borato. Devido à presença de

íons borato a completa eliminação da fração lábel da base de Schiff é obtida. O sangue hemolizado é então homogeneizado com uma resina de troca-iônica catiônica fraca. Sob estas condições, a fração de hemoglobina total é ligada na resina de troca iônica. Após uma curta incubação (5 minutos) a resina é separada do sobrenadante pelo uso de um tubo separador de resina. O sobrenadante contém a fração de hemoglobina glicosilada (HbA₁). A concentração de hemoglobina glicosilada é determinada pela medida de absorbância da fração hemoglobina glicosilada e da fração hemoglobina total a 415 nm, e comparando-se a relação de absorbância entre as duas hemoglobinas com a obtida do padrão processado da mesma forma que a amostra.

3.4.4. Modelo Experimental

Na fase de repleção, utilizou-se um modelo fatorial $2 \times 4 + 1$ correspondente a combinação de duas dietas (padrão e experimental) com 4 níveis de cobre (2, 4, 6, 12 ppm) e uma dieta testemunha (0 ppm Cu). Os 9 tratamentos foram dispostos no delineamento em blocos casualizados com 8 repetições.

3.4.5. Análises dos dados

Os dados foram analisados por meio de análise de variância e regressão. Para o fator qualitativo (Dietas) as medias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Para o fator quantitativo (Níveis) os modelos foram escolhidos baseado na significância dos

coeficientes de regressão utilizando-se o teste de t, adotando-se os níveis de 1 e 5 % de probabilidade, no coeficiente de determinação e no fenômeno em estudo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização em Cobre e Ferro

4.1.1. Arroz e feijão

A composição mineral dos alimentos de origem vegetal está influenciada e controlada pela fertilidade do solo, características genéticas da planta e do ambiente no qual cresce (MILLER, 1996), isto justificaria as diferenças observadas entre o teor de cobre e ferro em diferentes estudos, desenvolvidos em amostras de várias regiões de Brasil e do mundo (FERREIRA, 1995; AUGUSTIN et al., 1981; OLIVEIRA, 1997; FERREIRA, 1999). Análises realizadas por FERREIRA (1995) em amostras de diversos alimentos vegetais (inclusive arroz e feijão), provenientes de cinco regiões brasileiras, mostram grande diversidade de teores de minerais, em função da procedência do alimento, sendo o cálcio, magnésio e ferro os minerais que apresentaram maiores variações.

Os valores de cobre e ferro encontrados para o arroz e o feijão cozidos e desidratados neste estudo são mostrados no Quadro 5.

Quadro 5- Teor de Cobre e Ferro em amostras cozidas e desidratadas de arroz e feijão, em base seca (mg / 100g)

Alimento	Cobre	Ferro
	mg / 100 g	
Arroz polido	0,53	1,41
Feijão vermelho	1,32	6,16

O arroz apresentou baixos teores de ferro e de cobre. O arroz não consta dentro dos alimentos considerados ricos nem de mediana concentração em cobre mencionados na literatura (TURNLUND, 1994; HARRIS, 1997), resultando ser uma fonte pobre neste mineral, o que é confirmado pela concentração obtida neste experimento. A maioria dos alimentos ricos em amido tais como o arroz tem concentrações baixas de ferro (MARTINEZ et al., 1999). O arroz individualmente é classificado por BAYNES e BOTHWELL (1990) como um alimento de baixa biodisponibilidade de ferro.

No que se refere ao feijão existem também pequenas diferenças entre os dados obtidos nesta pesquisa com os dados consultados. AUGUSTIN et al. (1981), mostram uma concentração em base seca para este alimento na faixa de 0,50 a 1,10 mg de Cu/100g e 2,88 a 7,93 mg de Fe/100g de amostra cozida. OLIVEIRA (1997) reportou valores de 1 mg de Cu /100g e 7,70 mg de Fe/100 g de feijão cozido e desidratado.

Dentre as melhores fontes de cobre na alimentação brasileira se encontra o feijão (FERREIRA, 1999), sendo o teor na amostra analisada nesta pesquisa de 1,32 mg / 100g.

O conteúdo de ferro nas leguminosas, hortaliças e cereais é muito variável e sua biodisponibilidade é menor do que as das carnes (VANNUCCHI et al., 1992). O conteúdo de ferro em feijão é alto, como consta no Quadro 5, foi de 6,16 mg/100g de amostra, entretanto os feijões contêm altas concentrações de fitatos que diminuem a disponibilidade do mineral. A disponibilidade de minerais, principalmente o ferro, é afetada também pela presença de tanino e fibras alimentares (CHIARADIA e GOMES, 1997). A quantidade de ferro nos alimentos não reflete necessariamente sua absorção

pelo intestino humano e sua biodisponibilidade para o organismo (VANNUCCHI et al., 1992).

O feijão é uma das principais fontes de ferro para a população brasileira pelo seu elevado consumo na dieta (32%), seguido das carnes (20%) e do arroz (15%). Esse tipo de distribuição do ferro, nas dietas habituais do brasileiro, permite estimar que o potencial de absorção desse mineral é da ordem de 7%. Uma dieta considerada de baixa biodisponibilidade de ferro é aquela à base de cereais, raízes e tubérculos, com quantidades insignificantes de carnes e vitamina C. Neste tipo de dieta predominam alimentos tais como feijão, arroz e outros cereais, que possuem fatores que inibem a absorção de ferro (VANNUCCHI et al., 1992).

4.1.2. Dietas elaboradas

O Quadro 6 mostra a composição mineral (cobre e ferro) das dietas elaboradas. A dieta controle (sem cobre e sem ferro) administrada na fase de depleção, embora não tenham sido adicionados sulfato ferroso e sulfato de cobre, observou-se um pequeno teor de ferro (2,20 mg/Kg) e de cobre (0,28 mg/kg), possivelmente originados dos ingredientes utilizados na formulação.

Sendo a mistura arroz e feijão a base da alimentação da população brasileira (SALGADO et al., 1983; OLIVEIRA, 1997) foi também objetivo deste trabalho avaliar a biodisponibilidade de cobre e ferro numa mistura de arroz e feijão (50:50 p/p). A baixa concentração de cobre no arroz e feijão impossibilitou preparar dietas experimentais contendo exclusivamente a mistura destes dois alimentos como fonte do mineral. Portanto as dietas experimentais foram preparadas com a mistura de arroz e feijão, acrescida de cobre e ferro inorgânicos, na forma de sulfato.

O teor de ferro nas dietas apresentou também pequenas variações em relação ao estabelecido teoricamente que foi de 24 ppm exceto para a dieta controle (0 ppm Fe), sendo a maior concentração obtida para a dieta 5 (27,48 ppm Fe) e a menor para a dieta 4 (21,03 ppm Fe).

Quadro 6. Teor de Cobre e Ferro nas dietas, em base úmida (mg/Kg)

Dieta	Teor de cobre		Teor de ferro	
	Calculado	Determinado (*)	Calculado	Determinado (*)
Controle	0	0,28	0	2,20
T ₁	0	0,28	24	26,08
T ₂	2	2,76	24	25,64
T ₃	4	3,94	24	26,45
T ₄	6	6,34	24	21,03
T ₅	12	11,67	24	27,48
T ₆	2	1,68	24	24,98
T ₇	4	4,60	24	23,60
T ₈	6	6,76	24	25,62
T ₉	12	13,94	24	25,60

(*) Teor determinado por espectrometria de absorção atômica

4.2. Avaliação da influência do cobre no metabolismo do ferro

4.2.1. Fase de depleção

A hemoglobina basal ao início do experimento (Basal I) foi de 15,03 g/dL. Após 22 dias de alimentação dos ratos com a dieta controle (sem ferro e sem cobre) obteve-se os seguintes valores sanguíneos (Basal II): Hemoglobina 8,08 g/dL; hematócrito 32,50 %; ferro sérico 35,21 µg/dL e hemoglobina glicosilada 3,28 %.

A condição anêmica dos ratos ao final desta fase foi confirmada pela queda no nível de hemoglobina em relação à hemoglobina Basal I. Nos 72 animais restantes os valores de hemoglobina variaram entre 7,40 a 7,68 g/dL.

4.2.2. Fase de repleção

Os valores médios obtidos de hemoglobina final, ganho de hemoglobina, hematócrito, ferro sérico e hemoglobina glicosilada ao final da fase de repleção são resumidos no Quadro 7.

Quadro 7 - Valores médios de Hemoglobina final (Hbf), Ganho de hemoglobina (GHb), Hematócrito (HEMAC) , Ferro sérico (Fe) e Hemoglobina glicosilada (Hbg) ao final da fase de repleção

Dieta	Hbf	GHb	HEMAC	Fe	Hbg
	(g/dL)	(g/dL)	(%)	(µg / dL)	(%)
T ₁	10,27	2,52	40,50	63,19	3,62
T ₂	12,12	4,66	48,17	119,74	2,72
T ₃	12,93	5,50	48,38	123,65	2,48
T ₄	13,15	5,68	49,00	141,74	2,89
T ₅	12,59	5,11	47,25	120,13	3,35
T ₆	10,75	3,23	46,88	109,61	3,31
T ₇	11,25	3,94	47,38	131,35	3,09
T ₈	12,27	4,88	48,86	150,02	4,02
T ₉	11,18	3,78	45,38	105,01	4,54

REDDY e COOK (1991), em estudos comparativos usando ferro radioativo, observaram que as substâncias dietéticas (como fitatos) que diminuem comprovadamente a absorção de ferro não-heme em humanos exercem um efeito bem menos pronunciado em ratos. Estudos com estes animais são de uso limitado para prever a influência dos diferentes componentes dietéticos na absorção férrea no homem, a taxa de absorção é maior em ratos, de forma que estimuladores e inibidores que têm um efeito pronunciado no homem têm só uma resposta limitada em ratos (REDDY e COOK, 1991; HURRELL, 1997a). Estudos realizados por FORBES et al. (1989) não indicam grandes diferenças nos resultados obtidos com ratos (método de repleção de hemoglobina) e humanos (isótopos), sugerindo que o método de repleção de hemoglobina é um bom modelo para prever a biodisponibilidade de ferro na espécie humana.

No Quadro 8 encontram-se as médias das variáveis das combinações das dietas com os respectivos níveis de cobre. Verifica-se que para a variável

ganho de hemoglobina houve diferença significativa entre as dietas somente para o nível de 4 ppm de cobre. Para hematócrito e ferro sérico em todos os níveis utilizados não houve diferença significativa entre as dietas. Para hemoglobina glicosilada houve diferença significativa entre as dietas para os níveis de 6 e 12 ppm de cobre.

A presença da fonte inorgânica também no grupo de dietas experimentais (mistura de arroz e feijão, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) poderia estar beneficiando a biodisponibilidade de ferro nessas dietas. Assim, pode-se esperar um efeito negativo da mistura arroz e feijão na biodisponibilidade desses minerais.

DE ANGELIS et al. (1985) mostraram em estudos com ratos que as dietas à base de arroz e feijão consumidas pela população brasileira são limitadas biologicamente em certos minerais, devido ao seu menor nível dietético e a ligação com fatores antinutricionais. Avaliando a ingestão de dieta à base de uma mistura de arroz e feijão 55:45, sem suplementação, esses autores observaram um balanço negativo de manganês, ferro, zinco, cobre, cobalto, cálcio, cromo, molibdênio e fósforo, em ratos, após dez dias de experimento. Apenas potássio e magnésio apresentaram um balanço positivo.

Quadro 8 – Médias do Ganho de hemoglobina (GHb), Hematócrito (HEMAC), Ferro sérico (Fe), Hemoglobina glicosilada (Hbg) nas dietas padrão e experimental

	GHb				HEMAC				Fe			
	2	4	6	12	2	4	6	12	2	4	6	
Padrão	4,65a	5,50a	5,68a	5,10a	48,12a	48,37a	49,00a	47,25a	119,74a	131,35a	150,02a	12
Experimental	3,23a	3,94b	4,88a	3,77a	48,87a	47,37a	48,87a	45,37a	109,61a	123,65a	141,74a	10
(*)												

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nas colunas não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste TUKEY.

(*) Contendo arroz e feijão

Os níveis de cobre, por se tratar de um fator quantitativo, foram estudados utilizando-se análise de regressão. A dieta testemunha T₁ (nível zero de cobre), foi incluída em ambas as dietas (padrão e experimental). O resíduo utilizado foi aquele obtido conforme modelo experimental estabelecido. O resumo da análise de variância da regressão é apresentado no Quadro 9.

Quadro 9- Resumo da análise de variância da regressão para Ganho de hemoglobina (GHb), Hematócrito (HEMAC), Ferro sérico (Fe), Hemoglobina glicosilada (Hbg), em função de diferentes níveis de Cobre nas dietas Padrão e Experimental

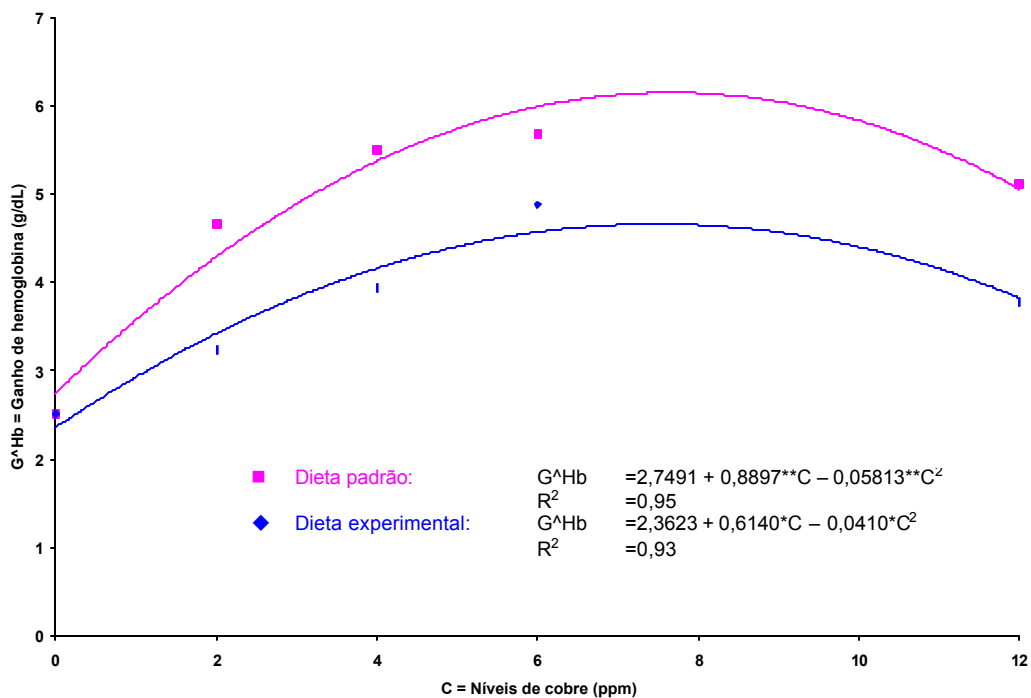
		Quadrados Médios			
Fontes de Variação	GL	GHb	HEMAC	Fe	Hbg
Níveis de cobre /					
Dieta padrão	(4)				
Regressão	2	24,9230**	157,5155**	12876,9160**	2,5501**
Falta de ajuste	2	1,1873n.s.	31,8095n.s.	1180,7536n.s.	0,9235n.s.
Níveis de cobre /					
Dieta experimental	(4)				
Regressão	2	11,3838*	146,3500**	16931,0520**	3,9673**
Falta de ajuste	2	0,8470n.s.	13,8498n.s.	94,1126n.s.	1,3933n.s.
Resíduo	56	2,0734	10,9634	2356,247	0,6277

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

* significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

n.s. não significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

As Figuras 2, 3 e 4 mostram respectivamente, o efeito dos níveis de cobre sobre o ganho de hemoglobina, hematócrito e ferro sérico para as duas dietas utilizadas.

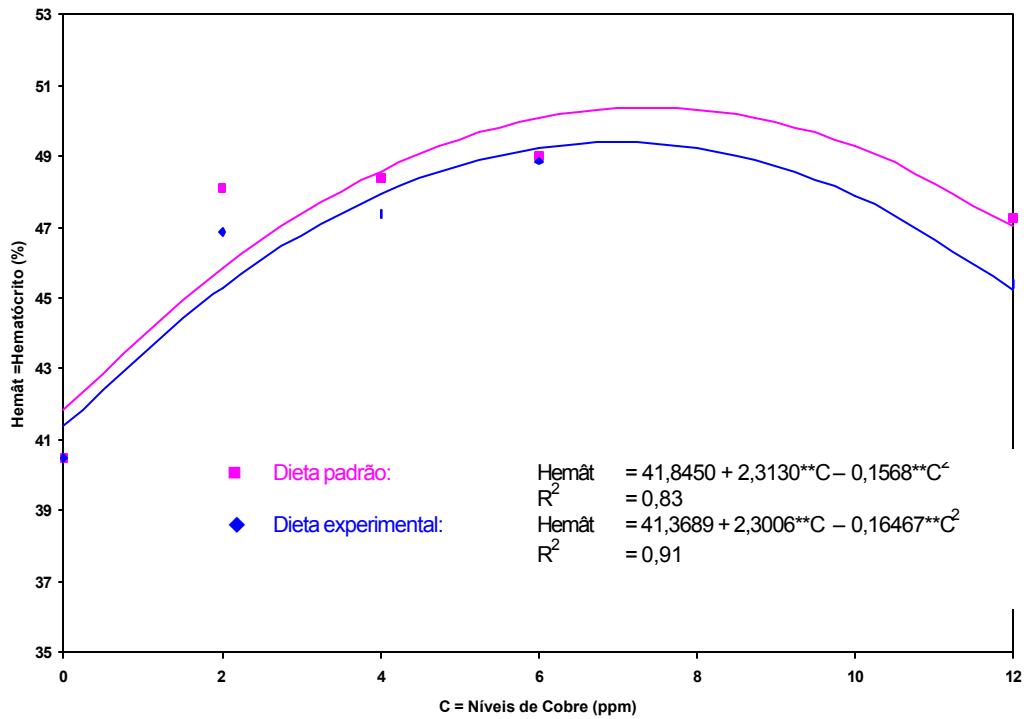


* Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste t

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t

Figura 2 – Estimativa do Ganho de hemoglobina (G^Hb) em função de níveis de Cobre (C) nas dietas padrão e experimental

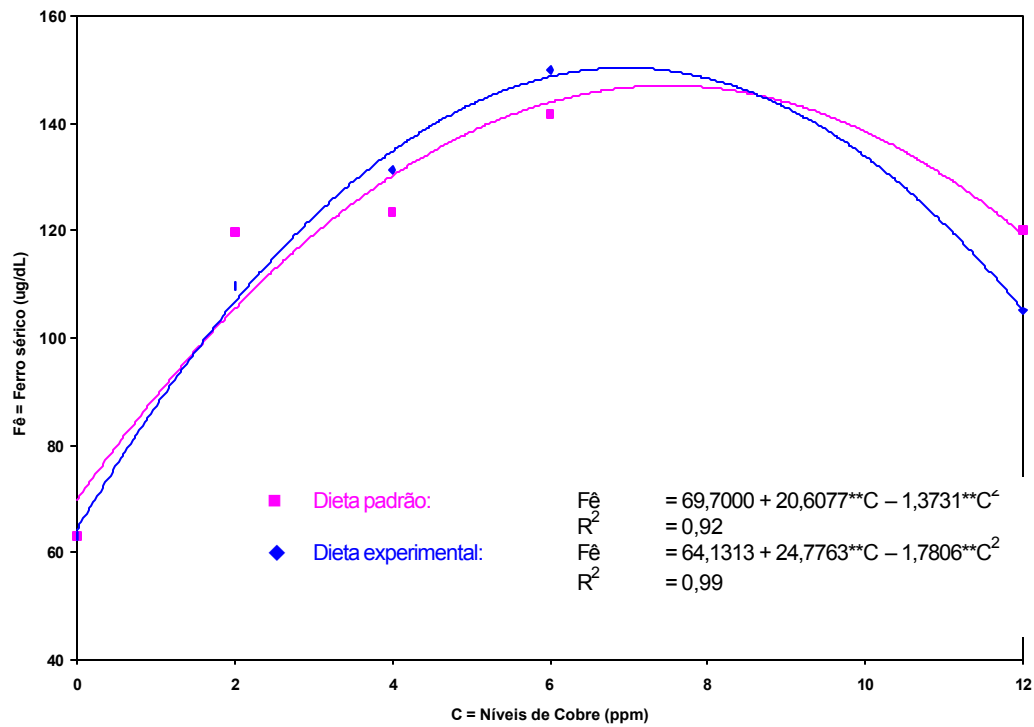
- Dieta padrão: Dieta básica + $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ + $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
- ◆ Dieta experimental: Dieta básica + mistura arroz e feijão + $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ + $FeSO_4 \cdot 7H_2O$



** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t

Figura 3 – Estimativa do Hematócrito (HEMAC) em função de níveis de Cobre (C) nas dietas padrão e experimental

- Dieta padrão: Dieta básica + $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ◆ Dieta experimental: Dieta básica + mistura arroz e feijão + $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t

Figura 4 – Estimativa do Ferro sérico (Fê) em função de níveis de Cobre (C) nas dietas padrão e experimental

- Dieta padrão: Dieta básica + $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ + $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
- ◆ Dieta experimental: Dieta básica + mistura arroz e feijão + $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ + $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

Os resultados obtidos indicam uma influência do cobre no ganho de hemoglobina, hematócrito e ferro sérico em ratos anêmicos submetidos a dietas com uma concentração fixa de ferro (24 ppm) e concentrações de cobre entre 0 e 12 ppm.

A variação nos níveis de hemoglobina, hematócrito e ferro sérico em função da concentração de cobre na dieta, sugere uma interação do cobre no metabolismo do ferro. HART e seus colaboradores (1928) apresentaram a primeira evidência de que o cobre era nutricionalmente essencial para os animais porque este foi necessário para adequada formação da hemoglobina em ratos. Sendo a hemoglobina uma proteína que contém ferro (heme), este trabalho também estabeleceu a primeira evidência da relação fisiológica entre cobre e ferro.

Os animais após a fase de depleção apresentaram nível de ferro sérico de 35,21 µg/dL (Basal II). Ao final da fase de repleção o valor mínimo encontrado foi de 63,19 µg/dL (Quadro 7) correspondente ao grupo alimentado com a dieta testemunha, T₁ (0 ppm Cu, 24 ppm Fe). Foi observado aumento nos níveis séricos de ferro à medida que se incrementou a concentração de cobre na dieta (Figura 4). O valor mais alto deste parâmetro na dieta padrão foi de 147,02 µg/dL e 150,32 µg/dL na dieta experimental, quando a concentração de cobre foi de 7,50 e 6,96 ppm de cobre, respectivamente.

A medida de ferro sérico sozinho é de valor limitado, já que os níveis diminuídos do ferro sérico estão usualmente associados com ambas, anemia por deficiência de ferro e a anemia por infecções crônicas. A determinação concomitante do ferro sérico e da transferrina permite a computação da saturação da transferrina, que expressa melhor o índice de armazenagem de ferro. O ferro sérico reflete principalmente a quantidade de ferro ligado a transferrina (WOO e CANNON, 1995). LEE et al. (1968) mencionam que as anormalidades observadas no metabolismo de ferro em suínos cobre deficientes, são mais bem explicadas por uma diminuição da mucosa duodenal, o sistema retículo endotelial e células do parênquima hepático para liberar o ferro ao plasma conseqüentemente a armazenagem do ferro é incrementada, sendo o cobre essencial para uma reação bioquímica que resulta na transferência do ferro destas células ao plasma. Em virtude da ceruloplasmina ser uma enzima cobre-dependente, frente a uma maior concentração de cobre,

pode cumprir com maior eficácia sua função de ferroxidase. Presume-se que a deficiência de cobre bloqueia a saída de ferro do enterócito, devido à deficiência de ceruloplasmina (WOOD e HAN, 1998).

O estado de oxidação do ferro é um fator crucial na sua mobilização. O ferro é ligado a transferrina no estado férrico, embora a maioria do ferro intracelular liberado de ferritina, proteína primária de armazenamento férreo, esteja na forma ferrosa. Uma etapa de oxidação é requerida antes deste ferro poder ser mobilizado efetivamente para fora da célula (YOUNG, et al., 1997). A ceruloplasmina tem uma função biológica nesta etapa, devido a sua atividade de ferroxidase, oxida o ferro ferroso (absorvido) a ferro férrico antes de sua incorporação em apotransferrina (OSAKI, et al., 1966; YOUNG, et al., 1997). Assim, na ausência de ceruloplasmina este passo de oxidação é dificultado, e a velocidade da incorporação de ferro absorvido na apotransferrina para a entrega no local de síntese de hemoglobina é reduzida (EVANS e ABRAHAM, 1973).

OSAKI et al. (1971) demonstraram o papel da ceruloplasmina na mobilização do ferro do fígado em animais deficientes em cobre e propuseram que a atividade ferroxidase desta proteína estabelecia um gradiente de concentração movimentando o ferro dos sítios de armazenamento ao sistema capilar. Estudos mais recentes desenvolvidos por HARRIS, et al. (1999) concordam com esta função de ceruloplasmina mencionando também que esta proteína determina a quantidade de fluxo do ferro. O defeito na transferência de ferro das células para o plasma causado por deficiência de cobre pode ser corrigido pela administração intravenosa de ceruloplasmina, o que provoca um aumento no plasma de ferro proporcional à dose de ceruloplasmina (LEE et al., 1968; ROESER, et al., 1970; HARRIS, et al., 1999). A administração de cobre inorgânico induz um incremento de ferro no plasma só depois de que ceruloplasmina aparece na circulação confirmando a essencialidade desta proteína para o movimento normal do ferro dos lugares de armazenamento ao plasma (ROESER, et al., 1970) e o controle no metabolismo férreo (HARRIS, et al., 1995b).

Um fato interessante observado em suínos deficientes em cobre foi que a administração intramuscular de ferro não afetou a taxa à qual a anemia desenvolveu nem preveniu a hipocromia e microcitose (LEE et al., 1968). Esta

anemia e o incremento do ferro hepático têm sido atribuídos à inadequada atividade de ceruloplasmina para a mobilização de ferro do fígado (SHERMAN e TISSUE, 1981). Estudos desenvolvidos por YOUNG, et al. (1997) comprovam que ceruloplasmina é o modulador principal da liberação férrea do fígado, mantendo assim a homeostase sistêmica férrea. Alterações no plasma da concentração de ceruloplasmina ou de sua atividade alteram a homeostase férrea e podem contribuir ao aparecimento de doenças (YOUNG, et al., 1997; ATTIEH, et al., 1999). Indivíduos com deficiência hereditária de ceruloplasmina (aceruloplasminemia) apresentam um metabolismo férreo anormal, com hemossiderose caracterizada por baixo nível de ferro sérico, ferritina sérica elevada, abundante deposição em vários órgãos, déficit neurológico e diabetes, o que sugere que ceruloplasmina seja importante na liberação celular do ferro (HARRIS, et al., 1995b; MUKHOPADHYAY, et al., 1998; ATTIEH, et al., 1999; HARRIS, et al., 1999).

Na presente pesquisa, observou-se ainda o fenômeno que frente a um excesso de cobre (12 ppm) obteve-se um efeito contrário no metabolismo do ferro (Figura 4), o que coincide com o trabalho desenvolvido por CHASE et al. (1952) também com ratos, onde determinaram que o aumento do cobre dietético aumentava a absorção férrea até certo ponto, após o qual tende-se a reduzir a absorção do ferro. Estudos posteriores de HEDGES e KORNEGAY (1973) revelaram que a diminuição dos níveis de ferro sérico obtidos devido a elevadas concentrações de cobre na dieta refletem uma redução na absorção do ferro.

O cobre é importante para a absorção e utilização do ferro e desta forma para a formação da hemoglobina e prevenção da anemia (LEE, 1968; EVANS, et al., 1973). Todos os grupos experimentais apresentaram recuperação do quadro de anemia (hemoglobina > 6,0 g/dL). O nível mais baixo de hemoglobina final foi obtido com a Dieta testemunha, T₁ (0 ppm Cu), observando-se um aumento da hemoglobina final conforme o aumento no teor de cobre nas dietas, tanto padrão, quanto experimental (Quadro 7). O hematócrito apresentou o mesmo comportamento, sendo os valores mais altos de 50,37 e 49,40 % quando a concentração de cobre foi de 7,38 e 6,99 ppm nas dietas padrão e experimental respectivamente (Figura 3).

A liberação do ferro da transferrina pode ocorrer da seguinte maneira: um átomo pode ser liberado em pH baixo, o outro pode requerer a mediação de adenosina trifosfato (ATP), hemoglobina ou outras substâncias. Dentro do citosol do eritroblasto, o ferro é transportado à mitocôndria para a biossíntese do heme, sendo a incorporação do ferro na protoporfirina catalisada pela enzima mitocondrial heme sintetase, que tem como substrato o Fe^{2+} e não o Fe^{3+} que está ligado com transferrina (WILLIAMS, et al., 1976; FAIRBANKS, 1994), intervindo nesta etapa citocromo c oxidase, outra enzima cobre-dependente. Citocromo c oxidase contém dois átomos de cobre por molécula, e o cobre é essencial para sua atividade enzimática (WILLIAMS, et al., 1976; HARRIS, 1997), participando no metabolismo intracelular do ferro ao cumprir um papel fundamental no sistema de transferência de elétrons, necessário para a redução do ferro férrico a ferro ferroso antes de ser incorporado ao grupo heme (WILLIAMS, et al., 1976).

Estudos desenvolvidos por WILLIAMS, et al. (1976) confirmam o fato de que um sistema de transporte de elétrons ativo e intacto é requerido para a utilização celular do ferro, a redução do Fe^{3+} na membrana mitocondrial interna, e a provisão de Fe^{2+} como substrato para síntese do heme. A síntese heme é diminuída em mitocôndrias deficientes em citocromo oxidase, e a porcentagem de síntese guarda uma correlação com a atividade desta enzima. Estudos com ratos evidenciam dano mitocondrial em animais cobre deficientes e depressão da atividade de citocromo c oxidase (PROHASKA, 1990; BODE, 1992).

A medula óssea é o principal órgão hematopoiético do corpo (GUYTON, 1971), portanto baixos níveis hematológicos poderiam ser provocados por uma deficiência de ceruloplasmina e citocromo c oxidase que se observa em animais cobre deficientes.

Os valores mínimos encontrados em ganho de hemoglobina, hematócrito e ferro sérico (Quadro 7) acontecem quando as dietas de repleção só contêm ferro, embora o hematócrito e o ferro sérico se encontrem no limite inferior dos valores considerados adequados para manter o balanço normal de ferro, os valores de hemoglobina final e ganho de hemoglobina são bastante baixos.

Igualmente ao observado com ferro sérico, as curvas para ganho de hemoglobina e hematócrito (Figuras 3 e 4, respectivamente) sofrem uma queda frente a concentrações elevadas de cobre, o que evidencia que alta concentração de cobre na dieta tem um efeito antagônico no metabolismo de ferro. Em ratos ferro-depletados alimentados com uma dieta limitante em ferro (15 mg/Kg), baixos níveis de cobre na dieta até 5 mg/kg, melhoraram a repleção de hemoglobina, mas o aumento progressivo de 7,5 a 20 mg/kg de cobre, demonstrou um antagonismo (FRITZ, et al., 1977).

Tanto a deficiência como excesso de cobre resultam em anemia. Na deficiência de cobre a anemia parece ser decorrente de defeito no metabolismo do ferro impedindo-o de ser oxidado de ferroso para férrico (pela ação de ceruloplasmina), o que impossibilita a mobilização do ferro dos estoques e a sua utilização adequada pelos eritrócitos imaturos. Esta anemia é de tipo hipocrômica, microcítica, acompanhada de leucopenia e neutropenia e resistente à terapia com sulfato ferroso. Enquanto a anemia provocada pelo excesso de cobre parece ser mais do tipo hemolítico, e o principal mecanismo sugerido poderia ser a peroxidação de lipídios da membrana eritrocitária reduzindo a meia vida celular (DICHI e BURINI, 1991).

No presente estudo também se avaliou a influência dos níveis de cobre na glicação de hemoglobina.

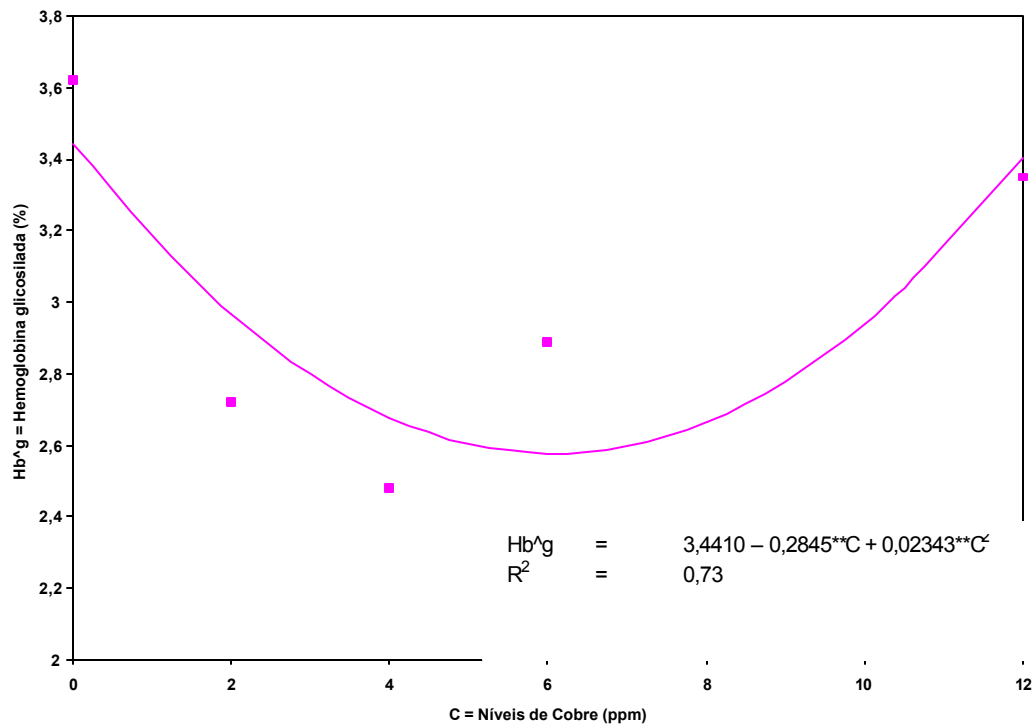
O efeito dos níveis de cobre na dieta padrão sobre a hemoglobina glicosilada é apresentado na Figura 5. Os maiores valores foram obtidos com concentrações de cobre de 0 e 12 ppm. O comportamento desta curva sugere que a presença do cobre participa no metabolismo de glicose, dado que na ausência de cobre o valor de hemoglobina glicosilada é alto devido a um aumento de glicose no plasma. À medida que se aumenta a concentração do cobre, aumenta o metabolismo de glicose e diminui a glicosilação não enzimática de hemoglobina, isto se observa até uma concentração de 6,07 ppm, a partir da qual embora se aumente a concentração do cobre aumenta a porcentagem de hemoglobina glicosilada, evidenciando que o cobre é importante para o metabolismo de glicose até determinada concentração, após a qual parece ter um efeito contrário.

Na dieta experimental, não verificou-se o efeito dos níveis de cobre sendo o modelo $Y = 3,716$ correspondente à media dos valores observados.

O cobre desempenha um papel importante no metabolismo de carboidratos. Concentrações fisiológicas de cobre inibem a hidrólise de glicose 6-fosfato *in vitro*, e presumivelmente poderiam resultar num elevado nível de glicogênio hepático. A deficiência de cobre poderia aumentar a hidrólise, baixando o glicogênio hepático e aumentando a glicose no sangue (FIELDS, et al., 1984a).

O cobre é importante no metabolismo de carboidratos por estimular a ligação com insulina, observando-se que a deficiência de cobre interfere com a utilização normal de glicose que provoca uma diminuição da tolerância à glicose, alterando os níveis de insulina no soro de ratos. Em humanos tem sido demonstrada uma associação negativa entre o cobre no soro e a concentração de glicose (REISER, et al., 1983; FIELDS et al., 1984b).

A ocorrência da glicosilação não enzimática na deficiência de cobre provavelmente envolve uma disfunção endócrina pancreática; em ratos cobre-deficientes se observa que a liberação de insulina é reduzida ou retardada, provocando-se uma carga de glicose no plasma, requisito importante para o aumento da glicação (SAARI e DAHLEN, 1999). Alguns estudos indicam que a insulina pancreática liberada e os efeitos desta sobre os órgãos específicos é diminuída (SAARI, 2000).



** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t

Figura 5 – Estimativa da Hemoglobina glicosilada (Hb^g) em função de níveis de cobre (C) na dieta padrão

■ Dieta padrão: Dieta básica + CuSO₄.5H₂O + FeSO₄. 7H₂O

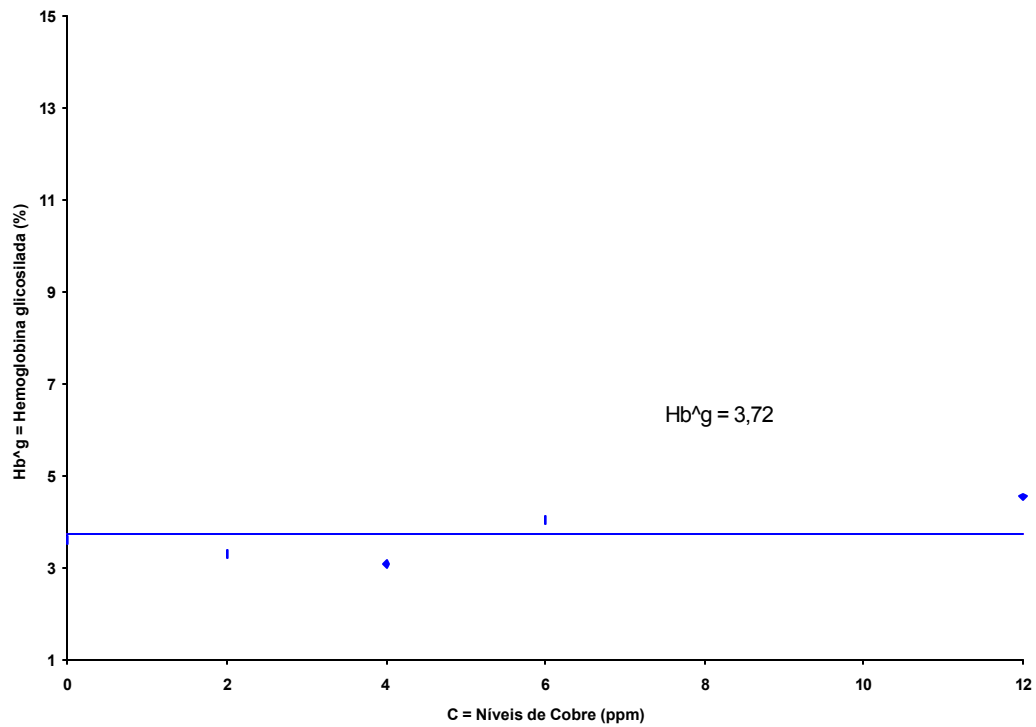


Figura 6 – Estimativa da Hemoglobina glicosilada (Hb^g) em função de níveis de cobre (C) na dieta experimental

- ◆ **Dieta experimental:** Dieta básica + mistura arroz e feijão + $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

SAARI (2000) estabelece uma hipótese interessante em que a partir de uma deficiência de cobre que provoca inicialmente uma diminuição do metabolismo do ferro e redução da atividade antioxidante de enzimas cobre-dependentes, se produz um aumento de espécies reativas de oxigênio que aumentam a produção de óxido nítrico (NO), provocando este composto uma série de alterações no organismo como dano das células do pâncreas e redução da produção de insulina, com incremento da glicose no sangue e conseqüentemente um aumento da glicosilação não enzimática de proteínas.

A hemoglobina glicosilada é formada lentamente de 3 a 4 semanas. Com o contínuo acúmulo de hemoglobina glicosilada, é evidente que o aumento deste componente, pode ser considerado um reflexo da média de concentração de glicose no sangue. Sob o ponto de vista clínico, é de grande importância o controle periódico da dosagem da hemoglobina glicosilada, para acompanhamento de diabéticos (DO VALLE, et al., 1987; MAKITA, et al., 1992).

4.2.3. Ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar

O Quadro 10 mostra os valores médios para ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar.

Não houve diferença significativa entre as dietas para ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente alimentar (Quadro 11).

Esses parâmetros também não foram influenciados pelos níveis de cobre presentes nas dietas sendo os modelos iguais a: Para o ganho de peso na dieta padrão 61,70 e 63,25 na dieta experimental. Para o consumo alimentar na dieta padrão 207,38 na dieta padrão e 207,61 na dieta experimental e para o coeficiente de eficiência alimentar na dieta padrão igual a 0,298 e 0,301 na dieta experimental.

O fato destes parâmetros não ser influenciados pelos níveis de cobre sugere que os parâmetros clínicos avaliados (hemoglobina, hematócrito, ferro sérico, hemoglobina glicosilada) respondem unicamente aos diferentes níveis de cobre e não a uma variação no consumo de alimento.

VANDENBERG, et al. (1992) trabalhando com concentrações de cobre de 1 e 5 mg/kg de dieta, observaram que os teores do mineral não afetavam o consumo alimentar nem o ganho de peso.

Quadro 10- Valores médios de ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) obtidos de ratos alimentados durante a fase de repleção

Dieta	Ganho de peso	Consumo alimentar	CEA*
	(g)	(g)	(%)
T ₁	58,50	199,94	0,295
T ₂	56,13	207,88	0,267
T ₃	65,88	205,59	0,323
T ₄	68,00	214,14	0,318
T ₅	60,00	209,33	0,286
T ₆	57,38	202,24	0,266
T ₇	65,38	206,58	0,316
T ₈	66,63	217,26	0,307
T ₉	68,38	212,04	0,323

*CEA = ganho de peso (g) / consumo alimentar (g)

Quadro 11- Médias de ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) nas dietas padrão e experimental

Dietas	Ganho de peso	Consumo	CEA
		alimentar	
Padrão	62,50 a	209,24 a	0,299 a
Experimental	64,44 a	209,53 a	0,303 a

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nas colunas não diferem entre si, a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A importância das interações entre nutrientes com respeito à absorção, transporte, utilização e necessidade se faz evidente para o funcionamento normal do organismo humano e a manutenção da saúde.

A deficiência de ferro no organismo ocasiona, no último extremo anemia, uma das carências nutricionais mais comuns no mundo e que afeta populações tanto de países em desenvolvimento quanto de países desenvolvidos. Para a prevenção desta doença é necessário conhecer o metabolismo do ferro, e especialmente os fatores que podem interferir na utilização deste mineral. A presente pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de estudar a interação do cobre no metabolismo do ferro. Devido ao fato de que a alimentação brasileira se caracteriza basicamente pela presença de arroz e feijão se incluiu também neste estudo a mistura desses alimentos.

O estudo consistiu em uma fase de depleção para indução de anemia em ratos com alimentação livre de ferro e cobre e uma segunda fase, de repleção, cujas dietas apresentaram diferentes níveis de cobre (0, 2, 4, 6, 12 ppm) e uma concentração fixa de ferro (24 ppm). Avaliou-se a interação de

cobre no metabolismo de ferro de duas fontes minerais, uma inorgânica e uma consistindo de uma mistura de arroz e feijão (50:50 p/p).

A recuperação dos parâmetros hematológicos avaliados em função dos níveis de cobre presentes nas dietas permitiu visualizar como o cobre regula a homeostase de ferro, visto que os níveis de hemoglobina, hematócrito e ferro sérico aumentaram na medida em que crescia o teor de cobre na dieta, até determinada concentração, em torno de 6 ppm, observando-se depois uma queda na concentração desses parâmetros.

Os resultados obtidos permitem concluir que o cobre influencia o metabolismo do ferro e mais especificamente na formação da hemoglobina. No entanto é importante considerar que tanto a deficiência como o excesso do cobre são prejudiciais para o ferro, uma vez que em ambos os casos (0 e 12 ppm Cu) observou-se uma diminuição dos parâmetros hematológicos avaliados. Ainda, é importante considerar que hemoglobina, hematócrito e ferro sérico foram mais altos quando a concentração de cobre foi de 12 ppm, comparado com a ausência de cobre na dieta. Portanto, um excesso, dentro de certos limites, seria menos prejudicial que a ausência de cobre na dieta, baseado nos parâmetros analisados. A deficiência de cobre provoca uma alteração no metabolismo do ferro, impedindo a utilização do ferro ingerido.

O baixo conteúdo de cobre no arroz impediu utilizar só a mistura de arroz e feijão como fonte experimental, utilizando-se para completar as concentrações requeridas uma fonte inorgânica, isto poderia estar superestimando a biodisponibilidade das dietas experimentais, observando-se uma diferença significativa entre as dietas padrão e experimental quando o ganho de hemoglobina e hemoglobina glicosilada foram avaliadas.

A hemoglobina glicosilada apresentou um comportamento inverso até determinada concentração de cobre (em torno de 6 ppm) depois do qual houve um acréscimo em função do aumento da concentração do mineral. Isto permite concluir que o cobre desempenha um papel importante no metabolismo de glicose, impedindo o aumento deste açúcar no sangue e a conseqüente formação de hemoglobina glicosilada, devendo ser a concentração de cobre monitorada adequadamente. Havendo sido este trabalho projetado para o estudo do cobre no metabolismo do ferro, o observado na formação da hemoglobina glicosilada será útil para estudos futuros, orientados a uma

pesquisa mais aprofundada na influência do cobre no metabolismo de carboidratos.

Os resultados deste estudo poderão servir como base para o estabelecimento de programas de saúde preventivos no tratamento de anemias, considerando-se a importância do cobre nesta doença. O consumo de fontes de Cu, poderia beneficiar a saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro, v. 52, 1992.

ARAI, K., MAGUCHI, S., FUJII, S., ISHIBASHI, H., OIKAWA, K., TANIGUCHI, N. Glycation and Inactivation of human Cu-Zn Superoxide Dismutase. **J. Biol. Chem.**, v.262, n.35, p.16969-16972, 1987.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 14. ed. Arlington, 1984. 1141p.

ATTIEH, Z.K., MUKHOPADHYAY, C.K., SESHADRI, V., TRIPOULAS, N., FOX, P.L. Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism. **J. Biol. Chem.**, v.274. n.2. p. 1116–1123, 1999.

AUGUSTIN, J.; BECK, C.B., KALBFLEISH, G.K., KAGEL, L.C., MATTHEWS, R.H. Variation in the vitamin and mineral content of raw and cooked

commercial phaseolus vulgaris classes. **J. Food. Sci.**, v.46, p.1701–1706, 1981.

BALLIGAND, J.L., UNGUREANU, D., KELLY, R., KOBZIK, L., PIMENTAL, D., MICHEL, T., SMITH, T. Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. **J. Clin. Invest.**, v.91, p.2314–2319, 1993.

BATISTA-FILHO, M., FERREIRA, L.O.C. Prevenção e tratamento da anemia nutricional ferropriva: novos enfoques e perspectivas. **Cad. Saúde Públ.**, v. 12, n.3, p. 411–415, 1996.

BAYNES, R. D., BOTHWELL, T. H. Iron deficiency. **Ann. Rev. Nutr.**, v. 10, n. 2, p. 133-148, 1990.

BAYNES, R.D., STIPANUK, M.H. Iron. In: STIPANUK, M.H. **Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition**. Philadelphia: Saunders Company, 2000. p. 711– 740.

BEARD, J.L., DAWSON, H.D. Iron. In: O'DELL, B., SUNDE, R. (Eds.) **Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements**. Missouri, 1997. p. 275 - 334.

BECKMAN, J., KOPPENOL, W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.**, v.271, p.C1424–C1437, 1996.

BENITO, P., MILLER, D. Iron absorption and bioavailability: an update review. **Nutr. Res.** v.18, n.3, p.581–603, 1998.

BIANCHI, M.L.P., SILVA, H.C., DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. Considerações sobre a biodisponibilidade do ferro dos alimentos. **Arch. Lat. Nutr.**, v.42, n.2, p.94-100, 1992.

BODE, A. M., MILLER, L.A., FABER, J., SAARI, J.T. Mitochondrial respiration in heart, liver, and kidney of copper-deficient rats. **J. Nutr. Biochem.**, v.3, n. 12, p.668–671, 1992.

BRODY, T. **Nutritional biochemistry**. California: Academic Press, 1994. p. 658.

CARPENTER, C.E., MAHONEY, A.W. Contributions Of Heme And Nonheme Iron To Human Nutrition. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 31, n.4, p.333-367, 1992.

CHASE, M.S., GUBLER, C., CARTWRIGHT, G., WINTROBE, M. Studies on copper metabolism. IV. The influence of copper on the absorption of iron. **J. Biol. Chem.**, v.199, p.757–763, 1952.

CHIARADIA, A.C., GOMES, J. **Feijão: Química, Nutrição e Tecnologia**. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 1997. 180p.

CONSÓRCIO DAS INSTITUIÇÕES BRASILEIRAS DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO (CIBRAN), 13, 1994, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 1994. 341 p.

CORBETT, J., MIKHAEL, A., SHIMIZU, J., FREDERICK, K., MISKO, T., McDANIEL, M., KANAGAWA, O., UNANUE, E. Nitric oxide production in islets from nonobese diabetic mice: Aminoguanidine – sensitive and – resistant stages in the immunological diabetic process. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.90, p.8992–8995, 1993.

CORDANO, A., GRAHAM, G. Copper deficiency complicating severe chronic intestinal malabsorption. **Pediatrics**. v. 38, n. 4, p.596–604, 1966.

CRICHTON, R., CHARLOTEAUX-WAUTERS, M. Iron transport and storage. **Eur. J. Biochem.**, v. 164, p.485–506, 1987.

DE ANGELIS, R.C., CTENAS, M.L.B. **Biodisponibilidade de ferro na alimentação infantil**. São Paulo: Serviço de Informação Científica Nestlé. (Temas de Pediatria, 52), 1993. 53 p.

DE ANGELIS, R.C., MAURON, J., FINOT, P.A. et al. Bioavailability of mineral elements in the Brazilian basic food system of rice and beans. **Nutr. Res.**, v. 5, p. 969-981, 1985.

DICHI, J., BURINI, R.C. Metabolismo do Cobre e Anemia. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v.6, n.1, p.13–21, 1991.

DO VALLE, P., ORNELLAS, L., FRANCO, Z. **Viva em paz com seu diabetes**. São Paulo: Atheneu Editora, 1987. 156 p.

EVANS, J., ABRAHAM P. Anemia, Iron Storage and Ceruloplasmin in Copper Nutrition in the Growing Rat. **J. Nutr.**, v.103, p.196-201, 1973.

FAIRBANKS, V.F. Iron in Medicine and Nutrition. In: SHILLS, M.E., OLSON, J.A., SHIKE, M. **Modern Nutrition in health and disease**. 8.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. p.185–213.

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

FERREIRA, K.S. **A desnutrição mineral na dieta básica brasileira**. Viçosa: UFV, 1995. 185p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.

FERREIRA, K. **Quantificação e Avaliação dos Teores de Minerais em Alimentos e em Dietas Utilizadas no Brasil**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 137p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.

FIELDS, M., LEWIS, C., LURE, M., BURNS, W., ANTHOLINE, W. Low Dietary Iron Prevents Free Radical Formation and Heart Pathology of Copper-Deficient Rats Fed Fructose (43531). **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.202, p. 225–232, 1993.

FIELDS, M., FERRETI, R., SMITH, C., REISER, S. The interaction of type of dietary carbohydrates with copper deficiency. **Am. J. Clin. Nut.**, v.39, p. 289-294, 1984a.

FIELDS, M., FERRETI, R., SMITH, C., REISER, S. Impairment of Glucose Tolerance in Copper-Deficient Rats: Dependency on the Type of Dietary Carbohydrate. **J. Nut.**, v. 114, p. 393–397, 1984b.

FLEET, J. Zinc, Copper and Manganese. In: STIPANUK, M.H. **Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition**. Philadelphia: Saunders Company, 2000. p. 255-257.

FORBES, A. L., ADAMS, C.E., ARNAUD, M.J. et al. Comparison of in vitro, animal and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutrition Anemia Consultative Group Task Force report on iron bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.49, p.225–238, 1989.

FRITZ, J., PLA, G., HARRISON, B., CLARK, G., SMITH, E. Measurement of the Bioavailability of iron, using the rat hemoglobin repletion test. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.61, n.3, p.709–714, 1977.

FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA – UNICEF. **Situação Atual da Infância**. Brasília, DF: 1993. 92p.

FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA – UNICEF. **Situação Mundial da Infância**. Brasília, DF: 1998. 132p.

GUBLER, C., LAHEY, M., CHASE, M., CARTWRIGHT, G., WINTROBE, M. Studies on copper metabolism. The metabolism of iron in copper deficient swine. **Blood**. v.7, p.1075–1092, 1952.

GUPTA, S., VENKATESWARAN, R., GORENFLO, D., EYLER, A. Childhood Iron Deficiency Anemia, Maternal Nutritional Knowledge, and Maternal Feeding Practices in a High – Risk Population. **Prev. Med.**, v.29, p.152–156, 1999.

GUYTON, A. **Tratado de Fisiología Médica**. Cuarta Edición. México: Interamericana, 1971. p. 113

GUYTON, A., HALL, J. **Tratado de Fisiología Médica**. Nona Edición. Río de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 389– 396.

HALL, A. C., YOUNG, B. W., BREMNER, I. Intestinal metallothionein and the mutual antagonism between copper and zinc in the rat. **J. Inorg. Biochem.**, v.11, p.57–66, 1979.

HARRIS, E.D. The Iron-Copper Connection: The link to Ceruloplasmin Grows Stronger. **Nutr. Rev.**, v.53, n. 6, p.170-173, 1995a.

HARRIS, Z.L., TAKAHASHI, Y., MIYAJIMA, H., SERIZAWA, M. Aceruloplasminemia: Molecular characterization of this disorder of iron metabolism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.92. p.2539–2543, 1995b.

HARRIS, E. Copper. In: O'DELL, B. L, SUNDE, R. (Eds). **Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements**. Missouri, 1997. p.231-273.

HARRIS, Z., KLOMP, L., GITLIN , J. Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. **Am. J. Clin. Nut.**, v.67, n.5, p.972S– 977S, Suppl. S, 1998.

HARRIS, Z.L., DURLEY, A.P., MAN, T.K., GITLIN, J.D. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmina in cellular iron efflux. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.96. p.10812–10817,1999.

HART, E., STEENBOCK, H., WADDELL, J., ELVEHJEM, C. Iron in nutrition. VII. Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. **J. Biol. Chem.**, v.77, p.797-812, 1928.

HAZELL, T. Minerals in foods; dietary sources, chemical forms, interactions, bioavailability. In: BOURNE, G.H. **Minerals in food and nutritional topics**. New York: Karger, 1985. p. 1-23 (World Review of Nutrition and Dietetics, 46).

HEDGES, J.D., KORNEGAY, E.T. Interrelationship of dietary copper and iron as measured by blood parameters, tissue stores and feedlot performance of swine. **J. Anim. Sci.**, v.37. n.5. p.1147–1154, 1973.

HUNT, J., DEAN, R., WOLFF, S. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. **Biochem. J.**, 256, p.205–212, 1988.

HURRELL, R.F. Bioavailability of iron. **Europ. J. Clin. Nutr.**, v.51, Suppl. 1, S4-S8, 1997a.

HURRELL, R. F. Preventing Iron Deficiency Through Food Fortification. **Nutr. Rev.**, v. 55, n. 6, p.210–222, 1997b.

JACKSON, M. The assessment of bioavailability of micronutrients: Introduction. **Europ. J. Clin. Nutr.**, v. 51, Suppl. 1. S1-S2, 1997.

KOENIG, R.J., BLOBSTEIN, S.H., CERAMI, A. Structure of Carbohydrate of Hemoglobin A_{1c}. **J. Biol. Chem.**, v.252, n. 9, p. 2992–2997, 1977.

LAHEY, M., GUBLER, C., CHASE, M., CARTWRIGHT, G., WINTROBE, M. Studies on copper metabolism. Hematologic manifestations of copper deficiency in swine. **Blood**. v.7, n.11, p.1053–1074, 1952.

LEE, G.R., NACHT, S., LUKENS, J., CARTWRIGHT, G. Iron metabolism in copper-deficient swine. **J. Clin. Inv.**, v.47. p.2058–2069, 1968.

LYNCH, S.R., BAYNES, R.D. Deliberations and evaluations of the approaches, endpoints and paradigms for iron dietary recommendations. **J. Nutr.**, v. 126, n.9S, p.2404S-2409S, 1996.

MAFFIA, L.M., ALVARENGA, S.C., BICUDO, M.H. Hábitos alimentares de famílias e estado nutricional de pré-escolares do meio rural do estado de Minas Gerais. **Rev. Oikos**. v.6, n.2, p. 9-16, 1990.

MAHAN, L.K., ESCOTT-STUMP, S. Krause: **Alimentos, nutrição & dietoterapia**. 9. ed. São Paulo: Roca, 1998. 981p.

MAKITA, Z., VLASSARA, H., RAYFIELD, E., CARTWRIGHT, K., FRIEDMAN, E., RODBY, R., CERAMI, A., BUCALA, R. Hemoglobin-AGE: A Circulating Marker of Advanced Glycosylation. **Science**. v.258, p.651-653, 1992.

MARTÍNEZ, C., ROS, G., PERIAGO, M., LÓPEZ, G. Biodisponibilidad del hierro de los alimentos. **Arch. Lat. Nutr.**, v.49, n.2, p.106–113, 1999.

MAYER, E., ADIELS-TEGMAN, M. The prevalence of anemia in the world. **World Health Stat. Q.**, v.38, p.302-316, 1985.

MAYHAN, W. Nitric oxide accounts for histamine-induced increases in macromolecular extravasation. **Am. J. Physiol.**, v.266, p.H2369–H2373, 1994.

MILLER, J., McNEAL, L. Bioavailability of Egg Yolk Iron Measured by Hemoglobin Regeneration in Anemic Rats. **J. Nutr.**, v.113, p.115–123, 1983.

MILLER, D.D. Minerals. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 1996. p. 641- 645.

MIYAJIMA, H., TAKAHASHI, Y., SERIZAWA, M., KANEKO, E., GRITLIN, J. Increased plasma lipid peroxidation in patients with aceruloplasminemia. **F.R. Biol. Med.**, v.20, n. 5, p.757–760, 1996.

MUKHOPADHYAY, C.K., ATTIEH, Z.K., FOX, P.L. Role de ceruloplatin in cellular iron uptake. **Science**. v. 279. p.714–717, 1998.

NELSON, D., MORRIS, M. Exame básico do sangue. In: HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos & tratamento. Por métodos laboratoriais**. Primeira edição brasileira. São Paulo: Editora Manole Ltda., 1995. p. 641 – 699.

NJOROGE, F., FERNANDES, A., MONNIER, V. Mechanism of Formation of the Putative Advanced Glycosylation End Product and Protein Cross-link 2-(2-Furoyl)-4(5)-(2-furanyl) –1H-imidazole. **J. Biol. Chem.**, v.263, n.22, p. 10646-10652, 1988.

O'DELL, B. Biochemistry of Copper. **Med. Clin. North America.**, v. 60, n. 4, p. 687–703, 1976.

O'DELL, B. Cobre. In: ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. **Conocimientos actuales sobre nutrición**. Sexta edición. Washington, 1991, p. 301 – 308.

OLIVEIRA, L.F.A. **Efeito da ingestão da mistura de arroz e feijão na biodisponibilidade de ferro e cálcio**. Viçosa: UFV, 1997. 135p.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Anemias Nutricionais**. Genebra, 1972. 32p. (OMS – Série de Informes Técnicos, 503).

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD/ ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Las condiciones de salud en las Américas**. Washington, D.C.: ILSI Press, 1990. 2 v.

OSAKI, S., JOHSON, D.A., FRIEDEN, E. The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmina in normal human serum. **J. Biol. Chem.**, v.241, n. 12, p.2746–2751, 1966.

OSAKI, S., JOHNSON, D.A., FRIEDEN, E. The mobilization of iron from the perfused mammalian liver by a serum copper enzyme, ferroxidase I. **J. Biol. Chem.**, v. 246. n. 9. p. 3018 – 3023, 1971

PEDROSA, L., COZZOLINO, S. Alterações metabólicas e funcionais do cobre em diabetes mellitus. In: **Revista Nutricional**. Campinas, v. 12, n. 3, 1999. p. 213-224.

PROHASKA, J. Biochemical changes in copper deficiency. **J. Nutr. Biochem.**, v.1, p.452–461, 1990.

REDDY, M.B., COOK, J.D. Assessment of dietary determinants of nonheme-iron absorption in humans and rats. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.54, p.723–728, 1991.

REEVES, P., ROSSOW, K., BOBILYA, J. Zinc-induced metallothionein and copper metabolism in intestinal mucosa, liver, and kidney of rats. **Nutr. Res.**, v.13, p.1419–1431, 1993a.

REEVES, P., NIELSEN, F., FAHEY, G. 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 - 76 A Rodent Diet. **J. Nutr.**, v. 123, p.1939–1951, 1993b.

REISER, S., FERRETI, R., FIELDS, M., SMITH, J. Role of dietary fructose in the enhancement of mortality and biochemical changes associated with copper deficiency in rats. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.38, p.214–222, 1983.

ROJAS, A., CAVEDA, L., ROMAY, C., LOPEZ, E., VALDÉS, S., PADRÓN, J., GLARÍA, L., MARTINEZ, O., DELGADO, R. Effect of advanced glycosylation end products on the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.225, p.358–362, 1996.

- ROESER, H., LEE, G., NACHT, S., CARTWRIGHT, E. The role of ceruloplasmina in iron metabolism. **J. Clin. Invest.**, v.49, p.2408–2417, 1970.
- ROMANI, S.A.M.; LIRA, P.I.C.; FILHO, M.B.; SEQUEIRA, L.A.S.; FREITAS, C.L.C. Anemias em pré-escolares: diagnóstico, tratamento e avaliação. Recife-PE, Brasil. **Arch. Lat. Nut.**, v. 12, n. 2, p.159-167, 1991.
- RUBBO, H., DARLEY – USMAR, V., FREEMAN, B. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 9, p.809–820, 1996.
- SAARI, J., BODE, A., DAHLEN, G. Defects of Copper Deficiency in Rats Are Modified by Dietary Treatments that Affect Glycation. **J. Nutr.**, v.125, p. 2925–2934, 1995.
- SAARI, J., DAHLEN, G. Early and advanced glycation end-products are increased in dietary copper deficiency. **J. Nutr. Biochem.**, v.10, p.210-214, 1999.
- SAARI, J. Copper deficiency and cardiovascular disease: Role of peroxidation, glycation and nitration. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.78, n.10, p.848–855, 2000.
- SALGADO, J.M., SANTOS, A.C., FISCHER, C.A.G. Efeito da suplementação de fontes de minerais sobre a mistura arroz/feijão. **Rev. Oikos.** v.2, n.2, p. 2-17, 1983.
- SGARBIERI, V. **Alimentação e nutrição. Fator de saúde e desenvolvimento.** Campinas: Editora da Universidade Estadual de Campinas, 1987. 387p.
- SHAKLAI, N., GARLICK, R., BUNN, H.F. Nonenzymatic Glycosylation of Human Serum Albumin Alters Its Conformation and function. **J. Biol. Chem.**, v.259, n.6, p.3812–3817, 1984.
- SHERMAN, A.R., TISSUE, N.T. Tissue iron, copper and zinc levels in offspring of iron-sufficient and iron-deficient rats. **J. Nutr.**, v.111. p.266–275, 1981.
- SIMÕES, M., MOURA, E., SGARBIERI, V., BUENO DE FIGUEIREDO, D. Avaliação do impacto de um suplemento nutricional rico em ferro hemático. **Cad. Saúde Publ.**, v.15, n.4, p.871–881, 1999.
- SMITH, S., MEDLICOTT, M. The blood picture of iron and copper deficiency anemias in the rat. **Am. J. Physiol.**, v.141, p.354–358, 1944.

SOLOMONS, N. Physiological Interaction of Minerals. In: BODWELL, C., ERDMAN, J. (Eds). **Nutrient Interactions**. New York, 1988. p. 133.

TURNLUND, J. Copper. In: SHILLS, M.E., OLSON, J.A., SHIKE, M. **Modern Nutrition in health and disease**. 8.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. p.231 – 241.

UNDERWOOD, E. **Trace Elements in Human and Animal nutrition**. New York: Academic Press, 1977. p. 56-108.

VAN CAMPEN, D., GROSS, E. Influence of ascorbic acid on the absorption of copper by rats. **J. Nutr.**, v.95, p.617–622, 1968.

VANDENBERG, G.J., VANHOUEWELINGEN, F., LEMMENS, A. G., BEYNEN, A. C. Impaired iron status in rats as induced by copper deficiency. *Biol. Trace Elem. Res.*, v.35, n.1, p.77–79, 1992.

VANNUCCHI, H., FREITAS, M.L.S., SZARFAC, S.C. A prevalência de anemias nutricionais no Brasil. **Cad. Nutr.**, v.4, p.7–26, 1992.

VLASSARA, H., BROWNLEE, M., CERAMI, A. Nonenzymatic glycosylation of peripheral nerve protein in diabetes mellitus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 78, n.8, p.5190–5192, 1981.

WALTER, T. A carência de ferro na criança e as repercussões em suas habilidades cognitivas. **Rev. Dieta e Saúde**. v.3, n.1, p.2-5, 1994.

WILLIAMS, D., LOUKOPOULOS, D., LEE, G., CARTWRIGHT, G. Role of Copper in mitochondrial iron metabolism. **Blood**. v.48, n.1, p.77–85, 1976.

WOLIN, M., HINTZE, T., SHEN, W., MOHAZZAB-H, K., XIE, Y. Involvement of reactive oxygen and nitrogen species in signaling mechanisms that control tissue respiration in muscle. **Biochem. Soc. Trans.**, v.25, p.934–939, 1997.

WOO, J., CANNON, D. Intermediários metabólicos e íons inorgânicos. In: HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos & tratamento. Por métodos laboratoriais**. Primeira edição brasileira. São Paulo: Editora Manole Ltda., 1995. p.159–195.

WOOD, R., HAN, O. Recently Identified Molecular Aspects of Intestinal Iron Absorption. **J. Nutr.**, v.128, p.1841–1844, 1998.

WORWOOD, M. Regulação do metabolismo do ferro. In: Anais Nestlé. **Deficiência de ferro no lactente e na criança**. v. 52. São Paulo: Nestlé Nutrition Services, 1996. p.1-10.

YAZAKI, M., YOSHIDA, K., NAKAMURA, A., FURIHATA, K., YONEKAWA M., OKABE, T., YAMASHITA, N., OHTA, M., IKEDA , S. A novel splicing mutation in the ceruloplasmin gene responsible for hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis. **J. Neurol. Sci.**, v.156, n.1, p.30–34, 1998.

YIP, R., DALLMAN, P.R. Hierro. In: ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD/ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Conocimientos actuales sobre nutrición**. 7.ed. Washington, D.C.: ILSI Press, 1997. Cap. 28, p. 249 – 311 (Publicación Científica, 565).

YOUNG, S.P., FAHMY, M., GOLDING, S. Ceruloplasmin, transferrin and apotransferrin facilitate iron release from human liver cells. **FEBS Lett.**, v. 411. p.93–96, 1997.

APÊNDICE

Quadro 1A – Resumo da análise de variância para Ganho de hemoglobina (GHb), Hematócrito (HEMAC), Ferro sérico (Fe), Hemoglobina glicosilada (Hbg), em função de diferentes níveis de cobre nas dietas Padrão e Experimental

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios			
		GHb	HEMAC	Fe	Hbg
Dietas (D)	1	26,2784 **	18,0625 n.s.	86,1184 n.s.	12,3816 **
Níveis (N)	3	4,9833 n.s.	18,7708 n.s.	3750,3646n.s.	4,2062 **
D x N	3	0,4410 n.s.	2,1042 n.s.	583,0664 n.s.	0,4222 n.s.
Fatorial vs. Testemunha	1	30,6408	351,5625	27304,5330	0,7260
Blocos	7	12,7184	8,5218	2438,2300	0,5226
Resíduo	56	2,0734	10,9634	2356,2470	0,6277

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

n.s. não significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

Quadro 2A – Resumo da análise de variância para Ganho de peso, Consumo alimentar e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) em função de diferentes níveis de cobre nas dietas Padrão e Experimental

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios		
		Ganho de peso	Consumo alimentar	CEA
Dietas (D)	1	60,0625 n.s.	1,4102 n.s.	0,0004 n.s.
Níveis (N)	3	347,1042 n.s.	379,7985 n.s.	0,0091 n.s.
D x N	3	78,4375 n.s.	66,0364 n.s.	0,0020 n.s.
Fatorial vs. Testemunha	1	175,5620	633,9896	0,0002
Blocos	7	339,6746	455,4215	0,0104
Resíduo	56	251,2416	218,5014	0,0066

n.s. não significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F

