

THOMÁS VALENTE DE OLIVEIRA

ARROZ DOCE FORTIFICADO COM Fe, Zn, TIAMINA E ÁCIDO FÓLICO (ULTRA RICE®): DA FORMULAÇÃO À BIODISPONIBILIDADE DE Fe EM RATOS WISTAR

Dissertação 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
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa – Campus Viçosa

T

O48a
2016

Oliveira, Thomás Valente de, 1989-
Arroz doce fortificado com Fe, Zn, tiamina e ácido fólico (Ultra-Rice®) : da formulação à biodisponibilidade de Fe em ratos Wistar / Thomás Valente de Oliveira. – Viçosa, MG, 2016. xiv, 106f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Inclui apêndices.

Orientador: Eduardo Basilio de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Alimentos - Teor protéico. 3. Ferro - Bioviabilidade. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

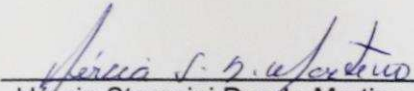
CDD 22. ed. 664

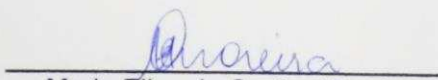
THOMÁS VALENTE DE OLIVEIRA

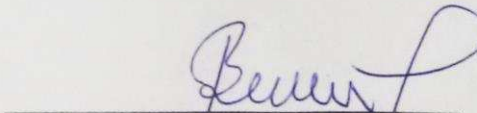
ARROZ DOCE FORTIFICADO COM Fe, Zn, TIAMINA E ÁCIDO FÓLICO (ULTRA RICE®): DA FORMULAÇÃO À BIODISPONIBILIDADE DE Fe EM RATOS WISTAR

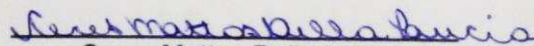
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

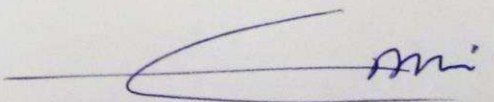
APROVADO: 02 de agosto de 2016


Hércia Stampini Duarte Martino


Maria-Eliza de Castro Moreira


José Benício Paes Chaves
(Coorientador)


Ceres Mattos Della Lucia
(Coorientador)


Eduardo Basílio de Oliveira
(Orientador)

*A meu pai Edimilson, meu eterno motivador,
minha mãe Rose, meu irmão Samuel e minha esposa Janaína,
com muito amor e carinho, dedico!*

Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.

Sarah Westphal

AGRADECIMENTOS

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

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), e ao Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) pela oportunidade e pelos recursos investidos durante o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao IPAF - Instituto de Estudos e Pesquisas em Fortificação de Alimentos e Combate à Fome Oculta, pela concessão de recursos intelectuais e financeiros ao projeto.

Aos meus pais Edimilson (*in memoriam*) e Rose Elaine, pelo amor incondicional, pelos exemplos, pelos conselhos e pelo incentivo constante.

Ao meu irmão Samuel, pela amizade, carinho e companheirismo.

À minha esposa Janaína, pela força nos momentos mais difíceis, pelo amor e carinho sempre presentes, pelo apoio em minhas decisões, por ser compreensiva e por fazer parte ativamente da minha vida.

Ao professor Eduardo Basílio de Oliveira, pela toda orientação profissional, por compartilhar seus conhecimentos científicos sem hesitar e pela dedicação e cuidado que teve com o nosso trabalho. Agradeço também pelas orientações pessoais, pela amizade e compreensão, pelos conselhos, e pela confiança.

À Prof^a. Hércia Stampini Duarte Martino por me acolher carinhosamente como um dos membros de sua equipe e por abraçar este projeto fornecendo recursos intelectuais e financeiros para que ele se tornasse realidade.

À Prof^a. Ceres Mattos Della Lúcia, pelas sugestões ao longo do trabalho, sendo sempre muito amável e atenciosa.

Ao Prof. José Benício Paes Chaves e à Prof^a. Mônica Ribeiro Pirozi, pelas preciosas sugestões durante a elaboração do projeto, por contribuir na busca por recursos para o seu desenvolvimento e pela amizade.

À Maria Eliza de Castro Moreira, por contribuir ativamente durante o experimento de biodisponibilidade de ferro, desde a elaboração da proposta até a execução das análises, sempre disponível para retirar qualquer dúvida, compartilhando seu conhecimento e experiência.

À Renata Celi Lopes Toledo, pelas contribuições no experimento de biodisponibilidade de ferro e por me auxiliar nas compras de materiais e reagentes.

À Sabrina Késsia Gonçalves Pereira, por sempre estar disponível para ajudar que solicitada.

Aos amigos do Laboratório de Operações e Processos - LOP, em especial ao José Antônio Lafeté Junior, Thaís Jordânia Silva, Maurício Leite, Lucas Souza Soares,

Matheus Lopes Amorim, Zoila Rosa Nieto Galvan, Andressa Mendes, Mara Rose de Oliveira e Kely de Paula Correa, pela amizade e pelo excelente clima de trabalho.

À toda equipe do laboratório de nutrição experimental e agregados, em especial à Sâmara Lima, Andressa Rodrigues, Desirrê Morais Dias, Júlia Dourado Caliman, Fernanda Araújo, Mariana Juste Bárbara Pereira, Ana Lima, Natália Galdino e Mariana Grancieri pelo acolhimento e amizade.

Aos estudantes de “NUT621 – Biodisponibilidade de Minerais”, por acreditarem que poderiam aprender com este projeto e pela contribuição efetiva na realização das tarefas diárias do experimento. Sem vocês teria sido muito mais difícil.

Ao Laboratório de Análise de Alimentos, em especial à Christiane pelo auxílio durante a realização das análises.

Ao Prof. Afonso Motta Ramos, por ceder, gentilmente, o Laboratório de Frutas e Hortaliças para realização de análises físico químicas, e à Marcela Zonta, Daniele Paula e Aline Inácio por acompanharem as análises.

Aos colegas do DTA 2, Laura Fernandes de Melo Correia, Lucia Maria Santos Xavier, Jane Sélia dos Reis Coimbra, pelo carinho, atenção e amizade.

Às diretoras, professoras e crianças da “Escola Municipal Coronel Antônio Faustino Duarte” e da “Creche Municipal Vó Zé”, em Paula Cândido, por terem acolhido o projeto e participado das análises sensoriais com grande disposição.

Às estagiárias Larissa Fernandes e Priscila Fialho pela dedicação e amizade durante os experimentos.

Às empresas Urbano, Olvebra e Bioclin por, gentilmente, fornecerem materiais e reagentes que viabilizaram a realização do projeto.

Aos demais amigos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

THOMÁS VALENTE DE OLIVEIRA, filho de Rose Elaine Valente de Oliveira e Edimilson Alves de Oliveira, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 04 de abril de 1989.

Em março de 2007 iniciou a graduação em Engenharia de Alimentos, na Universidade Federal de Lavras – UFLA. Em março de 2008 foi transferido para o curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa – UFV, concluído em agosto de 2013.

Em agosto do mesmo ano iniciou atividades como Analista de Gestão no Grupo Agroindustrial Mantiqueira, mantendo-se no cargo até agosto de 2014, quando ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de sua dissertação em 19 de agosto de 2016.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE QUADROS E TABELAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIações	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. ESTUDO BIBLIOGRÁFICO	5
3.1. Fome Oculta	5
3.2. Deficiência de micronutrientes na alimentação infantil	6
3.3. Ferro na alimentação infantil	7
3.3.1. Deficiência de ferro	7
3.3.2. Metabolismo de Ferro	11
3.3.3. Biodisponibilidade de ferro	16
3.4. A fortificação de alimentos	21
3.4.1. Tecnologia Ultra Rice®	25
3.4.2. Arroz doce fortificado e merenda escolar: uma alternativa contra a fome oculta?	29
3.5. Referências	32
4. MANUSCRITO I	40
4.1. INTRODUCTION	42
4.2. MATERIALS AND METHODS	43
4.2.1. Raw materials and ingredients	43
4.2.2. Formulations	43
4.2.3. Production process	45
4.2.4. Centesimal composition and minerals contents	47
4.2.5. Physicochemical analysis	48

4.2.6.	Consumer sensory acceptance testing	49
4.2.7.	Cost estimation	50
4.2.8.	Statistical analysis.....	50
4.3.	RESULTS	51
4.3.1.	Centesimal composition and mineral contents	51
4.3.2.	Physicochemical analysis	53
4.3.3.	Consumer sensory acceptance testing	57
4.3.4.	Cost estimation Economic indicators.....	59
4.4.	DISCUSSION.....	60
4.5.	CONCLUSION	63
4.6.	AKNOWLEDGEMENTS.....	63
4.7.	REFERENCES	64
5.	MANUSCRITO II	68
	ABSTRACT	69
5.1.	Introduction	70
5.2.	Experimental.....	71
5.2.1.	Setting and Sample.....	71
5.2.2.	Iron and calcium concentration of diets	72
5.2.3.	Animal and diets	72
5.2.4.	Blood tests	74
5.3.	Statistical Analysis	77
5.4.	RESULTS	78
5.4.1.	Iron bioavailability	78
5.4.2.	Gene expression of proteins involved in iron metabolism.....	81
5.5.	DISCUSSION.....	83
5.6.	CONCLUSION	86
5.7.	AKNOWLEDGEMENTS.....	86
5.8.	REFERENCE.....	86
6.	CONCLUSÕES GERAIS	90
	ANEXO 1.....	91

ANEXO 2.....	97
APENDICE 1.....	100
APENDICE 2.....	103

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 - Porcentagem de crianças com deficiência de vitamina A e Fe nos continentes e no mundo 7

Figura 2 - Esquema representativo do metabolismo de ferro 15

MANUSCRITO I

Figure 1 - Schematic representation of the production process and a mass balance for production of 100 kg of UR-M 46

Figure 2 - Schematic representation of the production process and a mass balance for production of 100 kg of UR-S 47

Figure 3 - Sensory evaluation questionnaire 50

Figure 4 - Iron (A), Zinc (B) and Calcium (C) concentrations in each formulation 53

Figure 5 - Occurrence of syneresis indicated by arrows after 20 days of storage at 5°C..... 56

Figure 6 - Color difference at 0 and 20 days observed visually 57

Figure 7 - Results of sensory acceptance testing by acceptance questionnaire (A) and intake remainder (B) 58

Figure 8 - Sensory acceptance testing by age groups by acceptance questionnaire (A) and intake remainder (B) 59

MANUSCRITO II

Figure 1 - Experimental design 74

Figure 2 - Total intake (A), body weight gain (B) and food efficiency ratio (FER) (C) of Wistar rats (n=8) 78

Figure 3 - Ca intake (A) and Fe intake (B)..... 79

Figure 4 - Depletion and repletion phase of hemoglobin levels 79

Figure 5 - Hb gain (A), Hemoglobin regeneration efficiency (HRE) (B); Relative biological value of HRE (RBV-HRE) (C)..... 80

Figure 6 - Serum iron (A), Liver iron (B) 81

Figure 7 - Effect of the ingestion of different iron sources on the gene expression of proteins in duodenal tissue. RT-PCR Analysis. DcytB (A), DMT-1 (B), Ferroportin (C), Hephaestin (D) 82

Figure 8 - Effect of different iron sources intake on the gene expression of proteins in liver tissue and serum content of these proteins. RT-PCR Analysis. Ferritin expression (A), Serum ferritin content (B), Transferrin expression (C), Serum transferrin content (D) 83

Figure 9 – Numbers 1-8 indicate the stages of heme and non-heme iron absorption: 1. Heme iron absorption by HCP-1; 2. Fe²⁺ release from the heme iron; 3. Conversion of Fe³⁺ to Fe²⁺ by DcytB; 4. Transport of Fe²⁺ from lumen to the enterocyte by DMT-1; 5. Provisional storage of Fe²⁺ in the ferritin form within the enterocyte; 6. Transport of Fe²⁺ of the enterocyte into the bloodstream mediated by ferroportin; 7. Oxidation of Fe²⁺ to Fe³⁺ by hephaestin; 8. Coupling of Fe³⁺ to apotransferrin and Fe ion transport to the needy tissue 85

LISTA DE QUADROS E TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 - Principais proteínas envolvidas no metabolismo de Fe	12
Quadro 1 - Estudos sobre a prevalência de deficiência de ferro e anemia ferropriva em crianças brasileiras	9
Quadro 2 - Estudos sobre a prevalência de deficiência de ferro e outros nutrientes em crianças da região centro-sul de Minas Gerais	10
Quadro 3 - Alguns trabalhos sobre potencializadores de absorção de Fe e outros minerais	17
Quadro 4 - Alguns estudos sobre inibidores de absorção de Fe e outros minerais	18
Quadro 5 - Alguns trabalhos relacionados à fortificação de alimentos em geral.....	23
Quadro 6 - Conteúdo de micronutrientes presentes em 50g de arroz polido e de Ultra Rice® crus e porcentagem, correspondente, da ingestão diária recomendada.....	25
Quadro 7 - Implantação do Ultra Rice® em países em desenvolvimento.....	27
Quadro 8 - Diferentes marcas de arroz doce industrializado comercializadas na França e seus respectivos preços no varejo.....	30
Quadro 9 - Alguns trabalhos em que o arroz doce foi objeto de estudo	31

MANUSCRITO I

Table 1 - Composition defined for each formulation	45
Table 2 - Results of centesimal composition analyses: moisture, carbohydrates, proteins, lipids, ash and dietary total fiber; for each formulation obtained by combination of the protein (cow's milk and SSE) and rice (common rice and Ultra Rice®) types	52
Table 3 - Results of physicochemical analyses: water activity, pH, total titrable acidity and colorimetry (L*, a*, b*, Hue* and Chroma*); for each formulation obtained by combination of the protein (cow's milk and SSE) and rice (common rice and Ultra Rice®) types after 0 and 20 days of storage at 5°C	55
Table 4 - Results of costs estimation, sale price estimation and economic indicators: total investment, break-even point, internal Rate of Return (IRR), payback (years), hurdle rate, net Present Value (NPV) for a production plant of 900 kg/day for fortified formulations (UR-M and UR-S).....	60

MANUSCRITO 2

Table 1 - UM and US formulations: centesimal composition, micronutrients (Ca, Fe, and Zn) contents and caloric density	72
Table 2 - Food and nutritional composition of diets with which rats were fed all along in vivo bioavailability and gene expression experiments	75
Table 3 - Sequence of primers used in RT-qPCR gene expression analyses	77

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIações

AC-L	Arroz doce com arroz comum e leite de vaca
AC-S	Arroz doce com arroz comum e SSE
AIN-93G	Dieta para ratos em crescimento, gestação e lactação
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
COSAN	Coordenação de Segurança Alimentar e Nutricional
Dcytb	Proteína citocromo duodenal B
DMT-1	Proteína Transportadora de Metal Divalente
FNDE	Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação
HCP1	Proteína heme-carreadora
HFE	Proteína alterada hemocromatose
HRE	Eficiência de Regeneração de Hemoglobina
L	Leite de vaca
mRNA	RNA mensageiro
P	Dieta AIN-93G com pirofosfato férrico micronizado
PNAE	Programa Nacional de Alimentação Escolar
SSE	Extrato hidrossolúvel de soja
S	Dieta AIN-93G com sulfato ferroso
Tf	Transferrina
TFR1	Receptor de Transferrina 1
TFR2	Receptor de Transferrina 2
UM	Dieta AIN-93G com arroz doce com Ultra Rice® e leite de vaca
US	Dieta AIN-93G com arroz doce com Ultra Rice® e SSE
UR	Ultra Rice®
UR-L	Arroz doce com Ultra Rice® e leite de vaca
UR-S	Arroz doce com Ultra Rice® e SSE
®	Marca registrada

RESUMO

OLIVEIRA, Thomás Valente de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2016. **Arroz doce fortificado com Fe e Zn, tiamina e ácido fólico (Ultra Rice®): da formulação à biodisponibilidade de Fe em ratos Wistar**. Orientador: Eduardo Basílio de Oliveira. Coorientadores: José Benício Paes Chaves, Mônica Ribeiro Pirozi e Ceres Mattos Della Lúcia.

A deficiência de ferro é um problema nutricional que atinge milhares de pessoas no mundo e alimentos fortificados como o Ultra Rice® podem contribuir na redução deste problema sem alterar o hábito alimentar do indivíduo e a um custo acessível. Assim, o desenvolvimento de alternativas que aumentem o acesso da população a alimentos como o Ultra Rice® é de grande importância. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma formulação de arroz doce fortificado com ferro, zinco, tiamina e ácido fólico à base de Ultra Rice® com adição de SSE (extrato hidrossolúvel de soja) como substituto do leite de vaca que atendesse às especificações do PNAE (Programa Nacional de Alimentação Escolar), caracterizá-la quanto à sua composição centesimal, aceitação sensorial, estabilidade físico química, custos e biodisponibilidade de ferro. Inicialmente, foram desenvolvidos dois controles contendo arroz comum e leite e outro com arroz comum e extrato hidrossolúvel de soja, AC-L e AC-S, respectivamente; e duas formulações fortificadas contendo Ultra Rice® com leite ou SSE, UR-L e UR-S, respectivamente. As formulações fortificadas obtiveram teor de ferro superior ao mínimo exigido pela ANVISA para um alimento fortificado, apresentaram boa estabilidade físico química e boa aceitação sensorial. Os custos das formulações fortificadas foram similares aos das sobremesas servidas nas escolas públicas brasileiras como frutas e iogurte. No segundo experimento, avaliou-se a biodisponibilidade de ferro e a expressão gênica das proteínas envolvidas no metabolismo de ferro das formulações fortificadas à base de leite (UR-L) e SSE (UR-S). Quatro grupos experimentais foram testados variando-se a fonte de ferro da dieta: sulfato ferroso (S); pirofosfato férrico micronizado (P); Ultra Rice® + leite (UM); Ultra Rice® + SSE (US). Os grupos P, UM e US, apresentaram menor HRE em relação ao grupo S ($p < 0,05$) e os grupos UM e US obtiveram melhor biodisponibilidade de ferro em relação ao grupo P ($p < 0,05$), e não diferindo entre si ($p > 0,05$). O maior teor de cálcio da formulação contendo leite não prejudicou a absorção do ferro e a matriz do Ultra Rice® melhorou a biodisponibilidade do pirofosfato férrico micronizado. As duas formulações fortificadas são excelentes fontes ferro que podem reduzir risco do risco de deficiência de ferro a grupos vulneráveis como crianças, gestantes e lactentes.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Thomás Valente de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2016. **Rice-based fortified dessert with Fe, Zn, thiamine and folic acid (Ultra Rice®): from formulation to iron bioavailability in rats *Wistar***. Adviser: Eduardo Basílio de Oliveira. Co-advisers: José Benício Paes Chaves, Mônica Ribeiro Pirozi e Ceres Mattos Della Lúcia.

Iron deficiency is a nutritional problem that affects many people worldwide and fortified foods such as Ultra Rice® can contribute reducing this problem without change the food habits and with affordable cost. Thus, the development of alternatives to increase the population's access to food as the Ultra Rice® have great relevance. The aim of this study was to develop a rice dessert fortified with iron, zinc, thiamine and folic acid (Ultra Rice® based) and using SSE (soy soluble extract) as a substitute for cow's milk and to determine its chemical composition, sensory acceptance, physicochemical storage stability and iron bioavailability. Firstly, two controls were developed with common rice and milk or SSE, CR-M and CR-S, respectively; and two fortified formulations containing Ultra Rice® with milk or SSE, UR-L and UR-S, respectively. The fortified formulations obtained higher iron content than the minimum required by ANVISA for a fortified food, showed good physicochemical stability and good sensory acceptance. The fortified formulations costs were similar to the desserts served in Brazilian public school meals as fruits and yogurts. In the second experiment, the bioavailability of iron and the gene expression of proteins involved in iron metabolism were evaluated for fortified desserts with milk (UR-M) and SSE (UR-S). Four experimental groups were tested changing the diet iron source: ferrous sulfate (S); micronized ferric pyrophosphate (P); Ultra Rice® + milk (A); Ultra Rice® + SSE (US). The P, UM and US groups lower HRE than S group ($p < 0.05$); UM and US groups not differing between them ($p > 0.05$) but had better iron bioavailability than P group ($p < 0.05$). The higher calcium level of milk formulation has no negative effect on the iron absorption and it is possible that Ultra Rice® matrix improved the bioavailability of micronized ferric pyrophosphate. The two fortified formulations with Ultra Rice® are good iron sources and can contribute positively in reducing iron deficiency in risk groups as breastfed infants, children and pregnant women.

1. INTRODUÇÃO

Cerca de um terço da população mundial apresenta deficiência nutricional de um ou mais micronutrientes essenciais (GREBMER et al., 2014). A carência não explícita de um ou mais micronutrientes dá-se, usualmente, o nome de “fome oculta” (RAMALHO, 2011). A fome oculta geralmente não é identificada por meio de exames clínicos de rotina, mas pode originar alterações fisiológicas que trazem grandes prejuízos à saúde do indivíduo. As causas principais da fome oculta são atribuídas às condições econômicas, geográficas, educacionais e culturais da população afetada, que limitam o acesso a uma alimentação nutritiva e diversificada (RAMALHO, 2011; KENNEDY et al., 2003).

As crianças são consideradas grupo de risco para a incidência e prevalência de fome oculta, pois a ingestão dietética influencia diretamente o seu crescimento, desenvolvimento e formação de hábitos alimentares (ALVES et al., 2013). Em casos mais graves, a deficiência nutricional neste estágio da vida pode ter como consequências retardo no crescimento, subdesenvolvimento físico e mental e, em situações extremas, a morte da criança (RAMALHO, 2011; FAO, 2010).

Em 2011, 25% das crianças em todo mundo possuíam anemia por carência de ferro (STOLTZFUS, 2011), que é o mineral cuja deficiência nutricional é a maior no mundo (ASHONG *et al.*, 2012) e, em particular, no Brasil (RAMALHO, 2011). Em específico, a região de Viçosa, na Zona da Mata de Minas Gerais (20°45'14"S; 42°52'55"W), está inserida em uma área endêmica para carências nutricionais, principalmente com relação ao ferro, que acomete negativamente o pleno desenvolvimento das crianças em idade pré-escolar (DELLA LUCIA, 2013).

Quatro diferentes estratégias de intervenção para auxiliar no combate à fome oculta têm sido apresentadas por profissionais e estudiosos da área: (1) diversificação alimentar, que consiste no aumento da ingestão de alimentos ricos nos micronutrientes em deficiência; (2) a suplementação, que consiste na administração periódica de elevadas doses desses micronutrientes; (3) a fortificação de alimentos, por meio da adição de micronutrientes em alimentos formulados comumente consumidos, e (4) a biofortificação, que consiste no aumento da concentração de micronutrientes de culturas por meio de melhoramento genético (LEE et al., 2000).

A técnica de fortificação de alimentos, quando aplicada em alimentos consumidos regularmente, é uma alternativa bastante vantajosa, pois consegue atingir parte expressiva da população, não exige alteração de hábitos alimentares e está associada a baixo risco de toxicidade. Segundo dados de 2012, comparada com outras tecnologias que visam à melhoria do estado nutricional dos indivíduos, a fortificação de alimentos é

aquela que tem apresentado os menores custos, além de melhores resultados a curto e médio prazos (JACINTO, 2012).

A empresa “Bom Dente International” (Bellingham, Washington, Estados Unidos) desenvolveu em 1989 o Ultra Rice[®], um formulado à base de farinha de arroz culturalmente apropriado a regiões em que o consumo de arroz é frequente, e de baixo custo em relação a vários produtos fortificados presentes no mercado. Contém vitaminas e minerais (ferro, zinco, tiamina e ácido fólico) e se assemelha ao arroz tradicional em tamanho, forma e cor (PATH, 2013). O Ultra Rice[®] é um alimento seguro, seus nutrientes são quimicamente estáveis, apresentam elevada estabilidade após processamento e é sensorialmente bem aceito pela população (SEGALL, 2012; MATTHIAS, 2012; CALI, 2008). Estudos realizados no Brasil (DELLA LUCIA et al., 2016), México (HOTZ et al., 2008), Colômbia (CALI, 2008), por exemplo, já confirmaram que o Ultra Rice[®] pode contribuir positivamente no combate à deficiência de ferro em crianças e mulheres em idade fértil.

As escolas públicas podem contribuir de forma efetiva na distribuição de alimentos fortificados, por meio da merenda escolar. Para tal, faz-se necessário o desenvolvimento de produtos fortificados alternativos que atraiam a atenção das crianças e atendam às especificações do Programa Nacional de Alimentação (PNAE). Neste contexto, o arroz doce aparece como uma opção estratégica, pois é uma das poucas preparações doces que possuem autorização do PNAE para serem servidas diariamente nas escolas brasileiras, devido ao fato de não exigirem expressiva adição de sacarose (BRASIL, 2014). No entanto, o leite, ingrediente clássico do arroz doce tradicional, possui componentes que prejudicam a absorção de ferro, sendo os principais deles o cálcio, as caseínas e algumas proteínas séricas (HURRELL et al., 1989). Desta forma, produtos de origem vegetal, como o extrato hidrossolúvel de soja, podem ser uma alternativa plausível para formular variantes do arroz doce tradicional sem a inclusão de leite de vaca na composição.

Tendo em vista este contexto, é premente que profissionais e áreas como ciência/tecnologia/engenharia de alimentos e nutrição contribuam para o desenvolvimento de produtos inovadores que melhorem o acesso da população necessitada a alimentos fortificados, como o Ultra Rice[®], principalmente em grupos de risco como as crianças. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação de arroz doce fortificado à base de Ultra Rice[®] com adição de extrato hidrossolúvel de soja como substituto do leite de vaca, atendendo às especificações do PNAE para sobremesas escolares. Além disso, para as diferentes formulações inicialmente propostas, estudou-se a composição centesimal; a aceitação sensorial por crianças em idade escolar e pré-escolar; estabilidade físico química com relação ao pH, acidez total titulável, cor e atividade de água; e a biodisponibilidade de ferro em ratos *Wistar* por

meio de índices hematológicos e expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro.

A presente dissertação foi estruturada da seguinte maneira:

i) Um capítulo intitulado “Estudo Bibliográfico” em que é apresentado um panorama sobre a fome oculta e a deficiência de ferro infantil no Brasil e no mundo; descreve o metabolismo de ferro e fatores que influenciam a biodisponibilidade do mineral, além de mostrar algumas alternativas em discussão no meio industrial e acadêmico para redução da fome oculta como a fortificação de alimentos, o Ultra Rice® e o arroz doce fortificado, sendo o último, nossa proposta de trabalho.

ii) Em seguida, é apresentado o manuscrito de artigo científico com o título provisório “Rice-based dessert fortified with Ultra Rice® formulated with cow’s milk or soy soluble extract: sensory acceptance by school children and technological aspects” a ser inicialmente submetido para apreciação ao periódico *Food and Bioprocess Processing*. Nesse manuscrito são reportados os experimentos, resultados e discussão acerca do desenvolvimento de uma sobremesa fortificada à base de Ultra Rice® utilizando extrato hidrossolúvel de soja como fluido substituto para o leite de vaca.

iii) Por fim, apresentamos um segundo manuscrito de artigo científico intitulado provisoriamente “The Ultra Rice® matrix increased the iron absorption in fortified cow’s milk-based desserts and soy extract-based desserts”, a ser inicialmente submetido ao periódico *Food & Function*. Aqui, são reportados os experimentos, resultados e discussão acerca da biodisponibilidade de ferro em ratos *Wistar* das sobremesas formuladas com leite de vaca e extrato hidrossolúvel de soja e fortificadas com pirofosfato férrico micronizado por meio da adição de Ultra Rice® em relação à biodisponibilidade do sulfato ferroso.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Formular arroz doce fortificado com ferro, zinco, tiamina e ácido fólico, à base de Ultra Rice® utilizando como ingredientes leite de vaca ou extrato hidrossolúvel de soja como seu substituto que atenda às especificações do Programa Nacional de Alimentação Escolar, e, além disso, avaliar a biodisponibilidade *in vivo* do ferro presente nas formulações desenvolvidas.

2.2. Objetivos Específicos

- Elaborar quatro formulações de arroz doce, diferenciando quanto à fonte de arroz (arroz polido comum ou arroz fortificado contendo Ultra Rice®) e quanto ao ingrediente fluido (leite de vaca ou extrato hidrossolúvel de soja);
- Caracterizar as formulações quanto a sua composição em umidade, lipídios, carboidratos, fibra alimentar total, proteínas e resíduo mineral fixo, em particular às concentrações de ferro, cálcio e zinco;
- Avaliar a estabilidade físico-química com relação ao pH, acidez total titulável, cor e atividade de água das formulações imediatamente após processamento e após 20 dias sob armazenamento a 5°C;
- Realizar teste de aceitação sensorial das formulações por crianças em idade escolar e pré-escolar em escolas e creches públicas da microrregião de Viçosa;
- Avaliar a biodisponibilidade *in vivo* de Fe das diferentes formulações em ratos *Wistar* por meio de índices hematológicos e expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro;
- Propor um fluxograma do processo produtivo, incluindo balanços de massa e de energia, além de indicação de *layout* de equipamentos;
- Estimar os custos de produção dos produtos propostos;
- Simular a viabilidade econômica de uma unidade piloto de processamento, por meio dos custos de produção dos produtos propostos.

3. ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

3.1. Fome Oculta

A fome oculta como uma deficiência marginal de um ou mais micronutrientes, que não é claramente identificada no indivíduo ou na população estudada, sendo, contudo, lesiva à saúde (RAMALHO, 2009). Micronutrientes são vitaminas e minerais essenciais aos seres humanos para estimular o crescimento celular e o funcionamento correto do metabolismo (KENNEDY et al., 2003). Recentemente, a fome oculta afetava cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo, ou seja, quase um terço da população mundial (GREBMER et al., 2014).

A fome oculta causa alterações fisiológicas não facilmente perceptíveis em exames clínicos de rotina, sendo o estágio anterior ao surgimento de sinais clínicos de carência detectáveis. Com frequência causa prejuízos à saúde, levando a um maior risco de morbimortalidade, mesmo que não se evolua para os estágios terminais de deficiência (RAMALHO, 2011). Este tipo de deficiência nutricional é observado sobretudo em países em desenvolvimento onde, muitas vezes, a falta de recursos materiais e/ou educacionais ocasiona a prática de dietas pouco variadas em frutas, legumes, carnes, leite, ovos e quantidades adequadas de gordura ou óleo vegetal para um aporte correto de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) (KENNEDY et al., 2003).

A desinformação sobre hábitos alimentares saudáveis, preferências, associada a crenças e costumes regionais, pode fazer com que alguns indivíduos excluam ou tenham o consumo reduzido de alimentos fontes de certos nutrientes. Outras causas, como pouca disponibilidade de alimentos na natureza, aumento das demandas nutricionais como na infância e durante a gravidez, restrições alimentares e situações patológicas já instaladas podem, também, estar associadas à fome oculta (RAMALHO, 2011). A falta de diversificação alimentar é apontada como problema grave, principalmente, nos países em desenvolvimento, em que as dietas são majoritariamente compostas por alimentos ricos em amido, e o acesso a alimentos ricos em proteínas animais, frutas e hortaliças é restrito (DIAS et al., 2015).

Quando se enraíza, a fome oculta não impede apenas as pessoas de se desenvolverem e prosperarem como membros da sociedade, mas influencia em toda cadeia geradora de recursos para a região ou país. Isso acontece porque a manutenção da população em condições de má nutrição e precariedade de saúde reduz a capacidade produtiva dos indivíduos e, como consequência, há um impacto negativo no crescimento econômico local, perpetuando as condições de pobreza (GREBMER et al., 2014). Isso demonstra por que não apenas o direito à alimentação, mas também o acesso ao tipo certo de alimento e no momento necessário é importante tanto para o bem-estar das pessoas quanto para o desenvolvimento do País como um todo. As

consequências da fome e da desnutrição na saúde da população são fatores suficientes para impedir o desenvolvimento econômico e social de comunidades e de grandes nações (FAO, 2010). De fato, a fome oculta tem sido apresentada como responsável por aproximadamente sete por cento da carga global de doenças em todo mundo (STOUT, 2013).

A FAO (2010) ressalta que para se tratar os males gerados pela desnutrição são despendidas somas elevadas pelos governos, enquanto os valores para se prevenir este problema são muito inferiores. Desta forma, investimentos governamentais na prevenção da desnutrição infantil ou adulta podem refletir em uma grande economia de recursos.

Em curto prazo, a suplementação vitamínica e mineral pode ajudar de maneira pontual populações vulneráveis a combater a fome oculta. Mas de acordo com Grebmer et al. (2014) a fome oculta pode ser solucionada a longo prazo por meio da diversificação da alimentação, fortificação de alimentos comercializados e da biofortificação de culturas alimentares.

3.2. Deficiência de micronutrientes na alimentação infantil

Crianças menores de seis anos, gestantes, nutrízes e lactentes são consideradas grupos de risco para a fome oculta, pois suas necessidades nutricionais são proporcionalmente maiores que as de um adulto comum (RAMALHO, 2011). Embora possa parecer paradoxal, uma criança obesa pode sofrer de fome oculta, já que este problema não necessariamente está ligado à imagem típica de uma pessoa desnutrida, muito magra e faminta (AGR PARTINERS, 2013). Com efeito, em países urbanizados e com maior renda *per capita*, é comum que a fome oculta coexista em crianças com sobrepeso ou obesas que consomem muita gordura e carboidratos (GURALNIK et al., 2004).

Pelo fato de o zinco não possuir um marcador efetivo e simples, acredita-se que a sua deficiência é tão frequente quanto a de ferro (DELLA LUCIA, 2013), podendo prejudicar o crescimento das crianças e, em casos extremos de deficiência, levar ao nanismo. As deficiências de zinco e ferro podem coexistir, em razão da semelhança de suas fontes alimentares e dos fatores que impedem a absorção desses minerais (SILVA et al., 2006). Quando a carência de micronutrientes ocorre de forma simultânea, pode haver consequências graves para a saúde da criança (SENA e PEDROSA, 2005). A energia ingerida não é bem utilizada pelos músculos causando cansaço e fraqueza e, com o tempo, as crianças podem apresentar até mesmo alterações cognitivas e comportamentais (SILVA et al., 2006).

Crianças em idade escolar e pré-escolar são consideradas grupos de risco para deficiências de tiamina e ácido fólico, dois micronutrientes com papel fundamental no

metabolismo de ferro contribuindo positivamente na redução da prevalência de anemia ferropriva (DELLA LUCIA, 2013). O ácido fólico é um dos micronutrientes essenciais para a manutenção da função eritropoiética normal e fundamental para o funcionamento e crescimento normais do organismo (IYER e TOMAR, 2009). Já a tiamina, além de contribuir na redução da prevalência de beribéri, participa como cofator enzimático no metabolismo energético, especialmente de carboidratos e aminoácidos de cadeia ramificada, contribuindo significativamente para o crescimento e desenvolvimento infantil (VIEIRA et al., 2008).

Como consequências nefastas da deficiência de micronutrientes na alimentação infantil, pode-se observar retardo no crescimento, subdesenvolvimento físico e mental e aumento da mortalidade (RAMALHO, 2011; FAO, 2010). A desnutrição infantil está presente em 35% de todas as mortes de crianças menores de cinco anos ao redor do mundo, estando relacionada a quase todas as causas diretas dessas mortes (SEGALL, 2012). Até 2013, em média, 3,1 milhões de crianças morreram por desnutrição a cada ano, sendo 1,1 milhão causada por deficiência de micronutrientes (BLACK et al., 2013).

Na Figura 1, observa-se uma estimativa de crianças que sofrem de deficiência de vitamina A e ferro nos continentes e no mundo.

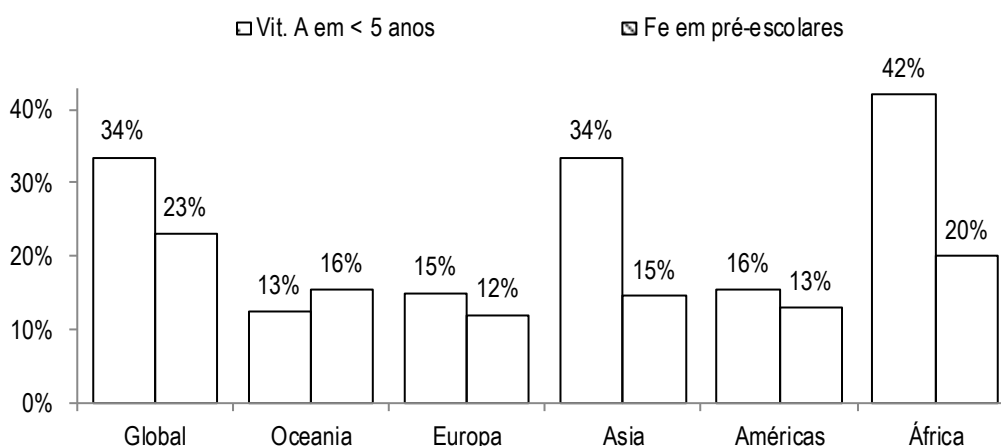


Figura 1 - Porcentagem de crianças com deficiência de vitamina A e Fe nos continentes e no mundo.
Fonte: Adaptado de GREBMER et al. (2014).

3.3. Ferro na alimentação infantil

3.3.1. Deficiência de ferro

Apesar do ferro ser o quarto elemento mais abundante na natureza, sua deficiência é a carência nutricional mais prevalente no mundo, atinge todas as camadas sociais e ocorre majoritariamente em países em desenvolvimento (SILVA e MURA, 2011).

A anemia é definida como uma redução na capacidade de transporte de oxigênio dos glóbulos vermelhos, que ocorre como resultado devido à diminuição de

hemoglobina ou de uma redução no número total de células vermelhas do sangue (KENNEDY et al., 2003). Para serem diagnosticados com anemia ferropriva homens devem apresentar nível de hemoglobina inferior a 13 mg/dL, mulheres e crianças de 6 a 14 anos, inferior a 12 mg/dL, e gestantes e crianças de 6 meses a 6 anos, inferior a 11 mg/dL (WHO, 2008). A causa mais comum da anemia é a deficiência de ferro, porém ela também pode ocorrer devido à carência no organismo de vitamina B12 ou de ácido fólico, defeitos hereditários congênitos em células vermelhas, perdas de sangue, ou a partir de infecções parasitárias como malária e a ancilostomose (KENNEDY et al., 2008).

Estima-se que, no ano de 2013, a deficiência de ferro atingia quatro bilhões de indivíduos e que a anemia ferropriva acometia mais de dois bilhões de pessoas no mundo, sobretudo em países subdesenvolvidos e em populações de baixa renda (GREBMER et al., 2014). Dentre os grupos populacionais, as crianças em idade pré-escolar (0 a 5 anos) são as mais afetadas (WHO, 2008). Nos 20 países mais afetados pela fome oculta no mundo, nos quais o Brasil está incluído, 40% das crianças pré-escolares apresentam algum tipo de atrofia muscular devido à deficiência de ferro e vitamina A (SIGHANDLIFE, 2014). Resumidamente, alguns trabalhos realizados ao longo dos últimos anos, sobre a situação das crianças brasileiras quanto à deficiência de ferro e a prevalência de anemia são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Estudos sobre a prevalência de deficiência de ferro e anemia ferropriva em crianças brasileiras

Amostra	Resultados	Ref.
Crianças do Acre de 12 a 14 meses.	23% das crianças apresentaram anemia e 76% possuíam deficiência de ferro.	(OLIVEIRA et al., 2016)
Crianças de Porto Alegre de 6 a 12 meses.	26,5% das crianças apresentaram anemia por deficiência de ferro e 48% apresentaram deficiência de ferro.	(FERRI et al., 2014)
Crianças de São Paulo de 60 a 65 meses.	Prevalência de 36% de anemia por deficiência de ferro.	(COSTA et al., 2011)
3.499 crianças menores de 5 anos de todo Brasil.	20,9% de crianças com hemoglobina < 11 mg/dL, sendo que 8,7% apresentavam hemoglobina < 9,5 mg/dL.	(BRASIL, 2009)
Crianças menores de 12 meses de idade de cinco regiões brasileiras.	65,4% de prevalência de anemia.	(SPINELLI et al., 2005)
Crianças brasileiras.	Em 2004, 45 a 50% das crianças brasileiras apresentavam anemia por falta de ferro.	(ACC/SNC, 2004)
Crianças nordestinas de 6 a 59 meses de idade.	40,9% de prevalência de anemia.	(OSÓRIO et al., 2004)
2.223 crianças menores de 5 anos de 10 capitais brasileiras.	54% de prevalência de anemia.	(FISBERG et al., 2001)
Crianças de Porto Alegre de 12 a 23 meses de idade.	65,6% de prevalência de anemia.	(SILVA et al., 2001)

Observa-se em todos os trabalhos que a prevalência de anemia foi superior a 20% em crianças em idade escolar e pré-escolar, comprovando que, no Brasil, a deficiência de ferro durante a infância tem sido um problema de saúde pública.

De forma similar, estudos conduzidos especificamente na região centro-sul mineira, onde se encontra a cidade de Viçosa, têm indicado índices preocupantes de crianças em situação de carência nutricional de ferro e outros micronutrientes, como apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 - Estudos sobre a prevalência de deficiência de ferro e outros nutrientes em crianças da região centro-sul de Minas Gerais

Cidade	Amostra	Resultados	Ref.
Viçosa, MG	93 crianças de ambos os sexos com idade de 6 a 12 meses	Prevalência de 29,03% nas crianças. Consumo inadequado de ferro para 23,66% das crianças.	(SILVA, 2015)
Espera Feliz, MG	Crianças de entre 0 e 6 anos.	55 % de prevalência de anemia.	(DIMAS, 2010)
Viçosa, MG	Crianças entre 12 e 35 meses de idade.	Inadequação de consumo de ferro, zinco e vitaminas A e C.	(CAVALCANTE et al., 2006)
Viçosa, MG	Crianças de 12 a 60 meses.	43,5% das crianças com anemia grave.	(MIRANDA et al., 2003)
Belo Horizonte, MG	Crianças entre 6 meses e 6 anos.	47,8 % de prevalência de anemia.	(CAPANEMA, 2002)
Carrancas, MG	Crianças entre 6 meses e 6 anos.	47,2 % de prevalência de anemia.	(LAMOUNIER et al., 2000)
Rio Acima, MG	Crianças entre 7 e 15 anos.	36,2 % de prevalência de anemia.	(NORTON et al., 1996)

Observa-se que, em 2003, Viçosa possuía em média 43,5% das crianças em idade pré-escolar com anemia grave. Esses dados comprovam que a cidade de Viçosa está inserida em uma região, tradicionalmente, afetada pela anemia por deficiência de ferro em crianças e necessita que ações corretivas e preventivas sejam implantadas para a minimização deste problema de saúde pública. Índices preocupantes de prevalência de anemia em crianças também foram observados em outras cidades da região.

Os sintomas de deficiência de ferro são sutis e inespecíficos e, muitas vezes só são perceptíveis quando um quadro de anemia grave já se instalou (DIAS et al., 2015). Alguns trabalhos associaram à deficiência de ferro a situações de má formação do sistema neural de bebês e crianças, retardo mental e problemas sobre o funcionamento cognitivo (SCHNEIDER et al., 2005). A deficiência de ferro também tem sido associada ao prejuízo no desenvolvimento da linguagem, coordenação motora e no desempenho escolar (WHO, 2008), anormalidades no epitélio do trato gastrointestinal, dificuldade de cicatrização, aumento da mortalidade e suscetibilidade a infecções (SHILS et al., 2003). Andrews (2002) destaca outros sintomas mais facilmente perceptíveis, como palidez cutânea, dos lábios, da língua e das palmas das mãos, respiração ofegante, disfagia (dificuldade na deglutição) e astenia (fraqueza orgânica).

Crianças anêmicas por deficiência de ferro são, normalmente, menos ativas e se cansam facilmente, além de apresentarem menor capacidade de concentração sendo menos atentas às instruções e demonstrações (DIAS et al., 2015). Schneider et al. (2005) sugerem que esses comportamentos podem prejudicar o desenvolvimento infantil devido ao isolamento social.

3.3.2. Metabolismo de Ferro

A quantidade de ferro em seres humanos pode variar em função do peso do indivíduo, da concentração de hemoglobina, do sexo e, até mesmo, do tamanho do fígado (DIAS et al., 2015). O ferro dito “essencial” encontra-se constituindo a hemoglobina (60 a 70%), a mioglobina, algumas enzimas (15%) e a transferrina (0,08%). O ferro de reservas, dito “não essencial”, está presente na ferritina e na hemossiderina (15 a 35%) (COSTA e MARTINO, 2011).

Quimicamente, é classificado como metal de transição e pode existir em dois estados redox intercambiáveis: a forma reduzida, ferro ferroso (Fe^{2+}) e a forma oxidada, ferro férrico (Fe^{3+}), sendo este último o mais estável na maioria dos complexos biológicos contendo oxigênio (TANDARA e SALAMUNIC, 2012). Devido à sua capacidade de receber e doar elétrons, este mineral é imprescindível para diversas reações biológicas.

Quando o ferro celular excede as necessidades do organismo, o excesso é armazenado em uma forma biodisponível, como a ferritina, protegendo as células de reações de oxidação potencialmente tóxicas catalisadas pelo excesso desse elemento (TANDARA e SALAMUNIC, 2012). Considera-se, portanto, que a ferritina possui duas funções no metabolismo de ferro: reserva e desintoxicação em situações de excesso.

O ferro utilizado pelo organismo é obtido de duas fontes principais: da dieta e da reciclagem de hemácias senescentes (GROTTO, 2008). O ferro obtido da dieta é absorvido pelo epitélio duodenal, que apresenta estruturas vilosas para ampliar a superfície de absorção (SILVA e MURA, 2011). Uma dieta normal deve conter de 13 a 18 mg de ferro, dos quais somente 1 a 2 mg serão absorvidos na forma inorgânica ou na forma heme (JACOBS, 1985). A maior parte do ferro inorgânico está presente na forma Fe^{3+} e advém de fornecida por vegetais e cereais, enquanto o ferro na forma heme, correspondente a um terço do total, é proveniente da hemoglobina e mioglobina oriundas majoritariamente da carne vermelha ingerida (JACOBS, 1985).

Uma criança normal, ao nascer, possui cerca de 75 mg de ferro por quilo de peso corporal; dois terços desse valor estão presentes nas células vermelhas do sangue (DIAS et al., 2015). Durante os primeiros dois meses de vida, há uma diminuição acentuada na concentração de hemoglobina, com conseqüente aumento dos depósitos de ferro. Estes depósitos são posteriormente mobilizados, disponibilizando ferro para as

necessidades de crescimento e para repor as perdas. Portanto, durante este período há uma exigência mínima de ferro da dieta. Nos primeiros 4 a 6 meses de vida, no entanto, os estoques de ferro diminuem significativamente e a criança precisa de uma ingestão dietética generosa de ferro. Durante o primeiro ano de vida, uma criança triplica o peso do seu corpo e dobra seus depósitos de ferro (WHO, 1989).

Não há uma via regulatória conhecida para a excreção de ferro, sendo sua regulação realizada justamente pela absorção intestinal (TANDARA e SALAMUNIC, 2012). Embora parte do ferro da dieta possa ser absorvida passivamente por via paracelular, a passagem do ferro pelo enterócito (transporte transcelular) depende de energia e do seu transporte através de carreadores por três importantes barreiras: a membrana apical, a translocação através do citossol e a liberação do ferro na membrana basolateral e daí para a circulação (COSTA e MARTINO, 2011).

A captação do ferro solúvel no lúmen intestinal é feita pela membrana apical do enterócito, e é mediada pela DMT-1, no caso de ferro não-heme (MAHLERA et al., 2009). As principais proteínas envolvidas na absorção de ferro estão descritas na Tabela 1, assim como suas funções neste processo.

Tabela 1 - Principais proteínas envolvidas no metabolismo de Fe

PROTEÍNA	FUNÇÃO
DMT-1 – Transportador de metal divalente-1	Transporta o Fe reduzido (Fe^{2+}) para o citoplasma
Dcytb – Citocromo duodenal B	Reduz o ferro oxidado Fe^{3+} para Fe^{2+}
Ferritina	Armazena Fe absorvido (Fe^{3+})
Ferroportina	Exporta Fe reduzido (Fe^{2+}) para o exterior do enterócito
Hefaestina	Oxida o ferro reduzido Fe^{2+} para Fe^{3+}
Transferrina (Tf)	Transporta o Fe oxidado (Fe^{3+}) através do plasma
Receptor de transferrina (TfR)	Liga-se à HFE e Tf diférrica; modula a captação de ferro
HFE – Proteína alterada hemocromatose	Liga-se ao TfR; modula síntese de hepcidina
Hepcidina	Hormônio regulador

Fonte: Adaptado de Oates, 2007.

A maior parte do ferro encontrado nas dietas tradicionais é ferro não-heme (inorgânico), na forma oxidada (Fe^{3+}). Sua absorção pode ocorrer em qualquer porção do intestino, mas é mais eficiente no duodeno (COSTA e MARTINO, 2011). A DMT-1 situada na membrana apical dos enterócito duodenais é a responsável por transportar, além do ferro, metais divalentes como Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} para o interior do mesmo. Para que esse transporte ocorra, é necessário que o ferro, normalmente em sua forma

oxidada (Fe^{3+}) seja convertido a Fe^{2+} , o que é mediado pela enzima redutase Dcytb ou por outros agentes redutores, como o ácido ascórbico (GROTTO, 2008).

Já o ferro heme, antes de ser captado pela borda em escova das células da mucosa intestinal, deve atravessar a camada de muco. Por ser mais solúvel no estado ferroso, o Fe^{2+} atravessa a camada de muco mais rápido que o Fe^{3+} e alcança a borda em escova do duodeno mais facilmente (COSTA e MARTINO, 2011). Têm sido demonstrado que a poção de ferro heme é absorvida intacta pelos enterócito por meio da proteína heme-carreadora 1 (HCP1), encontrada em concentrações elevadas no duodeno (TANDARA e SALAMUNIC, 2012).

Após adentrar a célula epitelial pela membrana apical, o ferro pode ser armazenado na forma de ferritina ou transportado para a circulação através da membrana basolateral. Os enterócitos apresentam função absorptiva por até dois dias, sendo posteriormente renovados após o descame do lúmen intestinal (TANDARA e SALAMUNIC, 2012).

O ferro é exportado da célula para o plasma pela ferroportina que, assim como a DMT-1, realiza o transporte de ferro apenas na forma Fe^{2+} . Porém, já na corrente sanguínea, a transferrina possui afinidade eletrostática apenas pelo ferro na forma férrica (Fe^{3+}), fazendo-se necessário que o Fe^{2+} seja oxidado a Fe^{3+} . Uma oxidase semelhante à ceruloplasmina sérica, a hefaestina, promove essa reação de oxidação (GROTTO, 2008).

A célula intestinal e a localização das proteínas envolvidas no processo de absorção de ferro não heme são apresentados na Figura 2.

A transferrina é responsável pelo transporte do ferro pelo sangue até os tecidos, fornecendo solubilidade ao mesmo, reduzindo sua reatividade e, portanto, “entregando” os cátions de ferro de forma eficaz à todas as células do corpo. Nas células, dois tipos de receptores de transferrina são descritos: TFR1 e TFR2.

A TFR1 se expressa em todos os tipos de células que necessitam de ferro, mas suas concentrações podem variar amplamente entre elas (AISEN, 2004). São mais expressivas em células eritróides imaturas, células de divisão rápida (normais e malignas) e células do tecido placentário. Cada unidade possui um sítio de ligação para a transferrina. Já a TFR 2 é expressa predominantemente no fígado, células hematopoiéticas e células de cripta do duodeno. Este receptor se liga ao HFE e à transferrina em domínios diferentes daqueles reconhecidos pela TFR1 (TANDARA e SALAMUNIC, 2012).

O ferro é estocado nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e medula óssea, nas formas de ferritina (forma solúvel de armazenamento) e hemossiderina (DIAS et al., 2015). A concentração de ferritina no sangue tem sido utilizada como marcador do

estado nutricional de ferro de um indivíduo, devido à sua relação direta com os estoques de ferro (FAIRBANKS e BEUTLER, 2001).

A deficiência de ferro ocorre em etapas, começando com o esgotamento das suas reservas, seguindo-se o transporte na forma reduzida, e, finalmente, a depleção de proteínas e enzimas que o contêm, incluindo a hemoglobina. Isso resulta em anemia por deficiência desse elemento (GARDNER et al., 1977 *apud* DELLA LUCIA, 2013).

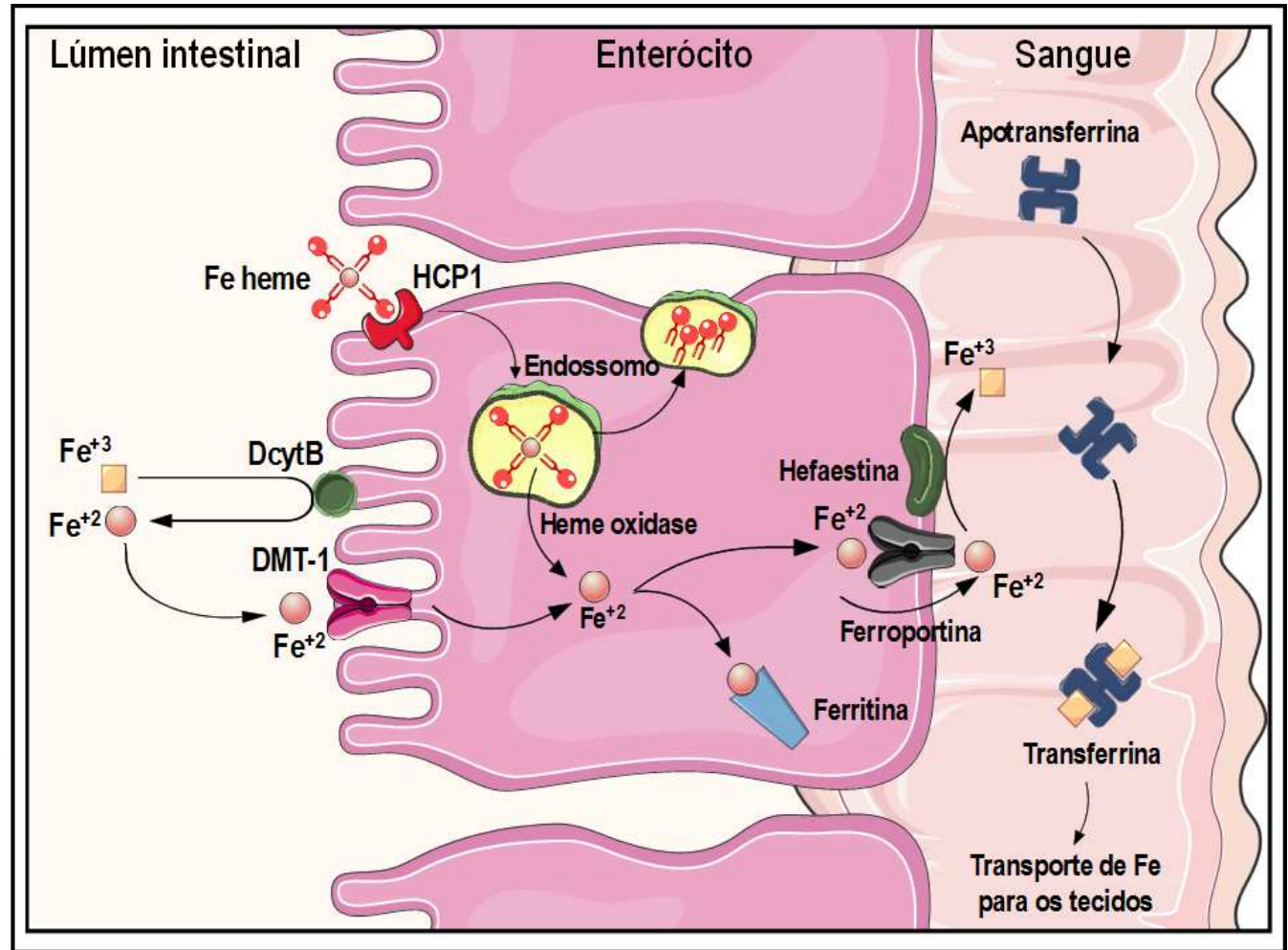
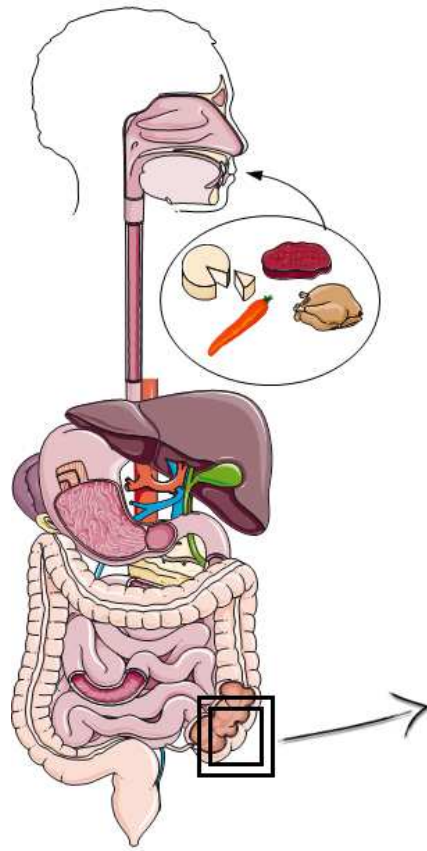


Figura 2 – Esquema representativo do metabolismo de ferro. Dcytb: ferredutase; DMT-1: transportador de metal divalente -1; HCP-1: proteína transportadora do heme-1. Fonte: Elaborado pelo autor.

A homeostase do ferro é promovida por dois mecanismos principais, um intracelular, de acordo com a quantidade de ferro que a célula dispõe, e o outro sistêmico, em que a hepcidina tem papel essencial (GROTTO, 2008). Tem sido reportado que a eficiência da absorção do ferro não heme é controlada pela mucosa intestinal, que possibilita a entrada de ferro no sangue, através do *pool* de ferritina citosólica, de acordo com a demanda do organismo (DIAS et al., 2015).

A hepcidina, um hormônio peptídico produzido pelo fígado, atua na célula da mucosa, inibindo a absorção de ferro pelos enterócitos e a liberação de ferro pelos macrófagos. Isso se dá pela ligação deste hormônio à ferroportina, bloqueando exportação de ferro para a corrente sanguínea. A quantidade de hepcidina produzida pelo fígado está relacionada com a quantidade de ferro armazenada nesse órgão. Sua síntese é induzida por situações de excesso de ferro (FRAZER et al., 2003).

A síntese de diversas proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro pode sofrer modulação da transcrição, estabilidade do mRNA, tradução e modificações pós-traducionais. Tais alterações estão diretamente ligadas a quantidade de ferro intracelular. Assim, a regulação da síntese dessas proteínas é responsável pela habilidade do intestino adaptar a absorção de ferro de acordo com a demanda por esse elemento bem como seu estado de oxidação no meio intracelular (HENTZE et al., 2004). Assim, avaliar a expressão de mRNA de proteínas como a DMT-1, Dcytb, Ferroportina, pode ser um indicador bastante confiável do estado nutricional de ferro dos indivíduos, e também da biodisponibilidade do ferro presente em suas dietas.

3.3.3. Biodisponibilidade de ferro

Considerando que, na maior parte das vezes, somente uma pequena parte dos nutrientes ingeridos na dieta são utilizados pelo organismo, a biodisponibilidade de um nutriente pode ser considerada a fração do mesmo que, após ingerida, está efetivamente disponível para a utilização em processos metabólicos ou para armazenamento (ARGYRI et al., 2009).

O ferro heme é mais eficientemente absorvido do que o ferro inorgânico, pois é solúvel no pH do intestino delgado (entre 8 e 9). A maior parte do ferro inorgânico, não heme, está presente no alimento na forma Fe^{3+} , sendo menos eficientemente absorvido pelo organismo (MAHLERA et al., 2009).

A necessidade corporal de ferro é o fator mais importante que regula a absorção deste mineral. Quanto menor a reserva de ferro no organismo, maior a absorção corporal de ferro, e vice-versa (MARTÍNEZ, 1999). Em determinados estados fisiológicos a necessidade de ferro é maior, alterando o padrão absorptivo do organismo, como, por exemplo, nas fases de crescimento (infância e adolescência) e período de gestação (DIAS et al., 2015).

Algumas substâncias são conhecidas por favorecer a absorção intestinal de ferro, como alguns ácidos orgânicos e agentes solubilizantes. Alguns trabalhos relativos à potencializadores de absorção de ferro e outros minerais são apresentados no Quadro 3.

Quadro 3 – Alguns trabalhos sobre potencializadores de absorção de Fe e outros minerais

Potencializador de absorção	Objetivos	Resultados	Ref.
Limonada	Avaliar a biodisponibilidade de Fe em refeições à base de farinha consumido por população vulnerável na América Latina.	Alimentos à base de farinha fortificado com sulfato ferroso têm sua biodisponibilidade aumentada quando ingeridos com limonada adoçada.	(OLIVARES et al., 2007)
Carotenoides	Avaliar a absorção de ferro em humanos que ingeriram diferentes concentrações carotenoides sem atividade pró-vitamina A.	Aumento significativo da absorção de Fe de 8,1% para 22,5%, 15,8% e 16,5%, com a adição de 3,6 mg de licopeno, 1,8 mg de luteína e 1,8 mg de zeaxantina, respectivamente.	(GARCÍA-CASAL, 2006)
Ácido ascórbico	Avaliar o efeito do ácido ascórbico na alteração do estado oxidativo de ferro.	O ácido ascórbico tem elevada capacidade de reduzir o Fe ⁺³ aumentando sua biodisponibilidade.	(BOLOBAJEV et al., 2015)

Observa-se que por meio do aumento da solubilidade do ferro ou através da redução de seu estado oxidado (Fe³⁺) para seu estado reduzido (Fe²⁺), quando os potencializadores de absorção são ingeridos em conjunto com alimentos fontes de ferro, há um aumento na biodisponibilidade deste mineral.

Ao contrário dos potencializadores de absorção, algumas substâncias e minerais (Quadro 4), como o cálcio, parecem competir com o ferro pela membrana da borda em escova do enterócito, reduzindo a absorção deste último (BARTON et al., 1983). Alguns autores afirmam que o efeito inibitório do cálcio sobre o ferro depende da fonte da dieta de cálcio, do tipo de sal e da quantidade ingerida (MINOTTI et al., 1993). Alimentos mais complexos, como leite de vaca, além do cálcio, podem apresentar outras substâncias inibidoras de absorção de ferro, como as proteínas do soro e as caseínas (HURRELL et al., 1989).

Quadro 4 – Alguns estudos sobre inibidores de absorção de Fe e outros minerais

Inibidor	Objetivos	Resultados	Ref.
Zinco	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Determinar a duração do efeito inibitório do zinco (sulfato de zinco) sobre a biodisponibilidade de ferro (sulfato ferroso) na proporção de 20:1. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ O efeito inibitório do zinco foi observado quando os dois minerais eram ingeridos simultaneamente. ▪ Ao se ingerir a fonte de zinco 30 min antes da ingestão da fonte de ferro o efeito inibitório é não significativo. 	(OLIVARES, et al., 2007)
Compostos fenólicos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Investigar o efeito do consumo de chá na absorção de ferro (1,0 mL de FeCl₃ nas concentrações de 0,1 mM e 1,0 mM) e quais os mecanismos de redução de absorção. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A absorção de ferro diminuiu quando ingerido com o chá. Porém, ao se consumir a fonte de ferro separadamente do chá, não houve mudança na absorção do mesmo. ▪ Essa redução acontece devido à formação de um complexo entre os fenólicos e o ferro e não por danificação da mucosa intestinal. 	(SOUTH et al., 1997)
Cálcio	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Investigar os efeitos potenciais de diferentes doses de cálcio (200 a 1.500 mg na forma de cloreto de cálcio) na absorção de 5 mg de ferro heme e não-heme em mulheres adultas não grávidas. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dosagens de cálcio superiores a 1.000 mg diminuíram a absorção de 5 mg de ferro não-heme em 49,6%. ▪ A dose de cálcio de 800 mg reduziu a absorção de 5 mg de ferro heme em até 37,7%. 	(GAITAN, et al., 2011)

Inibidor	Objetivos	Resultados	Ref.
Cálcio e Lactose	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Comparar os efeitos de suplementação de cálcio com CaCO₃ ou cálcio citrato-malato (CaCM) de diferentes fontes e de lactose na absorção de ferro (FeCl₃) pelo organismo. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cálcio e ferro competem pelo mesmo sítio de absorção no intestino, porém esta competição varia muito dependendo da fonte de cálcio. ▪ Cálcio presente em leite e queijo não afetou a absorção de ferro, porém os sais de cálcio (CaCO₃ e CaCM) suplementados inibiram a absorção de ferro em alguns casos. Isso sugere que as diferentes formas químicas do cálcio interagem de maneira diferente durante a absorção de ferro. ▪ Proteínas do soro e caseínas podem ter efeito negativo na absorção de ferro. ▪ A lactose potencializou a absorção de ferro, provavelmente devido à sua fermentação com consequente aumento de acidez no lúmen intestinal, elevando a solubilidade e absorção do Fe. 	(MINOTTI et al., 1993)
Cálcio	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Investigar o efeito de diferentes dosagens de cálcio (40 a 600 mg de cálcio na forma de cloreto de cálcio) na inibição da absorção de ferro heme e não-heme em humanos. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A absorção de ferro foi reduzida em até 60% quando doses de cálcio superiores à 300 mg foram ingeridas. 	(HALBERG et al., 1991)
Cálcio	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Documentar a inibição da absorção de ferro (70 µm de ferro como sulfato ferroso) pelo cálcio (6 mg como cálcio citrato-malato (CaCM)) em ratos e cachorros; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ O cálcio inibe a absorção de ferro se os dois forem ingeridos em um intervalo inferior a uma hora; ▪ Ferro e ácido ascórbico com revestimento entérico apresentou a maior biodisponibilidade em relação ao ferro não revestido e ao ferro com revestimento entérico. ▪ A presença de revestimento entérico com ou sem ácido ascórbico aumentou a biodisponibilidade de ferro. Com ácido ascórbico aumentou ainda mais. 	(KOCHANOWSKI, 1990)

Inibidor	Objetivos	Resultados	Ref.
Cálcio	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Avaliar a inibição da absorção de ferro (sulfato ferroso) por diferentes fontes de cálcio (leite, suco de laranja, sal de cálcio citrato-malato (CaCM)). 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Além do cálcio outros componentes do leite podem afetar a absorção de ferro como as proteínas do soro e a caseína. ▪ Leite prejudicou a absorção de ferro. ▪ CaCM também prejudicou, mas em menor intensidade que o leite. ▪ Não foi observado prejuízo na absorção quanto ao suco de laranja em conjunto com o CaCM. Possivelmente os ácidos orgânicos (ascorbato e citrato) presentes no suco minimizaram os efeitos inibidores do cálcio. 	(DEEHR et al., 1990)

Monsen e Cook (1976) observaram que a absorção de ferro não heme foi significativamente reduzida em até 70% quando cálcio e fósforo, na forma de sais de CaCl_2 , CaHPO_4 , e K_2PO_4 , foram adicionados à dieta. No entanto, a absorção foi reduzida em apenas 30% quando um desses minerais foi retirado da dieta, sugerindo que cada mineral possui efeito inibitório aditivo com possibilidade de formação de um complexo fosfato-ferro-cálcio (MONSEN e COOK, 1976). Gaintan et al. (2011) observaram que doses de cálcio superiores a 1.000 mg diminuíram a absorção de 5 mg de ferro não-heme em 49,6%, enquanto doses superiores a 800 mg de cálcio reduziram a absorção de 5 mg de ferro heme em até 37,7%. Outros autores observaram redução de até 60% na absorção de ferro quando doses de cálcio superiores a 300 mg foram ingeridas.

Por outro lado, Minihane e Fairweather-Tait (1998) não observaram alteração nas concentrações de hemoglobina, hematócritos e ferritina plasmática em humanos adultos saudáveis suplementados com 1200 mg de cálcio por dia durante 6 meses. Seus resultados sugerem que a suplementação com cálcio por longos períodos não altera a absorção de ferro em adultos saudáveis.

Observa-se também que quando consumidos simultaneamente com ferro, os minerais zinco e cálcio possuem efeito negativo sobre sua absorção, pois competem pelo mesmo sítio de absorção no intestino. Porém, em intervalos de consumo superiores a 30 minutos para zinco e 60 minutos para cálcio, não há interferência na absorção de ferro. Assim, percebe-se que o efeito inibitório de zinco e, principalmente, cálcio sobre a absorção de ferro depende de vários fatores como a quantidade ingerida desses minerais em relação ao ferro, da fonte de cada um deles, o intervalo entre o consumo da fonte e da fonte de zinco e cálcio e o período de tempo em que o indivíduo esteve submetido às mesmas condições de consumo desses minerais.

3.4. A fortificação de alimentos

A situação de deficiência de micronutrientes na população mundial tem levantado a discussão sobre diferentes alternativas para se combater este problema. Quatro diferentes estratégias de intervenção para elevar as concentrações de micronutrientes deficientes nas dietas têm sido empregadas (LEE et al., 2000):

(1) diversificação alimentar, que consiste no aumento da ingestão de alimentos ricos nos micronutrientes em deficiência;

(2) a suplementação, que consiste na administração periódica de elevadas doses desses micronutrientes;

(3) a fortificação de alimentos, por meio da adição de micronutrientes em alimentos comumente consumidos;

(4) a biofortificação, que consiste no aumento da concentração de micronutrientes de culturas por meio de melhoramento genético.

Dentre as tecnologias mencionadas, a fortificação de alimentos é aquela que possui o menor custo e melhor resultado em médio prazo (JACINTO, 2012). Esta técnica consiste na adição de vitaminas e minerais (fortificantes) em alimentos comuns (veículos alimentares), como a farinha de trigo, farinha de milho, arroz, açúcar e óleo. Para esta intervenção ser eficaz, é importante escolher o veículo alimentar com cuidado de forma a garantir que o alimento seja consumido localmente por grande parte da população deficiente. A fortificação pode ser parte de uma estratégia baseada em formulação de alimentos, mas deve ser complementada com a educação nutricional, para aumentar a demanda de alimentos fortificados em conjunto com outras intervenções que visem ao aumento da diversidade e da qualidade da dieta (BURCHI et al., 2011).

A fortificação apresenta diversas vantagens, dentre as quais a alta cobertura populacional, a não necessidade de modificação dos hábitos alimentares e o risco quase nulo de toxicidade (ZANCUL, 2004). Já a longo prazo, a melhor solução seria o aumento da frequência de consumo de alimentos fonte de vitaminas e minerais (FAO, 2010).

A fortificação de alimentos é mais econômica, flexível e socialmente aceitável para melhorar o estado nutricional de indivíduos em países em desenvolvimento (CHAKRAVARTY, 2013). Por outro lado, acredita-se que as maiores dificuldades encontradas para a implantação dessa estratégia estejam ligadas ao consumo massivo do alimento, sua distribuição e preço (ZANCUL, 2004). No Brasil, até o momento os alimentos que possuem fortificação mandatória são o sal iodado, a água fluoretada e as farinhas de trigo e milho, com ferro e ácido fólico (RAMALHO, 2011).

No Quadro 5, estão resumidamente descritos trabalhos sobre fortificação de alimentos realizados em diversos locais, com ênfase nos seus objetivos e resultados. O ferro é o mineral cuja deficiência pode ser mais facilmente diagnosticada e sua deficiência é expressiva em vários países no mundo (ANDRADE et al., 2014). Assim, os estudos têm se concentrado na fortificação de alimentos com ferro. Observa-se, também, que os alimentos objetos de estudo são alimentos, tradicionalmente, consumidos em grande quantidade em muitos países como arroz, farinha de trigo e leite.

Quadro 5 – Alguns trabalhos relacionados à fortificação de alimentos em geral

Micronutriente adicionado	Alimento fortificado	Objetivos	Resultados	Ref.
Ferro	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Massa fortificada adicionada a arroz 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Desenvolver tecnologia como estratégia de melhoria nutricional para crianças de áreas rurais de Honduras 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A lavagem prévia do arroz fortificado resultou em uma perda de 80% do conteúdo de ferro, mas a retenção após cozimento foi de 77%. As crianças não detectaram diferenças sensoriais entre o arroz fortificado e o arroz comum. 	(ANDRADE et al., 2014)
Ferro	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arroz fortificado com revestimento comestível 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Desenvolver uma pré-mistura de arroz fortificado com ferro utilizando revestimento polimérico por imersão e por aspersão 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ O conteúdo de ferro e os diferentes revestimentos afetaram significativamente as características de cor e o aumento da temperatura de cozimento resultou em maior perda de ferro. ▪ Os revestimentos reduziram a perda de ferro durante a lavagem e o arroz fortificado revestido foi sensorialmente aceito. 	(MRIDULA e POOJA, 2014)
Zinco + Ferro	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arroz Parboilizado 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Avaliar biodisponibilidade de ferro e zinco adicionados em arroz parboilizado durante operação de imersão em mulheres e crianças de Bangladesh. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A combinação de ferro e zinco aumentou a concentração de zinco enquanto o de ferro diminuiu. O autor sugere que grande parte do zinco adicionado estará biodisponível, mas não houve comprovação científica. 	(HOTZ et al., 2014)
Ácido Fólico	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Leite, bebidas, óleos vegetais e cereais. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Avaliar se alimentos fortificados com ácido fólico estão com super dosagem. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Observou-se elevada variabilidade entre o conteúdo real de ac. Fólico e o indicado na embalagem. ▪ Produtos líquidos (leite, bebidas e óleos) apresentaram as maiores concentrações de ácido fólico, enquanto cereais as menores. 	(VAESKEN et al., 2014)

Micronutriente adicionado	Alimento fortificado	Objetivos	Resultados	Ref.
Ferro	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Farinha 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Quantificar o ferro total e biodisponível em relação à deficiência do mineral veiculado por farinha de trigo fortificada utilizada em merenda escolar. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A fortificação de farinhas de trigo aumentou em 22% a biodisponibilidade de ferro para as crianças; ▪ A merenda servida atende as exigências do PNAE, sendo que, neste caso, frequentemente o pão do café da manhã era substituído por arroz doce ou canjica; 	(QUEIROZ et al., 2008)
Zinco + Ferro	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Farinha de trigo integral 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Avaliar a vida de prateleira de farinha de trigo integral fortificada com premix mineral contendo ferro elementar, NaFeEDTA, óxido de zinco e sulfato de zinco. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ferro elementar apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de fungos. ▪ Ferro elementar, NaFeEDTA, óxido de zinco e sulfato de zinco exerceram ligeiro efeito deteriorativo sobre as características sensoriais da farinha. 	(AKHTAR et al., 2008)
Ferro + Vitamina B1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ultra Rice® 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Utilizar fumarato ferroso microencapsulado para manter a estabilidade da Vitamina B1. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ O microencapsulamento não afetou a digestibilidade do ferro e deu cor amarela aceitável ao arroz. ▪ A biodisponibilidade e estabilidade do ferro e da vitamina foram controladas em níveis aceitáveis. 	(LI et al., 2008)
Ferro	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Leite 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Avaliar a biodisponibilidade de sulfato ferroso microencapsulado com fosfolipídios em leite. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ainda que se tenha inibidores de absorção de ferro como cálcio, proteínas do soro e caseína, o leite fortificado com ferro microencapsulado é uma boa fonte de ferro. ▪ Houve um aumento na biodisponibilidade de ferro em leite fortificado. 	(UICICH et al., 1999)

3.4.1. Tecnologia Ultra Rice®

Podemos considerar que os melhores veículos para a fortificação são os alimentos consumidos em larga escala pela população, como arroz, sal, farinha de trigo, entre outros. Com relação ao arroz, por ser um alimento amplamente consumido em diversos países como o Brasil, não há necessidade de se alterar a dieta dos indivíduos. Além disso, o arroz possui a capacidade de ser enriquecido com diversos micronutrientes e é de fácil digestão, sendo recomendado por pediatras como o primeiro alimento complementar para crianças (CALI, 2008).

O Ultra Rice® é uma tecnologia desenvolvida pela empresa “Bom Dente International” em 1989 (VALOR ECONÔMICO, 2010), com o objetivo de auxiliar na erradicação das deficiências de micronutrientes que atinge bilhões de pessoas em todo mundo e reduz drasticamente a produtividade de populações inteiras, além de afetar negativamente o desenvolvimento de jovens e crianças (PATH, 2013). É um formulado à base de farinha de arroz que contém ferro, zinco, tiamina e ácido fólico, e culturalmente apropriado para a população brasileira, pois se assemelha ao arroz tradicional em forma, tamanho e cor, seu custo é relativamente baixo (PATH, 2013). Os grãos fortificados são adicionados ao arroz convencional na proporção de 5:100, resultando em um produto fortificado praticamente idêntico em aroma, gosto e textura ao arroz comum consumido tradicionalmente (CALI, 2008).

Em geral, o arroz convencional possui uma baixa concentração de vitaminas e minerais. Ademais, uma parcela significativa desses nutrientes é perdida em processos de branqueamento e polimento do arroz (SEGALL, 2012). No Ultra Rice®, pelo fato dos micronutrientes se encontrarem no interior dos grãos, as perdas durante o transporte, armazenamento e cozimento são sensivelmente reduzidas (PATH, 2013; CALI, 2008). Os conteúdos de micronutrientes do arroz comum e do Ultra Rice® são apresentadas comparativamente no Quadro 6.

Quadro 6 – Conteúdo de micronutrientes presentes em 50g de arroz polido e de Ultra Rice® crus e porcentagem, correspondente, da ingestão diária recomendada.

Micronutrientes	Arroz comum		Arroz fortificado com Ultra Rice® (5:100)	
	Massa	% VD*	Massa	% VD*
Ferro	0,75mg	5,3%	5,4 mg	38,6%
Zinco	0,73 mg	10,4%	2,6 mg	37,1%
Tiamina	0,032 mg	2,7%	0,48 mg	40,0%
Ácido Fólico	0,004 mg	1,0%	0,107 mg	26,7%

Fonte: Adaptado de Walter (2008) e Urbano (2015)

* %VD: Porcentagem de Valores Diários Recomendados baseado na Ingestão Diária Recomendada para Adultos estipulada pela ANVISA (BRASIL, 2004)

Já foi comprovado que o arroz fortificado contendo Ultra Rice® é um alimento nutricionalmente seguro, seus nutrientes são quimicamente estáveis e com elevada biodisponibilidade, é sensorialmente aceito pela população e, portanto, um veículo estratégico para o combate à fome oculta em diferentes países em desenvolvimento (SEGALL, 2012; MATTHIAS, 2010; CALI, 2008).

No Quadro 7 são exemplificados resultados obtidos com a implantação do Ultra Rice® na alimentação em alguns países em desenvolvimento. Observa-se que o arroz fortificado contendo Ultra Rice® tem contribuído positivamente na redução da deficiência de ferro em crianças ao redor do mundo e tem sido bem aceito sensorialmente nos locais em que foi implantado. No entanto, ainda é necessário que uma rede de fornecimento esteja estabelecida nesses países para consolidar a distribuição do Ultra Rice®.

Quadro 7 – Implantação do Ultra Rice® em países em desenvolvimento

País	Acesso à tecnologia	Metodologia	Resultados	Ref.
Brasil	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Parceria com a Universidade Federal de Viçosa criando um centro de excelência em fortificação de alimentos. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Avaliou-se o impacto da utilização de um arroz fortificado (Ultra Rice® - UR) com ferro, zinco, tiamina e ácido fólico no estado nutricional de pré-escolares. ▪ 99 crianças de duas creches do município de Viçosa, não anêmicas e em bom estado nutricional. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ O arroz fortificado melhorou o estado nutricional dos pré-escolares em relação às concentrações de zinco, tiamina, ácido fólico, hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). ▪ Não foram detectadas diferenças significativas entre o início e o final do período de intervenção quanto aos valores de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos. 	(DELLA LUCIA et al., 2016)
Brasil	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Parceria com a Universidade Federal de Viçosa criando um centro de excelência em fortificação de alimentos. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Avaliou-se a biodisponibilidade de Fe em ratos Wistar com arroz fortificado com pirofosfato férrico micronizado por por meio de tecnologia Ultra Rice® adicionando farinha de yacon como fonte de frutooligossacarídeos. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ O Ultra Rice® puro mostrou elevada biodisponibilidade de ferro com 84,7% de valor biológico relativo de eficiência de regeneração de hemoglobina (RBV-HRE). ▪ A adição de farinha de yacon reduziu a biodisponibilidade do ferro apresentando 63,1% de RBV-HRE. 	(DELLA LUCIA et al., 2013)

País	Acesso à tecnologia	Metodologia	Resultados	Ref.
México	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Produção do arroz realizada pelo Departamento de Engenharia Química e Química da Universidade de Toronto, no Canadá. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mulheres em idade fértil e fora do período de lactação entre 18 e 49 anos. ▪ Dose diária de arroz cozido (20mg de ferro) por dia, cinco dias por semana durante seis meses. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Consumo médio de ferro de 13 mg/dia; ▪ Redução de 80% de mulheres anêmicas. 	(HOTZ et al., 2008)
Camboja	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Em 2009 o PATH formou uma parceria com o Instituto de Pesquisa para Desenvolvimento Francês e o Programa Mundial de Alimentos das Nações Unidas para avaliar a viabilidade de se implantar o arroz fortificado no Camboja. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Estudo de aceitabilidade do Ultra Rice® por crianças; ▪ 2000 crianças em quatro escolas; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ O arroz fortificado pode ser altamente aceitável entre as crianças das 4 escolas avaliadas; 	(MATTHIAS, 2012)
Índia	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tecnologia Ultra Rice® foi licenciada pelo PATH para um fabricante local que está produzindo grãos de alta qualidade e baixo custo. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Introdução da mistura em programas de refeições escolares locais para crianças entre 5 e 12 anos; - 100 g de arroz seco/criança/dia (aproximadamente 20 mg de Fe por porção) durante 9 meses; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aumento significativo nas reservas de ferro; ▪ Redução na incidência de morbidades em comparação com o grupo controle; 	(MATTHIAS, 2010)
Colômbia	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Parceria com uma das maiores empresas de produtos de arroz do país: "Union de Arroceros" e transferência da tecnologia em 2002. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Introdução do Ultra Rice® em escolas públicas alcançando 66.000 mil crianças em vulnerabilidade social; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Boa aceitabilidade do produto; ▪ Elevação do consumo médio de ferro pelas crianças; 	(CALI, 2008)

3.4.2. Arroz doce fortificado e merenda escolar: uma alternativa contra a fome oculta?

O arroz doce, tão apreciado no Brasil, é uma receita de origem asiática. Sua origem se deu no norte da Índia, onde usualmente se consomem muitos produtos lácteos, e é comum se misturar arroz com açúcar em preparações como *shadi pilau* (arroz com frutas secas, raspas de coco e açafrão), prato típico dos casamentos hindus (CHAVES, 2012).

Atualmente no Brasil, o arroz doce tem como base arroz cozido, leite, creme de leite e açúcar, podendo ser aromatizado com raspas de limão, canela em pó, cravo da Índia e folhas de laranja. No Brasil, o arroz doce adquiriu ainda outras variações, como uso do doce de leite, leite de coco e leite condensado, que lhe confere sabores diferenciados.

Entretanto, no Brasil, é possível encontrar este produto em pequenos comércios, quitandas e lanchonetes sendo comercializados no varejo em pequenos copinhos de plástico. Porém, no país não existe produção de arroz doce de forma industrializada em grande escala, nem mesmo produto deste tipo com registro formal. Habitualmente, prepara-se o arroz doce em casa e ele é consumido fresco ou resfriado. Já em países europeus, como a França, o arroz doce é encontrado corriqueiramente nas prateleiras dos supermercados, sendo comercializado refrigerado (Quadro 8). Apesar disso, de acordo com nossas pesquisas, poucos trabalhos estão disponíveis na literatura em que o arroz doce tenha sido o objeto de estudo específico. Os trabalhos encontrados estão resumidamente apresentados no Quadro 9.

Quadro 8 - Diferentes marcas de arroz doce industrializado comercializadas na França e seus respectivos preços no varejo.

Marca	Embalagem	Preço
La laitière		6,81€ / kg
Mont Blanc		6,54€ / kg
La Vie Claire		9,30€ / kg
La Fermiere		9,00€ / kg
Bonne Maman		4,45€ / kg
La Fermiere (gourmand)		7,91€ / kg
Michel et Augustin		12,06€ / kg

* Cotações atualizadas em 25/07/2016.

Quadro 9 – Alguns trabalhos em que o arroz doce foi objeto de estudo

Objetivo	Análises	Obs. sobre arroz doce	Autores
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Verificar a prevalência de sobrepeso e obesidade em escolares e sua associação com variáveis ambientais. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Avaliação antropométrica ▪ IMC ▪ Fatores ambientais 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arroz doce ou canjica era servido uma vez por semana na merenda escolar, sendo a alimentação escolar considerada saudável. ▪ Não foi constatada influência da alimentação escolar no índice de obesidade das crianças (sem considerar o que é adquirido pessoalmente no comércio no interior da escola). 	<p>(RODRIGUES et al., 2011)</p>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Avaliar o consumo alimentar e promover hábitos alimentares saudáveis para escolares de uma escola municipal de Belo Horizonte. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Estado nutricional; ▪ Caracterização qualitativa do consumo alimentar e oficinas de educação nutricional; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ O arroz doce é o segundo alimento mais preferido dentro da merenda servida nas escolas (16,2%), ficando atrás do arroz temperado (34,6%); 	<p>(CARVALHO et al., 2010)</p>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fortificar alimentos de baixo custo e fácil preparo com casca de ovo em pó. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Composição centesimal; ▪ Estimativa da concentração de cálcio antes e depois da fortificação; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Formulação: 500g de água, 155g de açúcar, 150g de arroz, 90g de leite, 1,5g de pó de casca de ovo, 2,0g de sal. (398,5g = 4 porções de 100g = 177,8 kcal) ▪ No caso do arroz cozido, que é em geral consumido em refeições contendo alimentos fonte de ferro, quantidades mais elevadas de cálcio não são recomendáveis, pois poderiam inibir a biodisponibilidade de ferro. 	<p>(NAVES et al., 2007)</p>

A Coordenação de Segurança Alimentar e Nutricional – COSAN, do Programa Nacional de Alimentação Escolar – PNAE, é a responsável pela transferência de recursos financeiros do Governo Federal para os municípios adquirirem alimentos

destinados à merenda escolar. Visando a limitar a oferta de alimentos processados de baixo valor nutricional, o PNAE estabeleceu em sua Resolução CD/FNDE nº 26 de 17 de junho de 2013:

“Art. 16. Parágrafo único. A oferta de doces e/ou preparações doces fica limitada a duas porções por semana, equivalente a 110 kcal/porção. ”

Para o PNAE são considerados doces e preparações doces: balas, confeitos, bombons, chocolates e similares, bebidas lácteas, produtos de confeitaria com recheio e/ou cobertura, biscoitos e similares com recheio e/ou cobertura, sobremesas, gelados comestíveis, doces em pasta, geleias de fruta, doce de leite, mel, melaço, melado e rapadura, compota ou fruta em calda, frutas cristalizadas, cereais matinais com açúcar e barras de cereais. No entanto, algumas preparações doces são exceções à regra, que limita a oferta a duas porções semanais, são elas: arroz doce, canjica/mungunzá, curau (mingau de milho) e mingau (BRASIL, 2014), pelo fato de não possuírem elevada quantidade de açúcar de adição.

Desta forma, com o objetivo de contribuir na redução da fome oculta em crianças brasileiras em idade escolar, o desenvolvimento de um arroz doce fortificado à base de Ultra Rice®, utilizando extrato hidrossolúvel de soja como potencial substituto do leite de vaca se mostra uma ideia pertinente. Além de se desenvolver tal formulação alimentícia, os passos iniciais para sua efetiva disponibilização para a sociedade são:

- i) avaliar a composição centesimal, a fim de garantir que a constituição do produto atenda às exigências da CD/FNDE nº 26 de 17 de junho de 2013;
- ii) avaliar a aceitação sensorial do produto por crianças em idade escolar e pré-escolar e uma escola e uma creche públicas, já que são elas o “público alvo”;
- iii) avaliar a biodisponibilidade de ferro no produto, *in vivo*, estudando em um primeiro momento os efeitos de sua ingestão sobre ratos Wistar.

São esses os três principais focos do trabalho experimental a seguir reportado.

3.5. Referências

ACC/SNC. **Fifth report on the world nutrition situation: Nutrition for improved development outcomes.** United Nations Administrative Committee on Coordination/Standing Committee on Nutrition. Geneva. 2004.

AGR PARTINERS. Hidden Hunger: The Irony of a Full Belly. **AGR Partiners.** [S.l.], p. 11. 2013.

AHMED, N. S.; HASSAN, F. A. M.; SALAMA; F. M. M.; ENB, A. K. M. Utilization of plant proteins in the manufacture of cheese analogs. **Egyptian Journal of Food Science.** 23, 37-45, 1995.

AKHTAR, S.; ANJUM, F.; REHMAN, S.U.; SHEIKH, M.; FARZANA, K. Effect of fortification on physico-chemical and microbiological stability of whole wheat flour. **Food Chemistry**, 110(1), 113-119, 2008.

AISEN, P. Transferin receptor 1. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, p. 2137-2143, 2004.

ALVES, M. N.; MUNIZ, L. C.; VIEIRA, M. F. A. Consumo alimentar entre crianças brasileiras de dois a cinco anos de idade: Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde (PNDS), 2006. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 11, p. 3369-3377, 2013. ISSN 1413-8123.

ANDRADE, J.; ROSALES, E.; LOPEZ, J. R.; CARRILLO, E.; ENGESETH, N.; HELFERICH, W. Development of a point-of-use fortification technology for delivery of micronutrients in Honduras. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 95(2), 393-400, 2014.

ANDREWS, N. C. A genetic view of iron homeostasis. **Seminars in Hematology**, v. 39, n. 4, p. 227-234, 2002.

ARGYRI, K.; BIRBA, A.; MILLER, D.D.; KOMAITIS, M.; KAPSOKEFALOU, M. Predicting relative concentrations of bioavailable iron in foods using in vitro digestion: New developments. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 602-607, 2009.

ASHONG, J.; MUTHAYYA, S.; DE-REGIL, L.M.; LAILLOU, A.; GUYONDET, C.; MOENCH-PFANNER, R.; BURFORD, B.J.; BURFORD, J.P. Fortification of rice with vitamins and minerals for addressing micronutrient malnutrition (Protocol). **Cochrane Public Health Group**, n. 6, 2012.

BARTON, J. C.; CONRAD, M. E.; PARMLEY, R. T. Calcium inhibition of inorganic iron absorption in rats. **Gastroenterology**, v. 84, n. 1, p. 90-101, 1983.

BLACK, R. E.; VICTORA, C.G.; WALKER, S.P.; BHUTTA, Z.A.; CHRISTIAN, P.; ONIS, M.; EZZATI, M.; GREGOR, S.G.; KATZ, J.; MARTORELL, R.; UAUY, R. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. **The Lancet**, v. 382, n. 9890, p. 427-451, 2013.

BOLOBAJEV, J.; TRAPIDO, M.; GOI, A. Improvement in iron activation ability of alachlor Fenton-like oxidation by ascorbic acid. **Chemical Engineering Journal**, v. 281, p. 566-574, 2015.

BRAGA, J. A. P.; VITALLE, M. S. S. Deficiência de Ferro na Criança. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 38-44, 2010.

BRASIL. **Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher PNDS**. Ministério da Saúde, Centro Brasileiro de Análise e Planejamento. Brasília, DF, p. 296. 2009.

BRASIL. **Assunto: Restrição da oferta de doces e preparações doces na alimentação escolar**. Ministério da Educação. Coordenação de Segurança Alimentar e Nutricional – COSAN do Programa Nacional de Alimentação Escolar - PNAE. Brasília, p. 6. 2014.

BRASIL. **Consulta Pública nº80, de 13 de dezembro de 2004**. Regulamento Técnico Sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) De Proteína, Vitaminas E Minerais. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, 2004.

BURCHI, F.; FANZO, J.; FRISON, E. The Role of Food and Nutrition System Approaches in Tackling Hidden Hunger. **Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 358-373, 2011.

- CALI, S. PATH's Ultra Rice Project. **Food and Global Health Seminar**. Washington: [s.n.]. 2008.
- CAPANEMA, F. D. **Anemia em crianças de 0 a 6 anos em creches conveniadas da Regional Leste da Prefeitura de Belo Horizonte: aspectos clínicos e laboratoriais**. Dissertação de mestrado em pediatria, Belo Horizonte, MG, Faculdade de Medicina da UFMG, 2002.
- CARVALHO, A. P. D.; OLIVEIRA, V. B. D.; SANTOS, L. C. D. Hábitos alimentares e práticas de educação nutricional: atenção a crianças de uma escola municipal de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Pediatria**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 20-27, 2010.
- CAVALCANTE, A. U. M.; TINÔCO, A.L.A.; COTTA, R.M.M.; RIBEIRO, R.C.; PEREIRA, C.A.S.; FRANCESCHINI, S.C.C. Consumo alimentar e estado nutricional de crianças atendidas em serviços públicos de saúde do município de Viçosa, Minas Gerais. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 321-330, 2006.
- CHAKRAVARTY, I. Food-based strategies to control vitamin A deficiency. **Food and Nutrition Bulletin**. 21, 135–143, 2000.
- CHAVES, G. A volta ao mundo do arroz-doce. Quitutes e Quitandas, **Ig Comida**, 2012. Disponível em: <<http://comida.ig.com.br/colunistas/gutachaves/a-volta-ao-mundo-do-arrozdoce/c1597753449242.html>>. Acesso em: 31 Julho 2015.
- COSTA, J. T.; BRACCO, M. M.; GOMES, P. A. P.; GURGEL, R. Q. Prevalence of anemia among preschoolers and response to iron supplementation. **Jornal de Pediatria**, v. 87, p.76-79, 2011.
- COSTA, N. M. B.; MARTINO, H. S. D. Biodisponibilidade de Minerais. In: SILVA, S. M. C.; MURA, J. D. P. **Tratado de Alimentação, Nutrição & Dietoterapia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2011. p. 107-134.
- DEEHR, M. S.; DALLAL, G. E.; SMITH, K. T.; TAULBEE, J. D.; DAWSON-HUGHES, B. Effects of different calcium sources on iron absorption in postmenopausal women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, n. 1, p. 95-99, 1990.
- DELLA LUCIA, C. M. **Arroz fortificado com ferro, zinco, tiamina e folato: impacto sobre o estado nutricional de pré-escolares e biodisponibilidade de ferro e zinco em ratos Wistar**. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Nutrição. Viçosa, MG, p. 157. 2013.
- DELLA LUCIA, C. M.; RODRIGUES, K.C.C.; RODRIGUES, V.C.C.; SANTOS, L.L.M.; CARDOSO, L.M.; MARTINO, H.S.D.; FRANCESCHINI, S.C.C.; SANT'ANA, H.M.P. Diet Quality and Adequacy of Nutrients in Preschool Children: Should Rice Fortified with Micronutrients Be Included in School Meals? **Nutrients**, v.8 (5), 296, 2016.
- DELLA LUCIA, C. M.; VAZ TOSTES, M. D.; SILVEIRA, C. M.; RODRIGUES, F. C.; PINHEIRO SANT'ANA, H. M.; MARTINO, H. S.; COSTA, N. M. Iron bioavailability in Wistar rats fed with fortified rice by Ultra Rice technology with or without addition of yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 63, p. 64-73, 2013.
- DIAS, D. M. **Avaliação da qualidade proteica, da biodisponibilidade de ferro e da modulação da expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro de alimentos inseridos no programa de biofortificação**. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2015.
- DIAS, D. M.; MOREIRA, M.E.C.; GOMES, M.J.C.; TOLEDO, R.C.L.; NUTTI, M.R.; SANT'ANA, H.M.P.; MARTINO, H.S.D. Rice and Bean Targets for Biofortification Combined with High Carotenoid Content Crops; Regulate Transcriptional Mechanisms Increasing Iron Bioavailability. **Nutrients**, v. 7, p. 9683-9696, 2015.

- DIMAS, K. P. I. **Anemia Ferropriva: Uma Doença Prevalente na Infância, uma Questão de Saúde Pública.** UFMG. Belo Horizonte, MG, p. 27. 2010.
- EL-SAYED, M. M.; EL-SAMRAGY, Y. A.; EL-SAYED, N. H. Production of an imitation processed cheese using soy bean protein. **Lebensmitteltechnologie.** 24, 78-81, 1991.
- FAIRBANKS, V. G.; BEUTLER, E. **Iron metabolism.** New York: Mcgraw-Hill, 2001. p. 295-304.
- FAO. CHAPTER 2: Methods of food analysis. In: _____ **Food energy – methods of analysis and conversion factors.** Rome: Food and Agriculture Organization of The United States, 2003.
- FAO. **Food-based approaches for improving diets and raising levels of nutrition.** International Symposium on Food and Nutrition Security:. Rome: [s.n.]. 2010. p. 5.
- FERRI, C.; PROCIANOY, R. S.; SILVEIRA, R. C. Prevalence and Risk Factors for Iron-Deficiency Anemia in Very-Low-Birth-Weight Preterm Infants at 1 Year of Corrected Age. **Journal of Tropical Pediatrics,** v. 60, p.53-60, 2014.
- FISBERG, M.; NAUFEL, C.; BRAGA, J. A. P. National prevalence of anaemia in preschool children in Brazil: 10 capitais survey [abstract]. **Annals of Nutrition and Metabolism,** 17th International Congress of Nutrition, Viena, Austria, 2001.
- FRAZER, D. M. WILKINS, S.J.; BECKER, E.M.; MURPHY, T.L.; VULPE, C.D.; MCKIE, A.T. A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. **Gut,** v. 52, p. 340-346, 2003.
- GAITAN, D.; FLORES, S.; SAAVEDRA, P.; MIRANDA, C.; OLIVARES, M.; ARREDONDO, M.; ROMANA, D.L.; LONNERDAL, B.; PIZARRO, F. Calcium Does Not Inhibit the Absorption of 5 Milligrams of Nonheme or Heme Iron at Doses Less Than 800 Milligrams in Nonpregnant Women. **The Journal of Nutrition,** p. 1652-1656, 2011.
- GARCÍA-CASAL, M. N. Carotenoids increase iron absorption from cereal-based food in the human. **Nutrition Research,** v. 26, n. 7, p. 340-344, 2006.
- GREBMER, K. V.; SALTZMAN, A.; BIROL, E.; WIESMANN, D.; PRASAI, N.; YIN, S.; YOHANNES, Y.; MENON, P.; THOMPSON, J.; SONNTAG, A. **Global Hunger Index: The Challenge of Hidden Hunger.** Bonn, Washington D.C. and Dublin: Welthungerhilfe, International Food Policy Research Institute and Concer Worldwide, v. 1, 2014.
- GROTTO, H. Z. Metabolismo de ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia,** v. 30, n. 5, p. 390-397, 2008.
- GURALNIK, J.; EISENSTAEDT, R.S.; FERRUCCI, L.; KLEIN, H.G.; WOODMAN, R.C. Prevalence of anemia in persons 65 years older in the United States: Evidence for a high rate of unexplained anemia. **Blood,** v. 104, n. 8, p. 2263-2268, 2004.
- HALBERG, L.; BRUNE, M.; ERLANDSSON, M.; SANDBERG, A.S.; ROSSANDER-HULTEN, L. Calcium: effect of different amounts on non-haem and haem-iron absorption in man. **American Journal of Clinical Nutrition,** v. 53, p. 112-119, 1991.
- HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; ANDREWS, N. C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell,** v. 117, p. 285-297, 2004.
- HOTZ, C.; PORCAYO, M.; ONOFRE, G.; GARCÍA-GUERRA, A.; ELLIOTT, T.; JANKOWSKI, S.; GREINER, T. Efficacy of iron-fortified Ultra Rice in improving the iron status of women in Mexico. **Food and Nutrition Bulletin,** The United Nations University, v. 29, n. 2, p. 140-149, 2008.

HURREL, R.F.; LYNCH, S.R.; TRINIDAD, T.P.; DASSENKO, S.A.; COOK, J.D. Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 49, p. 546-552, 1989.

IYER, R.; TOMAR, S. K. Folate: a functional food constituent. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 9, p. 114-122, 2009.

JACINTO, V. **Fome oculta, considerada problema de saúde pública, pode ser minimizada com dieta fortificada**. em.com.br, 2012. Disponível em: <http://www.em.com.br/app/noticia/tecnologia/2012/10/05/interna_tecnologia,321439/fome-oculta-considerada-problema-de-saude-publica-pode-ser-minimizada-com-dieta-fortificada.shtml>. Acesso em: 13 ago. 2015.

JACOBS, A. Iron deficiency and iron overload. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 3, n. 2, p. 143-186, 1985.

KENNEDY, G.; NANTEL, G.; SHETTY, P. The scourge of "hidden hunger": global dimensions of micronutrient deficiencies. **Food, Nutrition and Agriculture**, v. 32, p. 8-16, 2003.

KOCHANOWSKI, B. A. Inhibition of iron absorption by calcium in rats and dogs: effects of mineral separation by time and enteric coating. **Nutrition Research**, v. 10, n. 2, p. 219-226, 1990.

LAMOUNIER, J. A.; BRACARENSE, B.; CHAMONE, B.C.; CAMPOS, C.T.; ROCHA, F.; HORTMANN, H.C.; RODRIGUES, L.M.C.; MUNIZ, L.G.; Prevalência de anemia ferropriva e parasitose intestinal em crianças de 0 a 6 anos no município de Carrancas, MG. **Anais do III Encontro de Extensão e I Semana do Conhecimento da UFMG**, Belo Horizonte, MG, 2000.

LEE, J.; HAMER, M. L.; EITENMILLER, R. R. Stability of retinyl palmitate during cooking and storage in rice fortified with Ultra Rice fortification technology. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 5, p. 915-919, 2000.

LI, Y.; DIOSADY, L. L.; JANKOWSKI, S. Rice† in the presence of encapsulated ferrous fumarate. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 59, n. 1, p. 24-33, 2008.

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

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

MATTHIAS, D. **PATH's Ultra Rice Project**. Apresentação Ultra Rice Project. Sydney: [s.n.]. 2010.

MATTHIAS, D. Ultra Rice: Improving the Nutritional Value of Rice. **International Food Aid Conference: Nutritional Panel**. [S.I.]: PATH. 2012.

MINIHANE, A. M.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Effect of calcium supplementation on daily nonheme-iron absorption and long-term iron status. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 1, p. 96-102, 1998.

MINOTTI, P. L.; BUCHOWSKI, M. S.; MILLER, D. D. Effects of calcium supplementation, calcium source and lactose on iron absorption in the rat. **Nutrition Research**, v. 13, n. 10, p. 1173-1181, 1993.

MIRANDA, A. S.; FRANCESCHINI, S.C.C.; PRIORE, S.E.; EUCLYDES, M.P.; ARAÚJO, R.M.A.; RIBEIRO, S.M.R.; NETTO, M.P.; FONSECA, M.M.; ROCHA, D.S.; SILVA, D.G.; LIMA, N.M.M.; MAFFIA, U.C.C. Anemia ferropriva e estado nutricional de crianças com

- idade de 12 a 60 meses do município de Viçosa, MG. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 163-169, 2003.
- MONSEN, E. R.; COOK, J. D. Food iron absorption in human subjects. The effects of calcium and phosphate salts on the absorption of nonheme iron. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 1142-1148, 1976.
- MRIDULA; POOJA, J. Preparation of iron-fortified rice using edible coating materials. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 246-252, 2014.
- NAVES, M.M.; FERNANDES, D.C.; PRADO, C.; TEIXEIRA, L. Fortificação de alimentos com o pó da casca de ovo como fonte de cálcio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27(1), 99-103, 2007.
- NORTON, R. C.; FIGUEIREDO, R.C.P.; DIAMANTE, R.; GOULART, E.M.A.; MOTA, J.A.C.; VIANA, M.B.; PENA, F.J.; LEÃO, E. Prevalence of anemia among school-children from Rio Acima (State of Minas Gerais, Brazil): Use of the standardized prevalence method and evaluation of iron deficiency. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 12, p. 1617-1624, 1996.
- OATES, P. S. The role of hepcidin and ferroportin in iron absorption. **Histology and Histopathology**, v. 22, p. 791-804, 2007.
- OLIVEIRA, C. S. M.; AUGUSTO, R. A.; MUNIZ, P. T.; SILVA, S. A.; CARDOSO, M. A. Anemia and micronutrient deficiencies in infants attending at Primary Health Care in Rio Branco, Acre, Brazil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, p. 517-529, 2016.
- OLIVARES, M.; PIZARRO, F.; RUZ, M. New insights about iron bioavailability inhibition by zinc. **Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 292-295, 2007.
- OSÓRIO, M. M.; LIRA, P. I.; ASHWORTH, A. Factors associated with Hb concentration in children aged 6-59 months in the State of Pernambuco, Brazil. **British Journal of Nutrition**, v. 91, n. 2, p. 307-315, 2004.
- PATH. **Technology Solutions for Global Health - Ultra Rice Technology**. PATH. Seattle, p. 1. 2013.
- QUEIROZ, A. R.; SZARFARC, S. C.; MARCHIONI, D. M. L. A fortificação das farinhas de trigo e de milho no fornecimento de ferro para a merenda escolar. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 63-73, 2008.
- RAMALHO, A. Fome Oculta, O impacto no Brasil e no Mundo. **Nestlé bio: nutrição e saúde**, São Paulo, v. 14, p. 48, 2011.
- RAMALHO, A. **Fome Oculta: Diagnóstico, Tratamento e Prevenção**. 1ª. ed. São Paulo: Editora Atheneu. 378 p. 2009.
- RODRIGUES, P.A.; MARQUES, M.H.; CHAVES, M.G.A.M.; SOUZA, C.F.; CARVALHO, M.F. Prevalência e fatores associados a sobrepeso e obesidade em escolares da rede pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, 16(1), 1581-1588, 2011.
- SCHNEIDER, J. M.; FUJII, M.L.; LAMP, L.C.; LÖNNERDAL, B.; DEWEY, K.G.; ZIDENBERG-CHERR, S. Anemia, iron deficiency, and iron deficiency anemia in 12–36-month-old children from low-income families. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, p. 1269-1275, 2005.
- SEGALL, S. D. Building and innovative commercial model to address micronutrient malnutrition. **Scaling Up Fortification in Brazil**. Brasília: PATH. 2012.
- SENA, K. C. M.; PEDROSA, L. F. C. Efeitos da suplementação com zinco sobre o crescimento, sistema imunológico e diabetes. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 2, p. 251-259, 2005.

- SHILS, M. E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. São Paulo. 2003.
- SIGHANLIFE. The Global Hidden Hunger Indices and Maps: An Advocacy Tool for Action. **Vitamins in Motion**. [S.l.], p. 4. 2014.
- SILVA, A. P. R.; VITOLO, M.R.; ZARA, L.F.; CASTRO, C.F.S. Efeito da suplementação de zinco a crianças de 1 a 5 anos de idade. *Jornal da Pediatria*, Porto Alegre, v. 82, n. 3, p. 1-5, 2006.
- SILVA, L. S. M.; GIUGLIANI, E. R. J.; AERTS, D. R. G. C. Prevalência e determinantes de anemia em crianças de Porto Alegre, RS, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 1, p. 66-73, 2001.
- SILVA, M. A.; CARVALHO, C. A.; FONSECA, P. C. A.; VIEIRA, S. A.; RIBEIRO, A. Q.; PRIORE, S. E.; FRANCESCHINI, S. C. C. Prevalência e fatores associados à anemia ferropriva e hipovitaminose A em crianças menores de um ano. **Cadernos Saúde Coletiva**, v.23, p. 362-367, 2015.
- SILVA, S. M. C.; MURA, J. P. **Tratado de Alimentação, Nutrição e Dietoterapia**. São Paulo, p. 107-134. 2011.
- SOUTH, P. K.; HOUSE, W. A.; MILLER, D. D. Tea consumption does not affect iron absorption in rats unless tea and iron are consumed together. **Nutrition Research**, v. 17, n. 8, p. 1303-1310, 1997.
- SPINELLI, M. G. N.; MARCHIONI, D.M.L.; SOUZA, J.M.P.; SOUZA, S.B.; SZARFAC, S.C. Fatores de risco para anemia em crianças de 6 a 12 meses no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 17, n. 2, p. 84-91, 2005.
- STOLTZFUS, R. J. Iron interventions for women and children in low-income countries. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 4, p. 756S-762S, 2011. ISSN 10.3945/jn.110.128793.
- STOUT, T. 'Hidden Hunger Index' Identifies Global Hot Spots of Micronutrient Deficiencies for First Time. **Vitamins in Motion, Sight and Life**. [S.l.]. 2013.
- TANDARA, L.; SALAMUNIC, I. Iron metabolism: current facts and future directions. **Biochemia Medica**, v. 22, n. 3, p. 311-328, 2012.
- UICICH, R.; PIZARRO, F.; ALMEIDA, C.; DÍAZ, M.; BOCCIO, J.; ZUBILLAGA, M.; BOCCIO, J.; ZUBILLAGA, M.; CARMUEGA, E.; O'DONNELL, A. Bioavailability of microencapsulated ferrous sulfate in fluid cow's milk. *Studies in human beings*. **Nutrition Research**, 19(6), 893-897, 1999.
- URBANO. Arroz Branco Urbano Vitaminado. **Urbano**. Disponível em: <<http://www.urbano.com.br/arroz-vitaminado/arroz-branco-urbano-vitaminado.html>>. Acesso em: 05 Outubro 2015.
- VAESKEN, M. L. S.; APERTE, E. A.; MOREIRAS, G. V. Voluntary fortification with folic acid in Spain: An updated food composition database. **Food Chemistry**, 2014.
- VALOR ECONÔMICO. Cresce consumo do 'super arroz' no Brasil. **Seagri - Notícias**, 2010. Disponível em: <<http://www4.seagri.ba.gov.br/noticias.asp?prt=true&qact=view¬id=22323>>. Acesso em: 6 Janeiro 2015.
- VIEIRA, M.N.C.N.; JAPUR, C.C.; RESENDE, C.M.M.; MONTEIRO, J.P. Valores de referência de ingestão de nutrientes para avaliação e planejamento de dietas de crianças de um a oito anos. **Medicina**, v.41, n. 1, p. 67-76, 2008.
- WALTER, M.; MARCHEZAN II, E.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, 2008.

WHO. **Preventing and controlling IDA through primary health care: a guide for health administrators and programme managers.** Geneva. 1989.

WHO. **Worldwide Prevalence of Anaemia 1993–2005.** Geneva. 2008.

ZANCUL, M. S. Fortificação de alimentos com ferro e vitamina A. **Medicina**, v. 37, p. 45-50, 2004.

4. MANUSCRITO I

Rice-based desserts fortified with iron, zinc, thiamine and folic acid by Ultra Rice[®]: formulation, physicochemical properties, sensory acceptance by school children and production costs

(A ser submetido ao periódico *Food and Bioproducts Processing*)

Thomás Valente de Oliveira^a, Maria Eliza Castro Moreira^b, Renata Celi Lopes Toledo^b,
Mônica Ribeiro Pirozi^a, José Benício Paes Chaves^a, Ceres Matos Della Lucia^b, Hércia
Stampini Duarte Martino^b, Eduardo Basílio de Oliveira^a ✉

^a Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de Viçosa (UFV),
Campus Universitário, s/n, CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brazil.

^b Departamento de Nutrição e Saúde (DNS), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Campus
Universitário, s/n, CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brazil.

✉ Corresponding author: eduardo.basilio@ufv.br

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a dessert fortified with Ultra Rice[®] (UR) using soy soluble extract (SSE) as a cow's milk substitute, to determine chemical composition, stability of physicochemical characteristics immediately manufactured and after 20 days of storage at 5°C, sensory acceptability and estimated production costs. Four formulations were developed, two with common rice plus cow's milk (CR-M) or SSE (CR-S); and two fortified desserts with Ultra Rice[®] plus cow's milk (UR-M or SSE (UR-S). All formulations had the same soluble solids level. Formulations with cow's milk had higher contents of lipids, protein and ashes than formulations with SSE. The UR increased the level of iron and zinc by 12 and 6 times, respectively, compared to controls without Ultra Rice[®]. Among the physicochemical characteristics, the color was different between cow's milk and SSE-based formulations. The fortified formulations increased the acidity during 20 days of storage. The sensory acceptance was better for CR-M, while the others were in the threshold between good and bad acceptance. The industrial process was economically viable (Internal rate of return < Hurdle rate) and the developed products can be considered well-positioned, with regard to the desserts traditionally served in Brazilian public schools.

LIST OF ABBREVIATIONS

CR	Common rice-based formulations
CR-M	Formulations with common rice and milk
CR-S	Formulations with common rice and SSE
DRI	Dietary Reference Intake
IA	Acceptability Index
IRR	Internal rate of return
M	Cow's milk-based formulations
NPV	Net present value
S	SSE-based formulations
SSE	Soy soluble extract
UR	Ultra Rice-based formulations
UR-M	Fortified formulations with Ultra Rice [®] and milk
UR-S	Fortified formulations with Ultra Rice [®] and SSE

4.1. INTRODUCTION

Micronutrients are compounds, such as vitamins and minerals, whose regular intake in small quantities (some few mg or even μg per day) is essential to human beings to stimulate cell growth and a proper functioning of metabolism (Kennedy et al., 2003). It is estimated that two billion people worldwide are affected by a chronic deficiency of micronutrients, characterizing a condition known as “hidden hunger” (Muthayya et al., 2013). Hidden hunger often causes minimal physiological changes, difficultly noticeable in routine clinical examinations, so the stage prior to emergence lacks clear clinical signs. This type of nutritional deficiency happens more frequently in developing countries, where the scarcity of material resources is more pronounced, and less attention is given to practices of diets accounting for equilibrated amounts of fruits, vegetables, meat, milk, eggs and fats, for an adequate supply of fat soluble vitamins (A, D, E and K) (Kennedy et al., 2003).

Iron deficiency is the nutritional deficiency that prevails in the world, affecting mainly women and children in developing countries (WHO, 2008). According to the latest data found, it is estimated that in the year 2010, four billion individuals present iron deficiency around the world, and that iron deficiency anemia affected more than two billion people, mainly in developing countries and in low-income populations (Grebmer et al., 2014). Among population groups, children at pre-school age (up to 5 years old) are the most affected by this problem (WHO, 2008). In the 20 countries most affected by hidden hunger in the world, among which Brazil is included, 40% of pre-school children have some degree of muscle atrophy due to the deficiency of iron and vitamin A (Muthayya et al, 2013). Other problems caused by iron deficiency children are learning disabilities, cognitive problems and growth retardation that increase the government spending on health (FAO, 2010; Schneider et al., 2005; WHO, 2008). This panel shows the need of studying and implementing both corrective and preventive actions aiming to minimize the negative impacts this public health problem.

For this purpose, food fortification is a standing out alternative, that consists in the adding of micro-nutrients in foods commonly consumed by the target group (Lee et al., 2000). Food fortification appears, therefore, as a more economical, flexible and socially acceptable way to improve the nutritional status of individuals suffering from iron deficiencies (Chakravarty, 2000). However, for this type of intervention be effective, it is important to choose carefully the food vehicle", in order to ensure that it is regularly consumed by the majority of these individuals.

Ultra Rice[®] is a rice flour-based food fortified with iron, zinc, thiamine and folic acid, culturally appropriate for countries in which rice is usually consumed (such as Brazil and several Asian countries), with relatively low cost, developed by Program for Appropriate Technology in Health (PATH, 2013). Researches have shown that Ultra Rice[®] is well

accepted sensorially and contributes positively for reducing iron deficiency in children worldwide (Della Lucia et al., 2016; Matthias, 2012; Matthias, 2010; Hotz et al., 2008). Despite of this, it is still necessary to establish a supply chain in these countries, in order to consolidate the effective distribution of Ultra Rice® wherein. A strategic alternative to promote the regular intake of Ultra Rice® by children, in Brazil for example, would be its insertion in a traditional rice/ cow's milk-based dessert called "arroz doce" (literally, "sweet rice"), which is largely appreciated in this country. Besides being to culturally appropriate, this dessert is legally allowed by to be served daily in children schools (BRASIL, 2014).

However, formulated foods containing cow's milk have high contents of calcium and other substances that can inhibit iron absorption in the gastrointestinal tract, such as caseins and whey proteins (Hurrell et al., 1989). On the other hand, it has been shown that plant proteins, such as soy proteins, can be successfully used for partial or total replacement of milk proteins in different food materials (Aboufazli et al., 2016; Li et al., 2013; Kattan et al., 2011; Bachmann, 2001).

In this context, this study was intended to formulate and to evaluate different variants of rice-based desserts based on the traditional "arroz doce" formulated with cow's milk and soy soluble extract (SSE) as a substitute, using the Ultra Rice® technology to ensure high iron concentration. Evaluations done concerned proximate composition, stability of physicochemical characteristics after cold storage, sensory acceptability and estimated production costs of this innovative food product.

4.2. MATERIALS AND METHODS

4.2.1. Raw materials and ingredients

Ultra Rice® grains fortified with iron (as micronized ferric pyrophosphate), zinc (as zinc oxide), thiamine (as thiamine mononitrate) and folic acid (PATH, 2013) and common rice (type 1, long, thin) were kindly provided by URBANO (Brazil). Sucrose (Union, Brazil), NaCl (Cisne, Brazil) and artificial vanilla flavor (Dr. Oetker, Brazil) were all purchased at local market. Soy soluble extract (SSE) (Provesol FB®) was kindly furnished by OLVEBRA (Brazil). Whole cow was kindly provided by FUNARBE (Brazil).

4.2.2. Formulations

Four different formulations were initially proposed, by changing the type of rice (Ultra Rice® (UR) or common rice (CR)), and the type of fluid protein-rich ingredient (cow's milk or SSE) based on the traditional "arroz doce".

After preliminary tests, starting from one traditional recipe, the composition of each formulation was defined as described in Table 1. The proportion of sucrose was

stipulated in order to obtain a fluid mixture (“cow’s milk + sucrose” or “solution of SSE (6 %) + sucrose”) with the same total concentration of soluble solids.

For the fortified formulations with cow’s milk (UR-M) and with SSE (UR-S), the total amount of rice added was composed of a mixture of common rice CR (75%) and UR (25%), so that, at the end of the production process, the desserts possessed an iron content enough to be considered fortified – 4.9 mg iron per 90 g on average, exceeding the 30% of DRI (Dietary Reference Intake), minimum to be considered a fortified food (ANVISA, 1998).

Table 1 - Composition defined for each formulation

Ingredients (%)	Formulation			
	CR-M	UR-M	CR-S	UR-S
Common Rice	11.0	8.4	11.0	8.4
Ultra Rice®	---	2.6	---	2.6
Cow's milk	78.0	78.0	---	---
Solution of SSE (6 %)	---	---	71.6	71.6
Other ingredients				
<i>Sucrose</i>	10.5	10.5	17.0	17.0
<i>Vanilla flavor</i>	0.50	0.50	0.50	0.50
<i>Salt</i>	0.06	0.06	0.06	0.06
<i>Water for cooking*</i>	9 x	9 x	9 x	9 x

SSE: Soy soluble extract; * Volume of water relative to the rice mass (CR + UR)

CR-M: common rice + cow's milk; UR-M: Ultra Rice® + cow's milk; CR-S: common rice + SSE; UR-S: Ultra Rice® + SSE.

4.2.3. Production process

The production process, including a mass balance, considering 100 kg of fortified formulations (containing Ultra-Rice), is shown in Fig. 1 (with cow's milk) and Fig. 2 (with SSE).

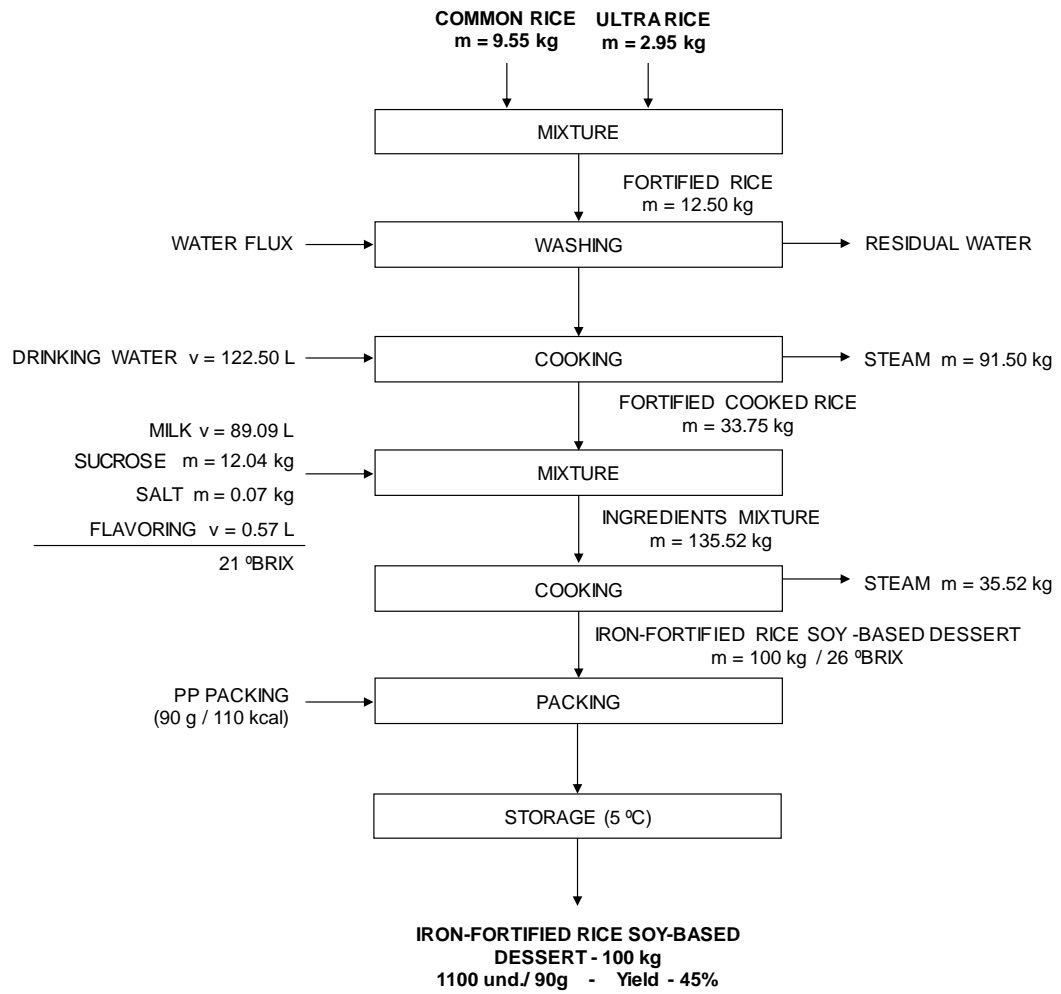


Fig. 1 - Schematic representation of the production process including mass balance of 100 kg of UR-M
SSE: Soy soluble extract
Residual water: dirty water after washing

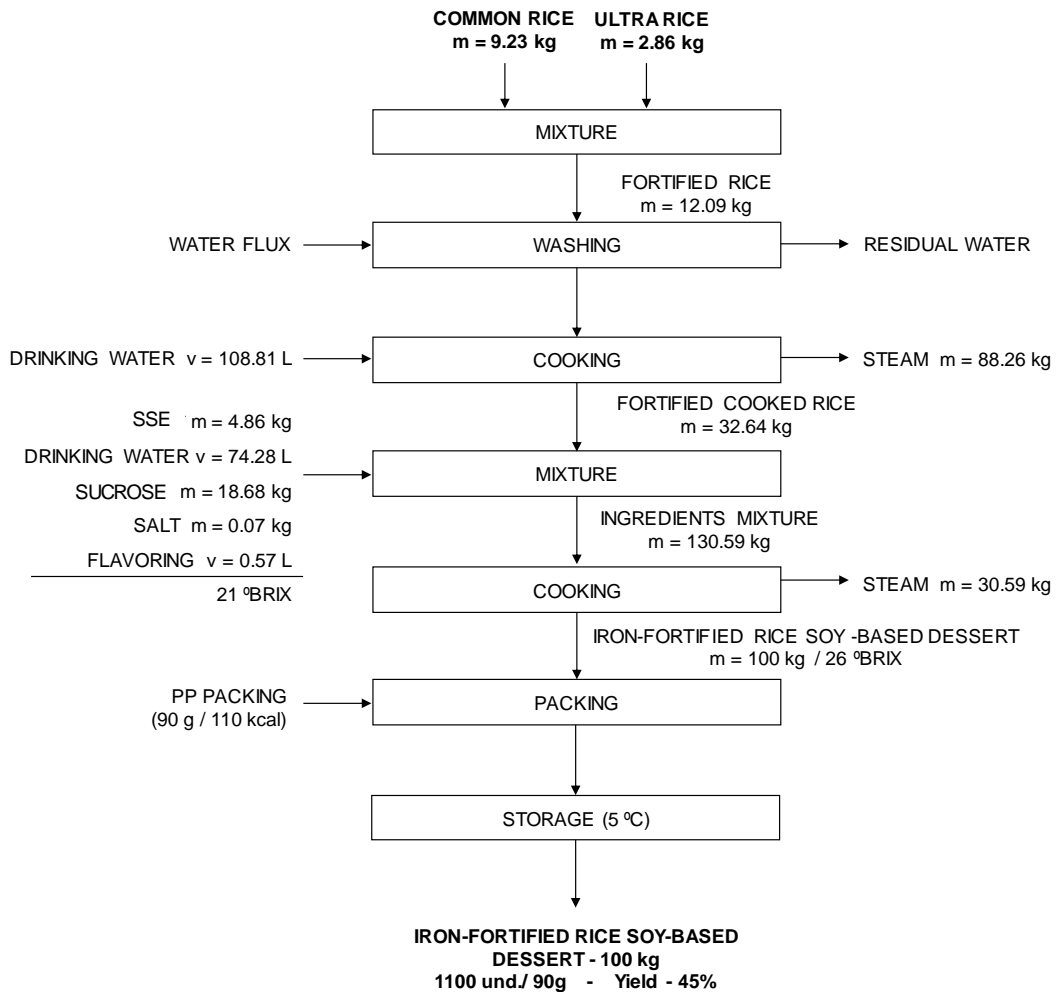


Fig.2 - Schematic representation of the production process including mass balance of 100 kg of UR-S
SSE: Soy soluble extract;
Residual water: dirty water after washing

4.2.4. Centesimal composition and minerals contents

Prior to the analyses of proteins, lipids, fibers and minerals, the samples were frozen and lyophilized, aiming to reduce the water content and thus to improve the accuracy of results. For moisture and ash analyses, samples were used as in their original state.

The moisture content (MC) was evaluated by directly drying the samples in an oven (DDL SEC-100-ANA, Brazil) with the temperature set at 105°C (AOAC 934.1, 1998). Results (%) were calculated according to the equation as follow (Eq.(1)), where "N" represents the mass (g) lost after drying and "P" the weight (g) of the full sample.

$$MC = \frac{100 * N}{P} \quad (\text{Eq. 1})$$

The total ash content (A) was evaluated in muffle (Novainstruments, NI 1385, Brazil) at 550 °C (AOAC 930.22 A, 2000). The crucibles used for this analysis were previously heated in oven to 550 °C and weighed on an analytical balance. The results of total ash content (%) were calculated according to the equation as follow (Eq.(2)),

where "S" represents the sample mass (g) after calcination and "P" the weight (g) of the full sample

$$A = \frac{100 * S}{P} \quad (\text{Eq. 2})$$

The protein content (P) was evaluated by the Kjeldahl method (AOAC 960.52, 1998), assuming that all proteins present in formulation were from rice ($f_{\text{PTN}} = 5.95$) (Müller, 2014), from cow's milk ($f_{\text{PTN}} = 6.38$) (FAO, 2003) or from the SSE ($f_{\text{PTN}} = 5.71$) (FAO, 2003). A multiplication factor for the nitrogen content was calculated ponderously for each formulation. For cow's milk-based formulas this factor was 6.31, whereas for the formulations containing SSE, it was 5.95.

The determination of lipids (L) was performed in two replicates, using a Soxhlet fat extractor (Tecnal TE 044-5 / 50, Brazil) (AOAC 920.39, 1998). Petroleum ether (Vetec) at 90-100 °C was used as solvent extractor. At the end of the analysis, the samples were removed from the equipment, dried in an oven (DDL SEC-100-ANA, Brazil) with the temperature set at 105°C for 30 minutes. Lipids contents were then estimated by mass difference.

To determine the concentrations of the micronutrients Fe, Zn and Ca, the lyophilized samples were previously digested with nitric acid (Sigma), at 150 °C, during 8 horas (AOAC 935.13, 1998). The minerals contents were determined in digested mineral solution using an Atomic Absorption Spectrometry Inductively Coupled Plasma apparatus (BBL, UV-M90A, Brazil).

The total dietary fiber analysis (F) was carried out in two replicates. Firstly, the samples were underwent an enzymatic hydrolysis, using an enzyme cocktail (Total dietary fiber assay Kiyonaga, Sigma®) containing heat-resistant amylase, protease, and amyloglucosidase. After that, samples were submitted to a filtration using glass crucibles coupled with sintered glass plates (porosity n°2, ASTM 40-60) and celite filter. The total dietary fiber was obtained by the sum of soluble and insoluble dietary fiber (AOAC 985.29, 1998).

Finally, carbohydrates (C) contents were calculated by the difference between the total sample mass and the sum of the masses of other constituents (Eq.3):

$$C = 100 - (MC + L + P + F + A) \quad (\text{Eq. 3})$$

Energy intake per g of each formulation was estimated using the classical conversion factors of 9 kcal/g for lipids, 4 kcal/g for protein and 4 kcal/g for carbohydrates (Merrill and Watt, 1973).

4.2.5. Physicochemical analysis

Titrateable acidity, pH, water activity and colorimetric analyses were performed to assess possible changes of in formulations during storage. Analyses were performed

soon after preparation (day 0). In addition, a mass of 90 g of each formulation was packaged in polypropylene packages of 100 mL, stored at 5 °C ± 1 °C and analyzed after 20 days.

Color was instrumentally evaluated using a Minolta colorimeter. The reading system used was the CIELa*b* (Commission Internationale de l'Eclairage), represented by parameters: L* (brightness - black (0) to white (100)), a* (-a green (-60) to + a red (60)), b* (blue -b (-60) to + yellow b (60)). The parameters hue (hue angle, h°) and saturation (chroma, C) from the data of a* and b* were calculated as follows (Eq.4 and Eq.5) (VASCONCELOS et al., 2015).

$$h^\circ = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (\text{Eq. 4})$$

$$C = (a^{*2} + b^{*2})^{0.5} \quad (\text{Eq. 5})$$

Water activity measurements were performed at 25 °C, using a water activity meter Aqualab (Series 3ET) (AOAC, 32.004-32.009, 1998). Measurements of pH were performed using a digital pHmeter (Phtek, PHS-3E, Brazil) (AOAC 981.12, 1998). Titratable acidity (A) assessed titration with standard NaOH solution (1 mol·L⁻¹) and then applying equation (Eq.6) (AOAC 942.15, 1998), in which "V" is the volume (mL) of sodium hydroxide consumed spent for titration, "f" is the correction factor of sodium hydroxide solution, "P" is the mass (g) of sample and "c" is the dilution factor of the NaOH solution.

$$A = \frac{V * f * 100}{P * c} \quad (\text{Eq. 6})$$

4.2.6. Consumer sensory acceptance testing

Sensory evaluations were carried out with 250 children of both sexes in school age (5-9 years) and pre-school age (3-4 years). The formulations were prepared and distributed according to the specifications of the Brazilian National School Feeding Programme (PNAE) (BRASIL, 2014). Portions of 90 g were placed into cups of 100 mL and offered to each child individually, along an acceptance questionnaire (Fig. 3). This questionnaire contained five illustrations of facial expressions related to their opinion about the product consumed, simulating a hedonic scale with five points. The score five corresponds to "very appreciate", the four to "appreciate", the three to "indifferent", the two to "dislike" and the scores one to "very dislike" For each formulation, a mean from scores assigned by the children was calculated. Two acceptance classifications were assumed: "good acceptance" for average scores > 3, and "bad acceptance" for average scores ≤ 3.

NOME: _____ IDADE: _____

VOCÊ GOSTOU DA SOBREMESA?

Fig. 3 - Sensory evaluation questionnaire. “Nome” = Name ; “Idade” = Age; “Você gostou da sobremesa” = Did you like the dessert?.

Children under five years old were unable to answer the questionnaire. Therefore, the sensory acceptance was also assessed through the test of "intake remainder", with modifications (Cecane, 2010). In this test, the acceptability of the respective preparations was evaluated by the Acceptability Index (AI), which relates the amount consumed to the amount initially distributed according to equation (Eq.7), in which "TMS" is the total mass served and "R" mass that was not ingested.

Two acceptance classifications were assumed: “good acceptance” for $IA > 70\%$, and “bad acceptance” for $IA \leq 70\%$ (Teixeira et al., 1987).

$$AI = \frac{TMS - R}{TMS} \times 100\% \quad (\text{Eq. 7})$$

All experimental procedures with humans were performed in accordance with the ethical principles for human experimentation and the study approved by the Ethics Committee of the Federal University of Viçosa (Number 1.328.871; date of approval: November 19th 2015).

4.2.7. Cost estimation

Using methods of economic engineering (Kierulff, 2008), the production costs were estimated and stratified according to raw material, other inputs, overhead and labor for a plant of 900 kg per day. In addition, economic feasibility indicators were calculated as total investment, break-even point, internal rate of return (IRR), payback and net present value (NPV).

4.2.8. Statistical analysis

For chemical composition and stability analyses of the formulations, a completely randomized design in a 2x2 factorial was used, in which the sources of variation were the type of rice and the type of protein source. Each assay was performed in three repetitions. The factor levels were compared using ANOVA ($p < 0.05$). To evaluate the

influence of time on the physicochemical variables was used the test "t student" ($p < 0.05$). In sensory acceptance tests, each formulation was considered as a treatment, and each child was considered a repetition. Data were analyzed by ANOVA ($p < 0.05$), followed by Tukey mean test ($p < 0.05$) when necessary. All of these analyses were carried out using the software package Statistical Analysis System (SAS), version 9.0, licensed to the UFV.

4.3. RESULTS

4.3.1. Centesimal composition and mineral contents

No statistical difference ($p > 0.05$) was observed among the four formulations, concerning the moisture, carbohydrate and dietary fiber contents (Table 2). For protein, lipid and ash contents, statistical differences, attributed to the type of fluid ingredient (cow's milk or SSE), were found. For these components, all contents were higher in M formulations than those found in S formulations. For the first ones, the proteins, lipids and ashes contents were 3.13 ± 0.36 %, 1.24 ± 0.44 % and 0.67 ± 0.14 % respectively, whereas for the later ones, these values were 2.45 ± 0.25 %, 0.37 ± 0.15 % and 0.35 ± 0.03 %, respectively.

Regarding the minerals, UR-based formulations presented significantly higher ($p < 0.05$) contents of iron and zinc, as expected (Fig.4 A-B). As Ultra Rice® carries higher levels of these minerals, their contents in UR-based formulations are due to the use of this fortified ingredient. Also not surprisingly, M formulations had higher contents of calcium than S formulations (Fig.4C), because cow's milk contains more calcium than SSE.

Table 2 - Results of centesimal composition analyses: moisture, carbohydrates, proteins, lipids, ash and dietary total fiber; for each formulation obtained by combination of the protein (cow's milk and SSE) and rice (common rice and Ultra Rice®) types.

PROTEIN TYPE	COW'S MILK		SSE		P _{VALUE} PROTEIN TYPE	p _{VALUE} RICE TYPE	P _{VALUE} INTERACTION	
	RICE TYPE	COMMON RICE	ULTRA RICE®	COMMON RICE				ULTRA RICE®
MOISTURE (%)		71.0 ± 5.1	68.0 ± 2.30	69.9 ± 3.6	66.6 ± 1.5	0.1295	0.4848	0.9836
CARBOHYDRATES (%)		22.96 ± 4.20	25.91 ± 3.92	26.67 ± 1.72	29.76 ± 1.48	0.1291	0.0667	0.9692
PROTEINS (%)		3.08 ± 0.56	3.17 ± 0.07	2.61 ± 0.28	2.29 ± 0.05	0.0060 *	0.5287	0.2966
LIPIDS (%)		1.24 ± 0.25	1.24 ± 0.65	0.38 ± 0.22	0.36 ± 0.04	0.0066 *	0.9605	0.9404
ASH (%)		0.59 ± 0.10	0.75 ± 0.14	0.33 ± 0.03	0.36 ± 0.04	0.0002 *	0.1215	0.2317
DIETARY TOTAL FIBER (%)		0.007 ± 0.011	0.001 ± 0.001	0.010 ± 0.007	0.010 ± 0.001	0.1205	0.4122	0.2566
<i>INSOLUBE FIBER (%)</i>		0.005 ± 0.002	0.001 ± 0.001	0.005 ± 0.007	0.001 ± 0.001	--	--	--
<i>SOLUBLE FIBER (%)</i>		0.003 ± 0.003	0.000 ± 0.000	0.005 ± 0.001	0.006 ± 0.001	--	--	--
<i>CALORIC DENSITY (kcal/100g)</i>		115.32	127.48	120.54	131.44			

SSE: Soy soluble extract

(*) statistical differences between the "type of protein" in the same line by F test (p < 0.05);

() statistical differences between the "type of rice" in the same line by F test (p < 0.05);**

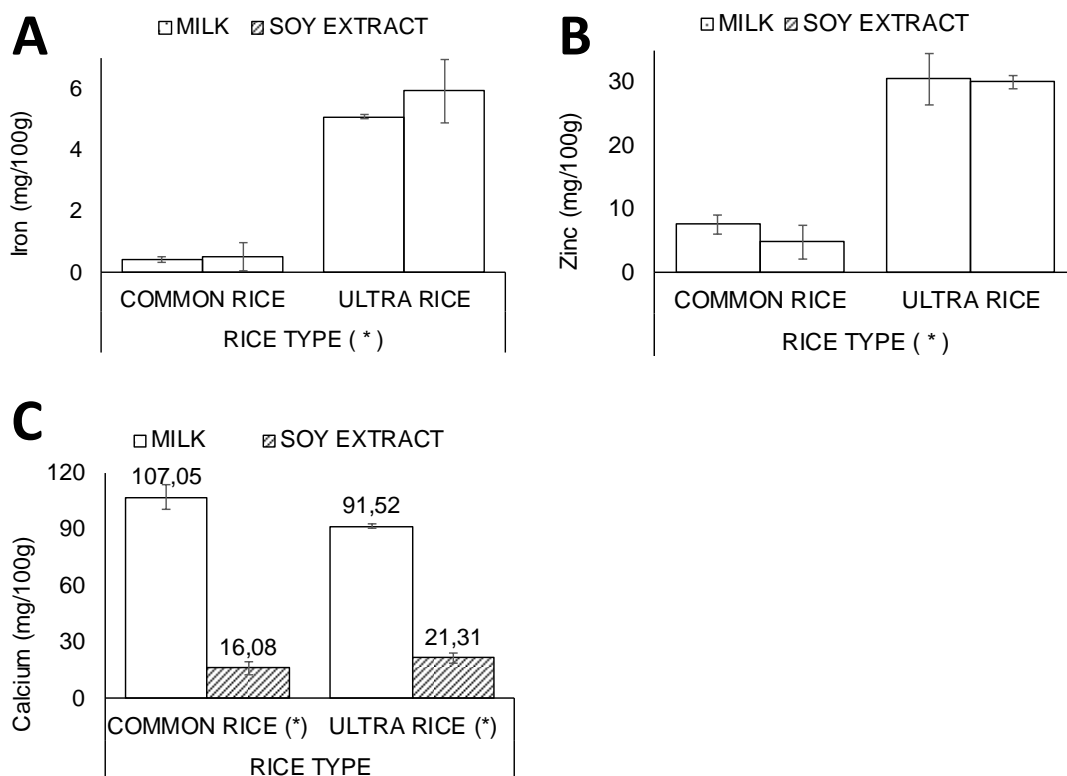


Fig. 4 – Iron (A), Zinc (B) and Calcium (C) concentrations in each formulation. (*) Statistical differences between the levels of the same factor by F test ($p < 0.05$);

4.3.2. Physicochemical analysis

Results for analyses of water activity, titratable acidity, and pH are compiled in Table 3. These analyses were performed for each formulation, both immediately after the production ($t = 0$) and after 20 days ($t = 20$) of storage at 5 °C.

SSE-based formulations presented lower water activity ($p < 0.05$) compared to M formulations, although no significant difference ($p > 0.05$) was detected between values found at $t = 0$ and $t = 20$. For the CR formulations, water activity was significantly lower ($p < 0.05$) after 20 days. Indeed, syneresis was observed in all cases, more pronouncedly in SSE-based formulations, as evidenced in photographs in Fig. 5.

Formulations differing with regard to the type of fluid ingredient (cow's milk or SSE) were significantly different ($p < 0.05$) in terms of titratable acidity values at $t = 0$, with M formulations presenting higher values. However, interestingly, after 20 days the titratable acidity increased over than 10 times, but only in UR formulations. Similarly, UR-based formulations presented significantly lower ($p < 0.05$) pH values after 20 days of storage.

Finally, concerning the analyses of color, the main differences were due to the type of fluid ingredient (cow's milk or SSE). As shown in photographs in Fig. 6, S formulations presented a brownish color, whereas M formulations were white and presented a "brighter" aspect. Concerning the later ones, after 20 days that containing UR kept its white colorations, but that elaborated with CR became darker, presenting a color

somewhat similar to that of the SSE-based counterparts. Instrumental data (CIE-La*b* parameters) corroborated these visual analyses: SSE-based formulations presented both L* and h° values statistically lower ($p < 0.05$) than the M formulations, both at $t = 0$ and $t = 20$. Values of the parameter a* were significantly higher ($p < 0.05$) for S formulations at $t = 20$. No significant difference ($p > 0.05$) for the b* and Chroma values was observed among the formulations.

Table 3 –Results of physicochemical analyses: water activity, pH, total titrable acidity and colorimetry (L*, a*, b*, Hue* and Chroma*); for each formulation obtained by combination of the protein (cow's milk and SSE) and rice (common rice and Ultra Rice®) types after 0 and 20 days of storage at 5°C.

PROTEIN TYPE	RICE TYPE	COW'S MILK		SSE		PVALUE PROTEIN TYPE	PVALUE RICE TYPE	PVALUE INTERACTION
		COMMON	ULTRA RICE®	COMMON	ULTRA RICE®			
WATER ACTIVITY	0 days	0.985 ± 0.004	0.982 ± 0.004	0.981 ± 0.004	0.974 ± 0.002	0.0215*	0.0300**	0.3796
	20 days	0.984 ± 0.003	0.983 ± 0.002	0.977 ± 0.003	0.977 ± 0.002	0.0103*	0.4624	0.5073
	<i>p</i> VALUE	0.0232***	0.1105	0.0120***	0.0586			
pH	0 days	7.16 ± 0.11	7.06 ± 0.04	6.97 ± 0.09	6.34 ± 0.85	0.1043	0.1840	0.3226
	20 days	7.22 ± 0.02	6.64 ± 0.43	7.03 ± 0.05	6.39 ± 0.50	0.2974	0.0132**	0.8831
	<i>p</i> VALUE	0.5475	0.2187	0.1122	0.8177			
TOTAL TITRABLE ACIDITY (%)	0 days	0.909 ± 0.086	0.796 ± 0.032	0.692 ± 0.036	0.630 ± 0.095	0.0013*	0.0582	0.5438
	20 days	0.950 ± 0.095	14.208 ± 3.132	1.736 ± 1.894	10.516 ± 2.739	0.3030	<0.0001**	0.1283
	<i>p</i> VALUE	0.5852	0.0179***	0.4393	0.0258***			
COLORIMETRY - L*	0 days	50.20 ± 2.19	48.64 ± 1.59	43.10 ± 3.31	39.01 ± 0.39	<0.0001*	0.0104**	0.1733
	20 days	48.17 ± 2.19	45.28 ± 1.59	41.02 ± 3.31	38.33 ± 0.91	0.0005*	0.0581	0.9388
	<i>p</i> VALUE	0.4719	0.1129	0.5452	0.2243			
COLORIMETRY - a*	0 days	7.23 ± 0.96	7.39 ± 0.30	8.12 ± 1.30	7.96 ± 0.62	0.1881	0.9924	0.7586
	20 days	7.44 ± 0.30	6.22 ± 0.52	8.02 ± 0.63	7.92 ± 0.75	0.0088*	0.0806	0.1262
	<i>p</i> VALUE	0.7828	0.1232	0.8520	0.7106			
COLORIMETRY - b*	0 days	32.21 ± 1.41	32.23 ± 0.98	31.96 ± 0.90	30.58 ± 1.10	0.1613	0.3052	0.2899
	20 days	30.74 ± 1.35	31.00 ± 1.35	30.00 ± 0.41	31.02 ± 0.87	0.2222	0.4778	0.4507
	<i>p</i> VALUE	0.2435	0.0789	0.4147	0.0841			
COLORIMETRY - Hue*	0 days	1.35 ± 0.02	1.35 ± 0.01	1.32 ± 0.03	1.32 ± 0.01	0.0335*	0.5192	0.8961
	20 days	1.33 ± 0.01	1.37 ± 0.01	1.32 ± 0.01	1.32 ± 0.02	0.0092*	0.0656	0.0656
	<i>p</i> VALUE	0.2965	0.2999	0.8399	0.1835			
COLORIMETRY - Chroma*	0 days	33.02 ± 1.59	33.07 ± 0.80	32.99 ± 1.17	31.60 ± 1.22	0.3214	0.3705	0.3379
	20 days	31.64 ± 0.25	32.03 ± 1.44	30.64 ± 0.49	32.02 ± 1.04	0.1359	0.3765	0.3825
	<i>p</i> VALUE	0.3126	0.0546	0.4361	0.0662			

(*) Statistical differences between the "type of protein" in the same line by F test ($p < 0.05$).(**) Statistical differences between the "type of rice" in the same line by F test ($p < 0.05$). (***) Mean statistical differences between the storage periods in the same column by t test ($p < 0.05$).

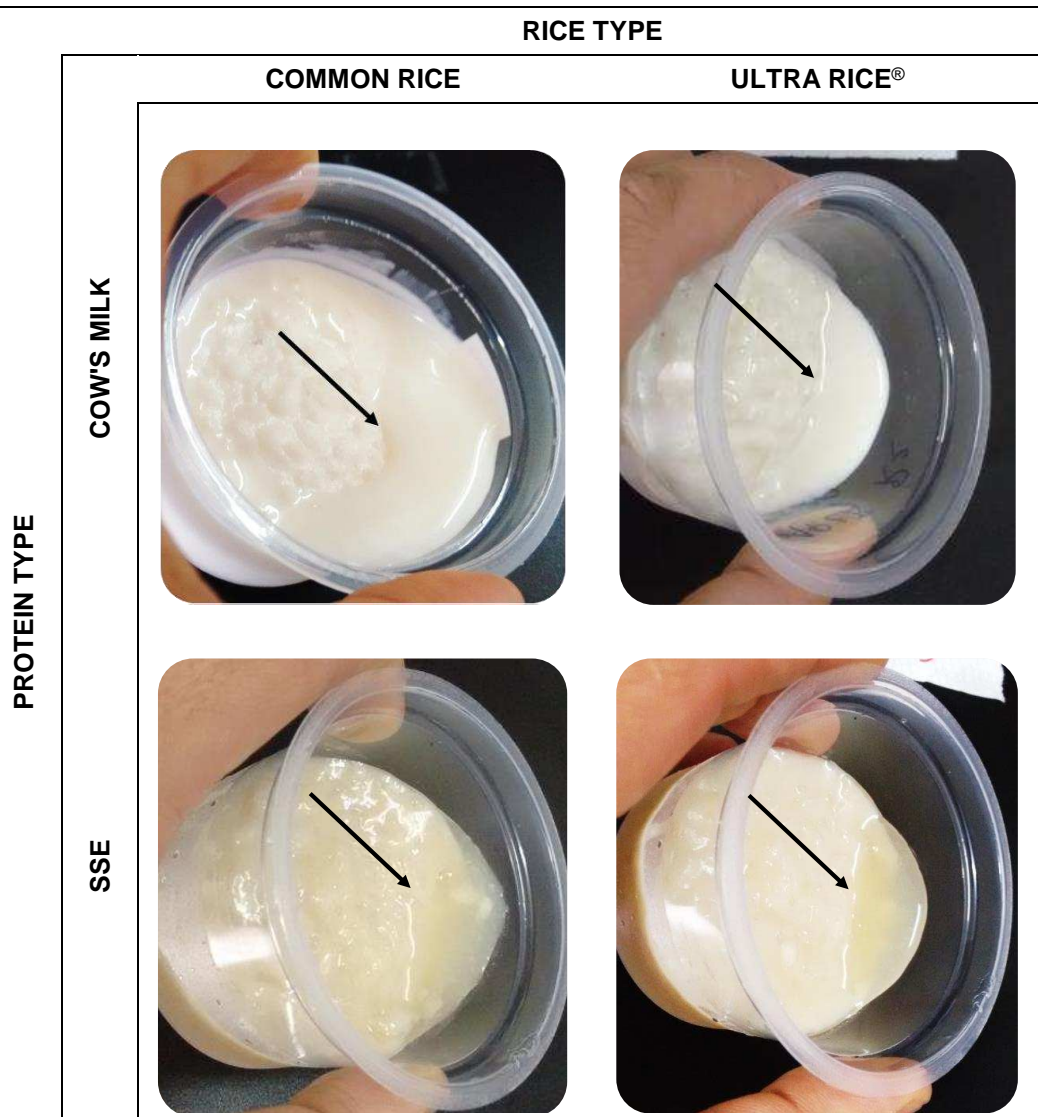


Fig. 5 - Occurrence of syneresis indicated by arrows after 20 days of storage at 5°C.
 * SSE: Soy soluble extract

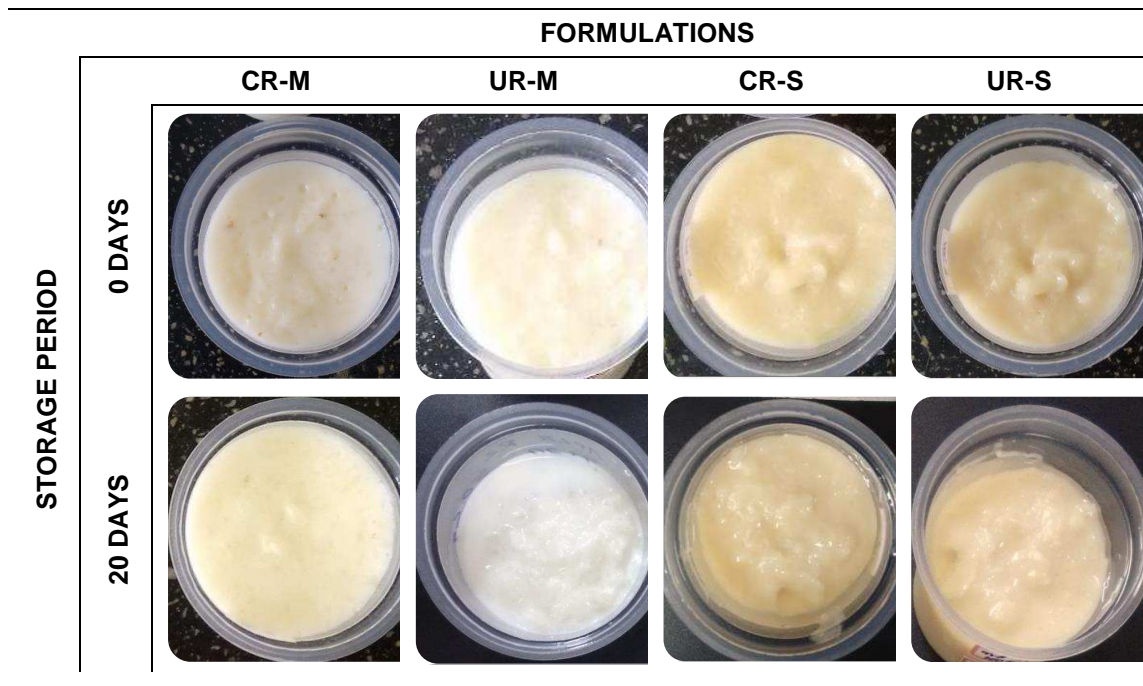


Fig. 6 - Color difference at 0 and 20 days observed visually. CR-M: common rice + cow's milk; UR-M: Ultra Rice® + cow's milk; CR-S: common rice + SSE; UR-S: Ultra Rice® + SSE.

4.3.3. Consumer sensory acceptance testing

The two different sensory evaluation methods applied led to different acceptance levels for each formulation (Fig. 7). According to results from acceptance questionnaires, all formulations obtained rating "good acceptance" (Fig.7A). On the other hand, through the intake remainder method the formulation "CR-M" was classed with "good acceptance", while the three others were classed with "bad acceptance" acceptance (Fig.7B).

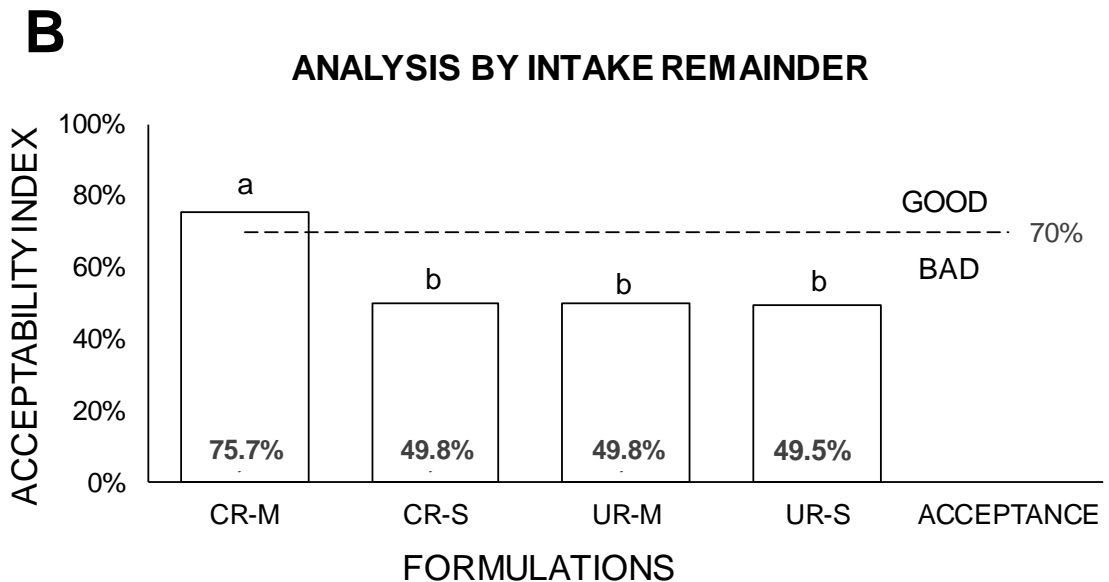
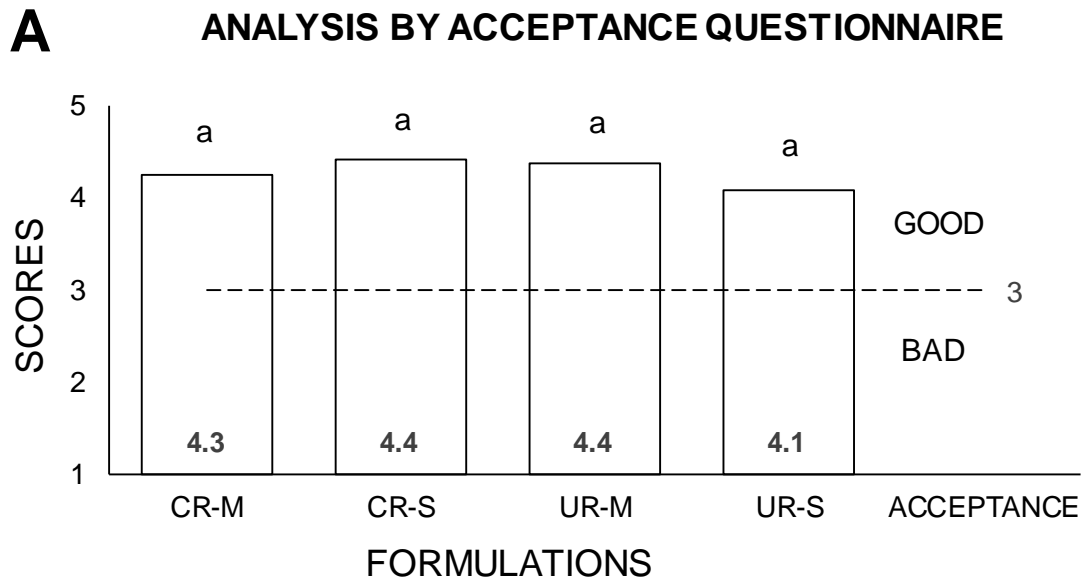
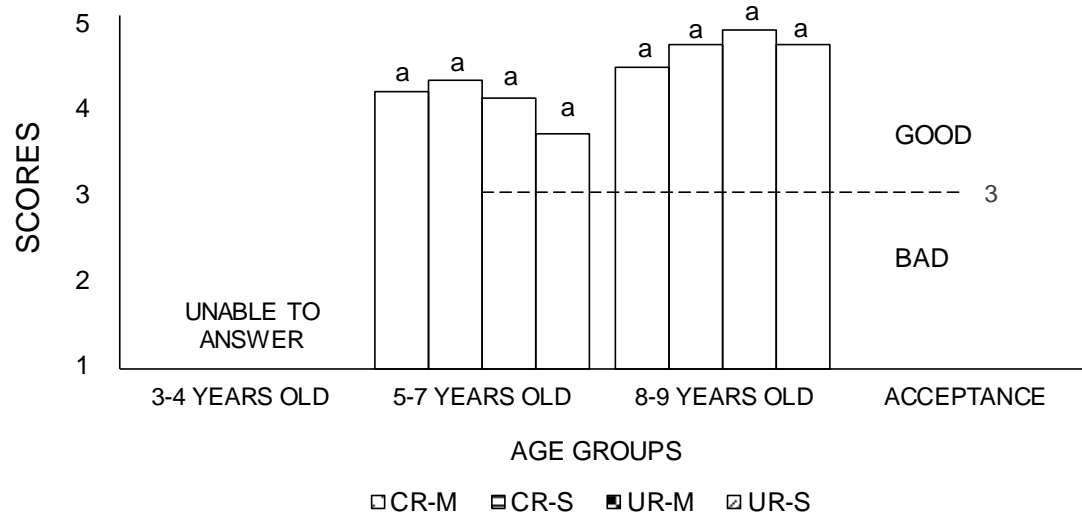


Fig. 7 - Results of sensory acceptance testing by acceptance questionnaire (A) and intake remainder (B). Means with different letters represent statistical difference ($p < 0.05$) by Tukey test. CR-M: common rice + cow's milk; CR-S: common rice + SSE; UR-M: Ultra Rice® + cow's milk; UR-S: Ultra Rice® + SSE.

No significant difference ($p < 0.05$) of level of acceptance was found among the age groups "3-4 years old", "5-7 years old" and "8-9 years old", independently on the method of analysis (Fig. 8). According to questionnaires results, these three age groups considered all formulations with "good acceptance" (Fig.8A). Conversely, by the intake remainder method, only the formulation CR-M was pointed as having "good acceptance", whilst the three others formulations were classified as "bad acceptance" (Fig.8B).

A ANALYSIS BY ACCEPTANCE QUESTIONNAIRE BY AGE GROUPS



B ANALYSIS BY ACCEPTANCE QUESTIONNAIR BY AGE GROUPS

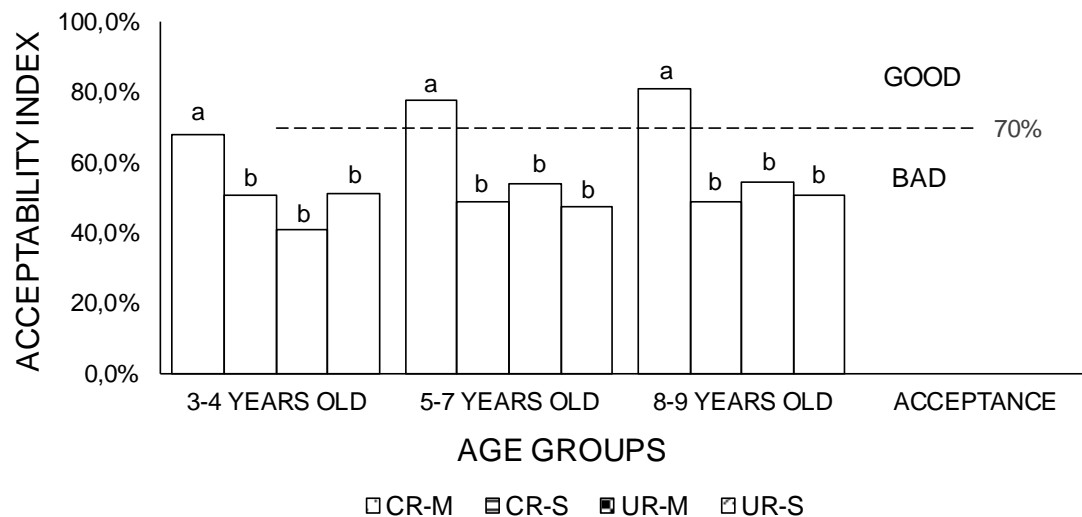


Fig. 8 - Sensory acceptance testing by age groups by acceptance questionnaire (A) and intake remainder (B). Means with different letters represent statistical difference ($p < 0.05$) by Tukey test. CR-M: common rice + cow's milk; CR-S: common rice + SSE; UR-M: Ultra Rice® + cow's milk; UR-S: Ultra Rice® + SSE.

4.3.4. Cost estimation Economic indicators

For calculations purposes, a production plant with processing capacity of 900 kg/day was considered (Table 4). Production costs of US\$ 100.41 and US\$ 84.21 per 100 kg, or US\$ 0.09 and US\$ 0.07 per portion of 90g, were obtained for the M and S formulations, respectively. If only the cost of raw materials were considered, these values would drop to US\$ 45.33 and US\$ 84.21 per 100 kg respectively. For a sale price of US\$ 129.51 per 100 kg for M formulation, one estimates the payback of 1.83 years, break-even point of 41%, internal rate of return (IRR) of 55%, and net present value (NPV) of US\$ 133,615.37.

Analogously, for SSE based-formulation, these estimations were: payback of 1.07 years, break-even point of 30%, IRR of 95% and NPV of US\$ 274,952.97.

Table 4 - Results of costs estimation, sale price estimation and economic indicators: total investment, break-even point, internal Rate of Return (IRR), payback (years), hurdle rate, net Present Value (NPV) for a production plant of 900 kg/day for fortified formulations (UR-M and UR-S).

Economic indicators	UR-M		UR-S	
Production cost (100 kg)	US\$	100.41	US\$	84.21
<i>Raw material</i>	US\$	45.33	US\$	29.14
<i>Other inputs</i>	US\$	22.66	US\$	22.66
<i>Overhead</i>	US\$	19.41	US\$	19.41
<i>Labor</i>	US\$	9.71	US\$	9.71
Sale price (100 kg)	US\$	129.51	US\$	129.51
Total investment	US\$	71,729.50	US\$	71,729.50
Break-even point		41%		30%
Internal Rate of Return (IRR)		55%		95%
Payback (years)		1,83		1,07
Hurdle rate		12%		12%
Net Present Value (NPV)	US\$	133,615.37	US\$	274,952.97

* UR-M: Ultra Rice® + cow's milk; UR-S: Ultra Rice® + SSE.

4.4. DISCUSSION

The composition of the studied “arroz doce” formulations presented some similar points, and also some differences, attributable not only to the formulation approach, but also to intrinsic characteristics of raw materials and ingredients. The addition of different proportions of sucrose in M and S formulations did not trigger statistically significant differences in their total carbohydrate content. This result is consistent with the initial objective of balancing the total soluble solids contents in all formulations during the preliminary formulation assays. The higher concentration of lipids found in M formulations was expected due to higher total fat content of whole cow's milk (3.6 %) (Puglisi et al., 2014) in relation to that of fluid SSE at 6 % m/V (0.54%) (Oliveira, 2015). The protein content of formulations also was statistically different ($p < 0.05$) when the fluid ingredient was changed. The creamy texture observed in all formulations (Fig.5-6) is a sensory consequence of the thickening and gelling properties of proteins from either cow's milk or SSE. As different formulations showed similar sensory textures despite of the lower protein content of S formulations, it can be inferred that soy proteins had a more pronounced thickening/gelling power than those from cow's milk, under the processing conditions employed in this study. In cow's milk, caseins have well-known thickening and emulsifying properties, being commonly studied as a compound that can increase viscosity in different products (Nguyen et al., 2016; Kruif et al., 2015; Hemar et al., 2001; Goel et al., 1999), whereas whey proteins have been shown as good gelling agent when exposed to temperatures above 65°C and subsequently refrigerated (Homer

et al., 2016; Devi et al., 2013; Bryant and McClements, 2000). Soy proteins are predominantly globular proteins arranged in complex supramolecular structures, larger molecular weights, and capacity to form gels (Peng et al., 2016; Guo et al., 2012). Recently, Peng et al. (2016) reported that, when subjected to high temperatures, soybean proteins are denatured and their structural matrix is broken, reducing their water holding capacity and increasing the occurrence of syneresis, which is corroborated by our results shown in Fig.5.

Concerning minerals, UR formulations had higher concentrations of iron and zinc compared to CR formulations, which is consistent with the iron and zinc contents reported for common rice (0.2-6.0 mg /100g and 0.7-3.3 mg /100g, respectively) (Gayen et al., 2016), and the those of Ultra Rice® (160 and 83 mg /100g, respectively) (Urbano, 2016). In order to be considered a fortified food in Brazil, product portion (100g in that case) must provide a minimum of 30% of DRI (Dietary Reference Intake) (ANVISA, 1998). For children between 3 and 10 years old the iron's DRI is 5.8 to 8.9 mg /day (FAO / WHO, 2002) considering a middle bioavailability diet. Thus, the UR formulations in the present study can be considered a fortified food, because they presented, on average, 4.9 mg iron per 90 g of final products, exceeding the 30% of RDA. Higher calcium content was found in M formulation compared to S formulations. Chemical composition of these different protein sources was the main reason for this difference, as whole cow's milk contains 110 mg Ca/100 mL of milk (Chourasia and Goswami, 2009), whereas fluid SSE at 6 % m/V has only 7.2 mg/100 mL (Oliveira, 2015). Some authors reported that high calcium intake may interfere with the iron bioavailability, because iron and calcium compete for the same absorption sites on the membranes of intestinal cells (Gaitan et al., 2011; Halberg et al., 1991; Kochanowski, 1990). Despite the higher concentrations of Fe and Zn in the UR formulations, statistical differences ($p < 0.05$) were observed for ash contents only between the M formulations (0.67 ± 0.14 %) and S formulations (0.35 ± 0.03 %), probably due to the high calcium amount provided by cow's milk.

The physicochemical stability during 20 days at 5°C of the four proposed variants of "arroz doce" recipes was also impacted by the formulation compositions. CR formulations had their water activity values statistically smaller ($p < 0.05$) than those at $t = 0$, after storage under the above mentioned conditions. Chourasia and Goswami (2009) observed reduction of water activity in potatoes during cold storage and correlated it to the airflow speed and temperature. Instead, in the present study, this water activity drop observed for CR formulations can be explained by the presence of small droplets condensed within the packaging cover, indicating that the water content could have been changed with time of storage. This condensed water on the pack would be available for chemical and microbiological reactions inside the product and its loss may reflect directly on the water activity. In that way, a possible explanation for UR formulations kept their

water activity statistically unchanged ($p > 0.05$) for 20 days is the water-holding effects of higher concentration of iron and zinc ions within the food matrix: these cations allow forming a greater number of ion-dipole interactions with water molecules within the system (Vasquez & Coronella, 2011), thus making these molecules more strongly bound. Concerning titratable acidity, statistically different values ($p < 0.05$) were found for UR formulations: they increased the titratable acidity values after 20 days at 5°C from $0.71 \pm 0.11\%$ to $12.36 \pm 3.32\%$. CR formulations showed titratable acidity equal to $0.80 \pm 0.13\%$ and $1.34 \pm 1.27\%$, at $t = 0$ and $t = 20$, respectively, not different significantly during storage. This increase in acidity of fortified formulations can be explained by two hypotheses. Firstly, the higher concentrations of Fe cations Fe^{2+} or Fe^{3+} and Zn^{+2} in these formulations may have favored the formation of interactions between them and negative ions (lactate, for example) present in the medium, thus leaving H^+ more available in the system. Another possibility is a microbiological contamination with spurs of psychotropic microorganisms in Ultra Rice® grains, which would have developed and initiated a fermentation process leading to the formation of organic acids. Pérez-Días et al. (2008) observed development of *Listeria monocytogenes*, psychrotrophic food pathogen, in sweet potato puree even after thermal processing and refrigerated storage for 21 days at 4 °C. Additionally, Khandare et al. (2011) reported the ability of such bacteria to produce acids in aerobic or anaerobic environments, using glucose as carbon source. Finally, regarding the color stability, the type of protein source was the main responsible for the color differences between formulations. The indicators L^* , associated with the luminosity transmitted by the sample (Khandare et al., 2011), and Hue^* , associated with the hue or predominant sample color (Jha, 2010), were higher in the M formulations, indicating that these formulations are more clear and white than S formulations (Fig.6). All formulations maintained their color attributes ($p > 0.05$) during storage for 20 days at 5 °C. That stability is an important technological feature, since it excludes the need of chemical color stabilizers.

Regarding the sensory acceptance tests, results obtained by questionnaires, all formulations received an average score indicative of "good acceptance", regardless the children's ages ($p > 0.05$). Conversely, according to results of intake remaining analyses pointed out the CR-M formulation with the better acceptance ("good acceptance"), whilst the three others (CR-S, UR-M and UR-S), were classified as "bad acceptance", also regardless the children's ages ($p > 0.05$). It is possible that due to the young age they children may did not have a good discernment capacity or have felt intimidated to give lower hedonic notes. On the other hand, it is credible that some children may have liked but felt satiated with a smaller portion than distributed. In our study, S based formulations had acceptance lower to M formulations, corroborating with Bachmann (2001) study, that reported the use of plant proteins ingredients, such as soy proteins concentrates and

isolates, may negatively impact the acceptance of products in which such proteins are used as cow's milk replacers. Moreover, it is possible that the highest concentration of lipids cow's milk formulation has contributed to their greater sensory acceptance regarding the SSE-based desserts, as showed by Rios et al. (2014). On the other hand, Li et al. (2013) considers that for soy protein-based products, an acceptance rate above 60% show a "good acceptance" level. In our study, a acceptability index of around 50% for S formulations indicate that with few changes in S formulation it is possible to obtain a "good acceptance".

Finally, the cost analyses pointed that if the fortified formulations were produced by an outsourced company and sold to public institutions by US\$ 129.51/100kg or US\$0.12 /unit of 90 g, this industrial process economically viable (IRR > Hurdle rate). These products can be considered well-positioned by comparison with desserts commonly served in Brazilian public schools, such as yoghurts (US\$ 134.69/100 L or US\$ 0.15 /unit of 110 g; Codeagro, july/2016), or fruits such as apples (US\$ 125.36/100 kg or US\$ 0.15 /unit of 125 g; Codeagro, july/2016), pears (US\$196.21/100 kg or US\$0.27/unit of 140 g; Codeagro, july/2016) and mango (US\$ 145.48/100 kg or US\$ 0.22/unit of 150 g; Codeagro, july/2016). If a public institution has the minimum conditions of processing, the total cost would be reduced the cost of raw materials and other inputs, US\$ 67.99 and US\$ 51.80/100 kg, or US\$ 0.06 and US\$ 0.05/unit of 90 g, for UR-M and UR-S, respectively.

4.5. CONCLUSION

The developed fortified desserts reached iron levels above the minimum required for fortified foods compliant with the first aim of this study. The fortified products showed a good color stability during 20 days of storage at 5 °C, but the acidity increased in this period. The two fortified formulations are affordable price when compared to others desserts currently served in schools as yoghurts and fruits, however, SSE contributed negatively on the desserts sensory acceptance. More detailed analyses and microbiological evaluations are needed to better conclusions about the desserts shelf life. In addition, iron bioavailability studies are advised, since it is possible that SSE-based formulation show a higher bioavailability of iron than the cow's milk-based formulation due to the lower concentration of calcium.

4.6. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Brazilian research agencies CAPES, CNPq, FAPEMIG, and FUNARBE, for the financial support to carry out this study, and to the enterprises URBANO, OLVEBRA and BioClin, for kindly providing different materials and

reagents used in experiments. We thank the staffs of "Escola Municipal Colonel Antonio Faustino Duarte" and the "Creche Municipal Vó Ze" in Paula Cândido, MG, Brazil, by willingness to participate in sensory analysis. Mr. T.V. Oliveira also acknowledges the agency CNPq for his fellowship.

4.7. REFERENCES

- Aboufazli, F., Shori, A.B., Baba, A.S., 2016. Effects of the replacement of cow milk with vegetable milk on probiotics and nutritional profile of fermented ice cream. *LWT - Food Science and Technology*. 70, 261-270.
- ANVISA / Brazil, 1998. Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento técnico referente a alimentos adicionados de nutrientes essenciais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF.
- AOAC, A. O. O. A. C, 1998. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists. 16. ed. Washington: D.C.
- Bachmann, H.P., 2001. Cheese analogues: a review. *Int Dairy J*. 11, 505-515.
- BRASIL, 2014. Lei CD/FDNE nº 26 de junho de 2013. Restrição da oferta de doces e preparações doces na alimentação escolar. Ministério da Educação. Coordenação de Segurança Alimentar e Nutricional – COSAN do Programa Nacional de Alimentação Escolar - PNAE. Brasília, p. 6.
- Bryant, C.M., McClements, D.J., 2000. Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. *Food Hydrocolloids*. 14, 383-390.
- Campbell, L. J., Gu, X., Dewar, S. J., & Euston, S. R., 2009. Effects of heat treatment and glucono- δ -lactone-induced acidification on characteristics of soy protein isolate. *Food Hydrocolloids*. 23 (2), 344-351.
- Cecane, C. C. E. A. E. N. E, 2010. Manual para aplicação dos testes de aceitabilidade no Programa Nacional de Alimentação Escolar – PNAE. UNIFESP. pp. 16.
- Chakravarty, I., 2000. Food-based strategies to control vitamin A deficiency. *Food and Nutrition Bulletin*. 21, 135–143.
- Chourasia, M.K., Goswami, T.K., 2009. Efficient design, operation, maintenance and management of cold storage. *J Biol Sci*. 1 (1), 70-93.
- Codeagro, 2016. Prices of the public purchases of family agriculture. Campinas, Brazil. http://www.codeagro.agricultura.sp.gov.br/arquivos/ica/chamadas/pnae/reg_admin/RA_Campinas.h. (accessed: 15.06.2016).
- Della Lucia, C. M., Rodrigues, K.C.C., Rodrigues, V.C.C., Santos, L.L.M., Cardoso, L.M., Martino, H.S.D., Franceschini, S.C.C., Sant'Ana, H.M.P., 2016. Diet Quality and Adequacy of Nutrients in Preschool Children: Should Rice Fortified with Micronutrients Be Included in School Meals? *Nutrients*. 8 (5), 296.
- Devi, A.F., Buckow, R., Hemar, Y. Kasapis, S., 2013. Structuring dairy systems through high pressure processing. *Journal of Food Engineering*. 114, 106-122.

- El-Sayed, M. M., El-Samragy, Y. A., El-Sayed, N. H., 1991. Production of an imitation processed cheese using soy bean protein. *Lebensmitteltechnologie*. 24, 78-81.
- FAO / WHO, 2002. Iron: The role of iron in human metabolic processes. FAO/WHO expert consultation on human vitamin and mineral requirements. 195-221.
- FAO, 2003. Chapter 2: Methods of Food Analysis, in: FAO, Food energy – methods of analysis and conversion factors. FAO Corporate Document Repository.
- FAO, 2010. Food-based approaches for improving diets and raising levels of nutrition. International Symposium on Food and Nutrition Security:. Rome: [s.n.]. p. 5.
- Gaitan, D., Flores, S., Saavedra, P., Miranda, C., Olivares, M., Arredondo, M., Romaña, D.L., Lonnerdal, B., Pizarro, F., 2011. Calcium Does Not Inhibit the Absorption of 5 Milligrams of Nonheme or Heme Iron at Doses Less Than 800 Milligrams in Nonpregnant Women. *J Nutr*. 1652-1656.
- Gayen, D., Paul, S., Sarkar, S.N., Datta, S.K., Datta, K., 2016. Comparative nutritional compositions and proteomics analysis of transgenic Xa21 rice seeds compared to conventional rice. *Food Chem*. 203, 301-307.
- Goel, P.K., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R., 1999. Studies on interactions of corn starch with casein and casein hydrolysates. *Food Chemistry*. 64, 383-389.
- Grebmer, K. V., Saltzman, A., Birol, E., Wiesmann, D., Prasai, N., Yin, S., Yohannes, Y., Menon, P., Thompson, J., Sonntag, A., 2014. Global Hunger Index: The Challenge of Hidden Hunger. Welthungerhilfe, International Food Policy Research Institute and Concer Worldwide. Bonn, Washington D.C. and Dublin.
- Guo, J., Zhang, Y., Yang, X.Q., 2012. A novel enzyme cross-linked gelation method for preparing food globular protein-based transparent hydrogel. *Food Hydrocolloids*. 26, 277-285.
- Halberg, L., Brune, M., Erlandsson, M., Sandberg, A., Rossander-Hulten, L., 1991. Calcium: effect of different amounts on non-haem and haem-iron absorption in man. *Am J Clin Nutr*. 53, 112-119.
- Hemar, Y., Tamehana, M., Munro, P.A., Singh, H., 2001. Viscosity, microstrutue and phase behavior of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum. *Food Hydrocolloids*. 15, 565-574.
- Homer, S., Lundin, L., Dunstan, D.E., 2016. Modifying the microstructure and mechanical properties of whey protein isolate gels using large deformation oscillatory strain. *Food Hydrocolloids*. 61, 672-677.
- Hotz, C.; Porcayo, M.; Onofre, G.; García-Guerra, A.; Elliott, T.; Jankowski, S.; Greiner, T., 2008. Efficacy of iron-fortified Ultra Rice in improving the iron status of women in Mexico. *Food and Nutrition Bulletin, The United Nations University*, v. 29 (2), 140-149.
- Hurrell, R. F., Lynch, S.R., Trinidad, T.P., Dassenko, S.A., Cook, J.D, 1989. Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins. *Am J Clin Nutr*. 49 (3), 546-552.
- Jha, S.N., 2010. Colour Measurements and Modeling, in: Jha, S.N. (Ed.). *Nondestructive Evaluation of Food Quality*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.17-40.

- Kattan, J.D., Cocco, R.R., Järvinen, K.M., 2011. Milk and Soy Allergy. *Pediatric Clinics of North America*. 58, 407-426.
- Kennedy, G., Nantel, G., Shetty, P., 2003. The scourge of “hidden hunger”: global dimensions of micronutrient deficiencies. *Food, Nutrition and Agriculture*. 32, 8-16.
- Khandarea, V., Walia, S., Singh, M., Kaur, C., 2011. Black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice: Processing effects on antioxidant composition and color. *Food Bioprod Process*. 89, 482-486.
- Kierulff, H., 2008. MIRR: A better measure. *Bus Horizons*. 51, 321-329.
- Kochanowski, B., 1990. Inhibition of iron absorption by calcium in rats and dogs: effects of mineral separation by time and enteric coating. *Nutr Res*. 10(2), 219-226.
- Kruif, C.G.K., Bhatt, H., Anema, S.G., Coker, C., 2015. Rheology of caseinate fractions in relation to their water holding capacity. *Food Hydrocolloids*. 51, 503-511.
- Lee, J., Hamer, M. L., Eitenmiller, R. R., 2000. Stability of retinyl palmitate during cooking and storage in rice fortified with Ultra Rice fortification technology. *J Food Sci*. 65 (5), 915-919.
- Li, Q., Xia, Y., Zhou, L., Xie, J., 2013. Evaluation of the rheological, textural, microstructural and sensory properties of soy cheese spreads. *Food Bioprod Process*. 91, 429-439.
- Matthias, D., 2012. Ultra Rice: Improving the Nutritional Value of Rice. International Food Aid Conference: Nutritional Panel. [S.l.]: PATH.
- Matthias, D., 2010. PATH's Ultra Rice Project. Presentation Ultra Rice Project. Sydney: [s.n.].
- Merrill, A. L., Watt, B. K., 1973. Energy value of food - basis and derivation. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture. Washington, pp. 109.
- Müller, J., 2014. Dumas or Kjeldahl for reference analysis? Comparison and considerations for Nitrogen/Protein analysis of food and feed. A White Paper from FOSS. 1-5.
- Muthayya, S., Rah, J.H., Sugimoto, D.J., ROOS, F.F., KRAEMER, K., BLACK, R.E., 2013. The Global Hidden Hunger Indices and Maps: An Advocacy Tool for Action. *Plos One*. 8, 1-12.
- Nguyen, B.T., Nicolai, T., Chassenieux, C., Schmitt, C., Bovetto, L., 2016. Heat-induced gelation of mixtures of whey protein isolate and sodium caseinate between pH 5.8 and pH 6.6. *Food Hydrocolloids*. 61, 433-441.
- Olvebra, 2015. Product Datasheet. Soy extract – Provesol FB. Manufacturing sector.
- PATH, 2013. Technology Solutions for Global Health - Ultra Rice Technology. PATH.
- Peng, X., Ren, C., Guo, S., 2016. Particle formation and gelation of soymilk: effect of heat. *Trends Food Sci Tech*. doi: 10.1016/j.tifs.2016.06.005.

- Pérez-díaz, I.M., Truong, V., Webber, A., Mcfeeters, R.F., 2007. Microbial Growth and the Effects of Mild Acidification and Preservatives in Refrigerated Sweet Potato Puree. *J Food Prot.* 71 (3), 639-642.
- Puglisi, I., Petrone, G., Piero, A.R., 2014. A kiwi juice aqueous solution as coagulant of bovine milk and its potential in Mozzarella cheese manufacture. *Food Bioprod Process.* 92, 67-72.
- Schneider, J. M.; Fujii, M.L.; Lamp, L.C.; Lönnerdal, B.; Dewey, K.G.; Zidenberg-Cherr, S., 2005. Anemia, iron deficiency, and iron deficiency anemia in 12–36-mo-old children from low-income families. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 82, 1269-1275.
- Rios, R. V., Pessanha, M. D. F., Almeida, P. F., Viana, C. L., Lannes, S. C. S., 2014. Application of fats in some food products. *Food Sci. Technol*, 34, 3-15.
- Tang, C. H., 2007. Effect of thermal pretreatment of raw soymilk on the gel strength and microstructure of tofu induced by microbial transglutaminase. *LWT-Food Sci Technol.* 40 (8), 1403-1409.
- Teixeira, E., Meinert, E. M., Barbeta, P. A., 1987. *Análise Sensorial de Alimentos*. Editora da UFSC, Florianópolis, Brazil, 180 p.
- Urbano, 2016. Product Datasheet. Ultra Rice technical report. Manufacturing sector.
- Vasconcelos, C. M., Oliveira, E. B., Rossi, S. N., Arantes, L. F., Puschmann, R., Chaves, J. B. P., 2015. Evaluating Strategies to Control Enzymatic Browning of Minimally Processed Yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Food and Bioprocess Technology.* 8, 1982-1994.
- Vasquez, V.R., Coronella, A.B.C.J., 2011. Molecular thermodynamics modeling of equilibrium moisture in foods. *Journal of Food Engineering.* 103, 103-114.
- WHO, World Health Organization, 2008a. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005. WHO: Global Database on Anaemia. Geneva.

5. MANUSCRITO II

Ultra Rice[®]-based desserts fortified with micronized ferric pyrophosphate enhances the iron bioavailability

(Submetido ao periódico “Food & Function”)

Thomás Valente de Oliveira^a, Maria Eliza Castro Moreira^b, Renata Celi Lopes Toledo^b,
José Benício Paes Chaves^a, Ceres Matos Della Lucia^b, Eduardo Basílio de Oliveira^a ✉,
Hércia Stampini Duarte Martino^b ✉

^a *Department of Food Technology, Federal University of Viçosa, Av. Purdue, Campus, Viçosa, MG 36570-900, Brazil.*

^b *Department of Nutrition and Health, Federal University of Viçosa, Av. Purdue, Campus, Viçosa, MG 36570-900, Brazil.*

✉ Corresponding authors:

eduardo.basilio@ufv.br;

hercia@ufv.br

ABSTRACT

Ultra Rice[®] is a technology that uses cold extrusion process to manufacture simulated rice grains from rice flour enriched with micronutrients as iron, zinc, thiamine and folic acid. The aims of this study were to evaluate iron bioavailability in rats fed with diets containing Ultra Rice[®]-based desserts fortified formulated with either cow's milk or soy soluble extract (SSE). The total iron contents of fortified milk and soy-based desserts were respectively: 5.09 mg/100g and 5.93mg/100 g. The iron bioavailability was measured by the depletion/repletion method, with four experimental groups of rats (n=8): micronized ferric pyrophosphate in Ultra Rice[®] + cow's milk (UM); micronized ferric pyrophosphate in Ultra Rice[®] + SSE (US); positive control with ferrous sulfate (S); positive control with micronized ferric pyrophosphate (P). A fifth group (n = 8) was fed with a normal control diet (AIN-93G). Hemoglobin gain (HG), Hemoglobin Regeneration Efficiency (HRE), Biological Relative Value of HRE and gene expression of DMT-1, DcytB, ferroportin, hephaestin, transferrin and ferritin were evaluated. The groups P, UM and US showed lower HRE ($p < 0.05$) than the S group. The UM and US groups did not differ between them ($p > 0.05$) and showed better iron bioavailability than P group, with 70% of the S-HRE ($p < 0.05$). The P group showed 40% of the S-HRE and highest expression of DcytB, DMT-1, ferroportin and hephaestina ($p < 0.05$). The Ultra Rice[®] matrix increased the iron bioavailability in fortified desserts formulated with both cow's milk and SSE.

KEYWORDS

Anemia; iron bioavailability; gene expression; fortification; products development; Ultra Rice[®].

LIST OF ABBREVIATIONS

AIN-93G	Diet for rats in growth, pregnancy and lactation
DcytB	Protein duodenal cytochrome B
DMT-1	The divalent metal transporter 1
FER	Feed efficiency ratio
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HCP-1	Heme carrier protein 1
HRE	Hemoglobin Regeneration Efficiency
P	Diet with micronized ferric pyrophosphate
RBV-HRE	Relative biological value of HRE
S	Diet with ferrous sulfate
UM	Diet with micronized ferric pyrophosphate in Ultra Rice [®] and milk
UR-M	Fortified dessert with Ultra Rice [®] and cow's milk
UR-S	Fortified dessert with Ultra Rice [®] and cow's SSE
US	Diet with micronized ferric pyrophosphate in Ultra Rice [®] and SSE

5.1. Introduction

“Hidden hunger” is defined as a deficiency of one or more micronutrients (vitamins and minerals), affecting about 2 billion people worldwide, i.e., almost one third of the world’s population.¹ In developing countries, hidden hunger is more evident because intake of food containing iron, calcium, zinc and selenium is often below the dietary recommendations.² Pregnant women, lactating women and children are considered as risk groups, especially children under six years old, since their nutritional needs are proportionately more greater due to their high growth rate.

Despite iron is the fourth most abundant element in nature,³ its deficiency is one of the most frequent forms of hidden hunger (insidious anemia), occurring all over the world, especially in infants and children⁴, independently on their socio-economic conditions.⁵ It has been stated that the incidence of such form of anemia can be drastically reduced in the long-term by combining three approaches: diets diversification, biofortification of food crops and food fortification.¹ In short and medium terms, however, data from World Bank indicate that food fortification only has lower costs and offers better results compared to the two others technologies. In fact, food fortification as a short-term strategy has several benefits, among which high population coverage, no need of changes in dietary habits, and low toxicity risks.^{6,7} Iron compounds have to be used to elaborate such fortified food products. Water-soluble iron salts (e.g., ferrous sulphate), have good bioavailability and are somewhat ease to incorporate in formulations, but they are often associated to undesirable sensory alterations in color and taste. On the other hand, poorly water-soluble compounds (e.g., ferric pyrophosphate) cause less sensory changes and are more stable within foods formulations, but may present lower bioavailability.⁸

Ultra Rice[®] is a fortified food based on a technology developed by "Bon Dente International" in 1989, aiming to eradicate, or at least to minimize, the incidence of micronutrients deficiencies.⁹ It is a formulated, extruded rice flour-based product, very similar to rice grains in shape, size and color – hence especially appropriate for people living in countries where rice is frequently consumed, as Brazil and several Asian countries. In addition to ferric pyrophosphate, some variants contain thiamine, folic acid and zinc salts.⁹ In controlled studies, Ultra Rice[®] has been shown a food nutritionally effective and safe, and also well accepted by different population groups.¹⁰⁻¹² Therefore, a strategic alternative to stimulate iron intake by children at school-age may be giving them low calories desserts fortified with Ultra Rice[®]. For example, “arroz doce” (literally, “sweet rice”), a dessert containing mainly rice and cow’s milk (some variants may contain also “soy milk” or “coconut milk”) traditional in the aforementioned countries, may be a promising option to be served as school meal for such purposes.

In multi-component formulated foods, different factors influence the mineral bioavailability, and assessing the effects of interactions between minerals and the matrix

(or between minerals themselves) is of utmost importance, as the magnitude of their bioavailability depends on the presence of inhibitors, promoters, the food matrix itself¹³, as well as specific interactions of metal cations with proteins or chelating agents.^{14,15} Some authors have reported that high concentrations of Ca may have a negative impact on the proper metabolism of some divalent transition metal cations, such as Fe²⁺ and Zn²⁺.¹⁶⁻¹⁸ Parker et al. suggested that even the Zn present in the Ultra Rice[®] could influence negatively the intestinal absorption of Fe.¹⁹ Despite of this, Hotz et al. reported significant improvements in iron nutritional status of non-pregnant women fed with Ultra Rice[®] during six months.²⁰ Anyhow, the inhibitory effect of Ca on Fe bioavailability is not trivial to be evaluated and very difficult to be generalized, as it is influenced by the chemical forms and the amounts consumed of Ca.^{21,22}

To the best of our knowledge, the specific effects of the association of Ultra Rice[®] with a high calcium level ingredient (cow's milk) on Fe bioavailability have not yet been reported in literature. The present study intended to evaluate both the bioavailability of iron and the gene expression of proteins involved in iron metabolism in rats, as affected by the intake of diets fortified with Ultra Rice[®] along with cow's milk or soluble soy extract ("soy milk"). Indeed, although sophisticated instrumental techniques and high technology apparatus exist nowadays, the use of animal models is crucial in such studies, due to the huge complexity of interactions between compounds in biological medium. More specifically, here we aimed to investigate i) if there would be differences in bioavailability of iron from "arroz doce" fortified with Ultra Rice[®] when combined with cow's milk or "soy milk", ii) if there would be differences in bioavailability of micronized ferric pyrophosphate inside or outside the Ultra Rice[®] matrix and, finally, iii) if such diets would influence differently the gene expression of proteins involved in iron metabolism.

5.2. Experimental

5.2.1. Setting and Sample

We evaluated a rice-based dessert with cow's milk or soybean soluble extract fortified with Ultra Rice[®] (Program for Appropriate Technology in Health (PATH)). These desserts were developed in the Food Technology Department at Federal University of Viçosa, Brazil. The desserts were nutritionally appropriate for school age children, carrying high contents of iron, zinc and calcium (Table 1). For the production of flour used in the animal's diet, the desserts were previously ground in a blender, frozen, lyophilized and stored in a silica gel desiccator.

Table 1 - UM and US formulations: centesimal composition, micronutrients (Ca, Fe, and Zn) contents and caloric density.

Composition	UM	US
Moisture (g/100g)	68.0 ± 2.30	66.6 ± 1.5
Carbohydrates (g/100g)	25.91 ± 3.92	29.76 ± 1.48
Proteins (g/100g)	3.17 ± 0.07	2.29 ± 0.05
Lipids (g/100g)	1.24 ± 0.65	0.36 ± 0.04
Ashes (g/100g)	0.75 ± 0.14	0.36 ± 0.04
Total dietary fiber (g/100g)	0.001 ± 0.001	0.010 ± 0.001
Micronutrients		
Iron (mg/100g)	5.09 ± 0.08	5.93 ± 1.04
Zinc (mg/100g)	30.49 ± 0.95	29.99 ± 2.67
Calcium (mg/100g)	91.53 ± 2.86	21.31 ± 0.96
Ca: Fe molar ratio	18:1	7:1
Zn:Fe molar ratio	6:1	5:1
Caloric density	127.48	131.44

UM: Ultra Rice® + Milk; US: Ultra Rice® + Soybean soluble extract

5.2.2. Iron and calcium concentration of diets

The determination of mineral content was performed according to AOAC.²³ Briefly, 1.0 g of the sample was digested with 10 mL of nitric acid in the digester block to approximately 120 °C. The reading was held on an atomic absorption spectrophotometer. For this analysis, calibration curves were used to prepared standard solutions of known iron and calcium concentration. We determined the concentrations of iron and calcium.

5.2.3. Animal and diets

The method adopted for evaluating the bioavailability of iron was the hemoglobin depletion/repletion method (modified AOAC²⁵). At 21 days of age, 40 male albinus Wistar rats (*Ratus norvegicus*) from the Central Animal Facility of the Center for Life Sciences and Health at Federal University of Viçosa were placed in individual temperature-controlled (21±5 °C) cages, with a photoperiod of 12 h. During the 21 days of the depletion phase, 32 animals received AIN-93G diet modified using mixtures of mineral without iron and deionized water ad libitum for the induction of anemia. After that, in the repletion phase (14 days), the fortified desserts were used as a source of iron. Ferrous sulfate and micronized ferric pyrophosphate were used as controls, and their amounts were calculated to provide 12 mg of iron per kg of diet in each treatment. A normal control group containing 8 animals received AIN-93G diet⁵ during 35 days. This group did not

pass by depletion phase and repletion phase. The ingredients sugar, albumin, oil, microcrystalline cellulose and corn starch were adjusted to ensure isocaloric diets (Table 2).

According to the chemical composition of fortified desserts, in order to obtain diets with the same caloric density and the same concentrations of micro and macronutrients, changes in diets compositions were made concerning quantities of sugar, albumin, oil, microcrystalline cellulose and corn starch (Table 2).

The 32 animals were placed into four groups (n=8): S: control containing ferrous sulfate as iron source; P: control containing micronized ferric pyrophosphate as iron source; UM: diet with dessert with Ultra Rice® + cow's milk as iron source; US: diet with dessert with Ultra Rice® + Soybean soluble extract as iron source (Fig. 1). In this phase, the animals received deionized water ad libitum and controlled diet, approximately 15 g, for a period of 14 days. The food intake and the weight gain were determined weekly by weighing, and the feed efficiency ratio was calculated by the Equation 1.

$$FER = \frac{\text{Total intake (g)}}{\text{Weight gain (g)}} \quad (\text{Eq. 1})$$

On the 36th day, after fasting for 12 hours, the animals were anesthetized with isoflurane (Isoforine, Cristália®) and they were euthanized by cardiac puncture. Blood and fragments of the liver, duodenum and spleen were collected. All experimental procedures with animals were performed in accordance with the ethical principles for animal experimentation and the study approved by the Ethics Committee of the Federal University of Viçosa (Protocol 66/2015; date of approval: February 17th 2016).

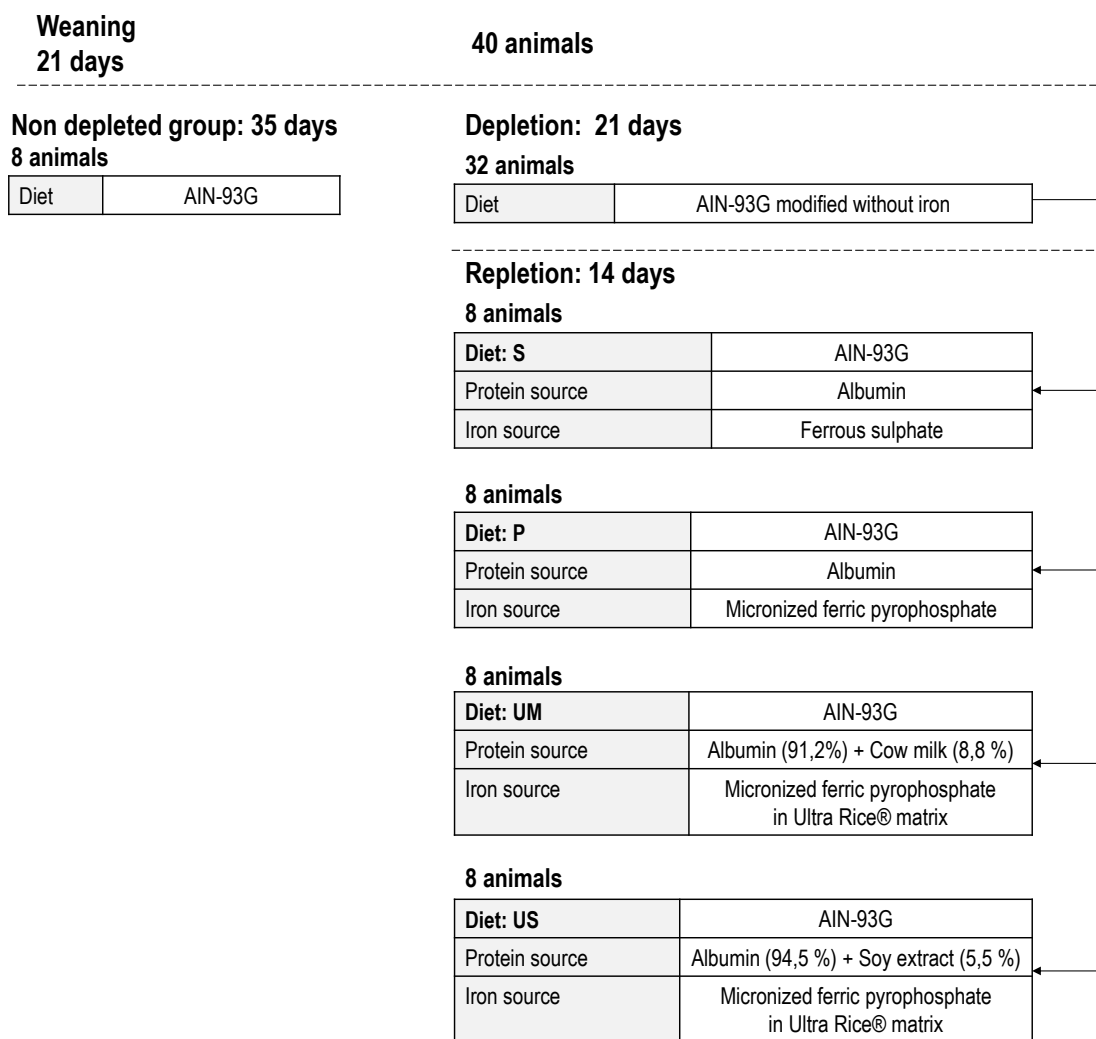


Figure 1 - Experimental design. S: Diet with ferrous sulfate; P: Diet with micronized ferric pyrophosphate; UM: Diet with fortified dessert with Ultra Rice® and cow's milk; US: Diet with fortified dessert with Ultra Rice® and SSE (soy soluble extract).

5.2.4. Blood tests

Serum hemoglobin was measured by cyanide methemoglobin method, proposed by the AOAC²⁴, using colorimetric kit for in vitro diagnosis (Bioclin). The volume of 10 µL of blood was pipetted and mixed with 2.5 mL of Drabkin's solution color reagent (containing potassium cyanide, and hydrogen cyanide). The absorbance was analysed in UV-Visible Multiskan (Thermo Scientific) at a wavelength of 540 nm.

Table 2 - Food and nutritional composition of diets with which rats were fed all along in vivo bioavailability and gene expression experiments.

Ingredients (1kgof diet)	Standard diet with iron (AIN-93G)	Standard diet without iron	S	P	UM	US
Albumin (g)	218.2	218.2	218.2	218.2	199.0	206.3
Dextrinizedstarch (g)	132.0	132.0	132.0	132.0	132.0	132.0
Sucrose (g)	100.0	100.0	100.0	100.0	45.1	24.4
Soybean oil (mL)	70.0	70.0	70.0	70.0	64.2	68.5
Microcrystallinecellulose (g)	50.0	50.0	50.0	50.0	49.4	49.6
Mineral Mix with iron (g)	35.0	--	--	--	--	--
Mineral Mix without iron (g)	--	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamin Mix (g)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
L-cystine (g)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline Bitartrate (g)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Corn starch (g)	379.3	379.3	379.2	379.2	310.8	330.2
Ferrous sulfate (mg)	--	--	80.13	--	--	--
Micronized ferric pyrophosphate (mg)	--	--	--	11.95	--	--
UR-M (g)	--	--	--	--	149.0	--
UR-S (g)	--	--	--	--	--	138.4
Minerals						
Fe (mg/kg)	--	--	11.11	15.30	12.78	13.79
Ca (mg/kg)	--	--	4635.0	4430.0	4795.0	4295.0
Ca:Fe molar ratio	--	--	581.32	403.45	522.80	433.99
Caloric density (kcal/g)	3.95	3.95	3.96	3.96	3.51	3.57

S: Diet with ferrous sulfate; P: Diet with micronized ferric pyrophosphate; UM: Fortified dessert with Ultra Rice® + cow's milk; US: Fortified dessert with Ultra Rice® + SSE (soy soluble extract).

5.2.5. Iron bioavailability

The iron bioavailability was calculated according to Hernández et al.²⁶ The hemoglobin regeneration efficiency (HRE%) and the iron in hemoglobin content was calculated by the Equation 2 and Equation 3, respectively. The iron in hemoglobin content was calculated assuming a total blood volume to be 6.7% of the rat body weight and body iron in hemoglobin content as being 0.335.

$$HER\% = \frac{Fe_{endHb} (mg) - Fe_{initialHb} (mg)}{Fe_{consumed} (mg) \times 100} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$Fe_{Hb} = \frac{\text{Body weight (g)} \times [Hb] \left(\frac{g}{L}\right) \times 0.335 \times 6.7}{1000} \quad (\text{Eq. 3})$$

5.2.6. Biochemical analyzes

Chemical analyzes were performed quantifying serum iron, serum ferritin and serum transferrin in an automatic analyser BS 200 (Bioclin, Minas Gerais, Brazil), using specific Bioclin kits.

5.2.7. Total mRNA extraction from the duodenal mucosa and the liver

The liver and duodenum were macerated in liquid nitrogen in RNase free conditions and samples were aliquoted for total RNA extraction. Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using the manufacturer's recommendations. After extraction, RNA samples were treated with DNase (RQ1 RNase-free DNase kit; Promega, Madison, WI, USA) using the manufacturer's protocol. Total RNA was quantified at 260 nm in a spectrophotometer, and the degree of purity was quantified by the optical density reason 260 / 280 nm.

The isolated total mRNA has been treated with DNase (Invitrogen Corp., Grand Island, NY) and were used for cDNA synthesis using M-MLV Reverse Transcription kit (Invitrogen Corp., Grand Island, NY) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 2 µg of mRNA extracted was added to 1 µL of 100 µM oligodT, and 1 µL 10 µM dNTPs diluted and incubated at 65°C for 5 minutes. Subsequently the mixture was placed on ice and added 4 µL 5x buffer FF, 2µL of 0.1 M DTT and 1 µL of RNase Out. Then, it was added 1 µL of MMLV reverse transcriptase (200 U/ µL) and incubated in water bath at 37°C for 1 hour. Finally, the cDNA was incubated at 70 °C for 10 minutes and quantified.

5.2.8. Determination of gene expression of proteins involved in iron metabolism by Reverse Transcriptase Chain Reaction (RT-qPCR)

Expression of mRNA levels in the duodenal mucosa and the liver of proteins involved in iron metabolism were analysed by Reaction technique of real-time Polymerase Chain (RT-qPCR). The markers SYBR green PCR master mix from Applied Biosystems (Foster City, CA) and analyses were performed in equipment StepOne™ Real-Time PCR System was used (Thermo Fisher Scientific). The initial parameters used in the run were 20 seconds at 95 °C and then 40 cycles at 95 °C, 60 °C (30 s) followed by melting curve analysis. Primer sequences were used (Choma Biotechnologies) sense and antisense to protein divalent metal carrier (DMT-1), duodenal cytochrome b (DcytB), ferroportin, hephaestin the duodenum and liver proteins: ferritin and transferrin (Table 3). The relative expression levels of mRNA were normalized by endogenous control glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) to rats. All steps were performed in open conditions RNase.

Table 3 - Sequence of primers used in RT-qPCR gene expression analyses

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

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

5.3. Statistical Analysis

The treatments were conducted with animals a completely randomized design. Data were analysed by three orthogonal contrasts at 5% significance level as "S vs P, UM and US"; "P vs UM and US"; and "UM vs US". For hemoglobin data, for comparison of all experimental groups the analysis of variance (ANOVA) followed by the average Tukey test were performed, and to evaluate the difference in behavior between periods of depletion and repletion t test was used. Analyses were performed in Statistical Analysis System (SAS), version 9.0, licensed to UFV.

5.4. RESULTS

5.4.1. Iron bioavailability

No difference in food intake ($p > 0.05$), among all groups, was observed in the repletion period (Fig.2A). However, despite similar food intake, US group showed higher weight gain and FER than UM (Fig. 2 B-C).

The Ca intake was not significantly different among the groups ($p > 0.05$) (Fig.3A). However, differences ($p < 0.05$) were observed in the total Fe intake among all groups (Fig.3B).

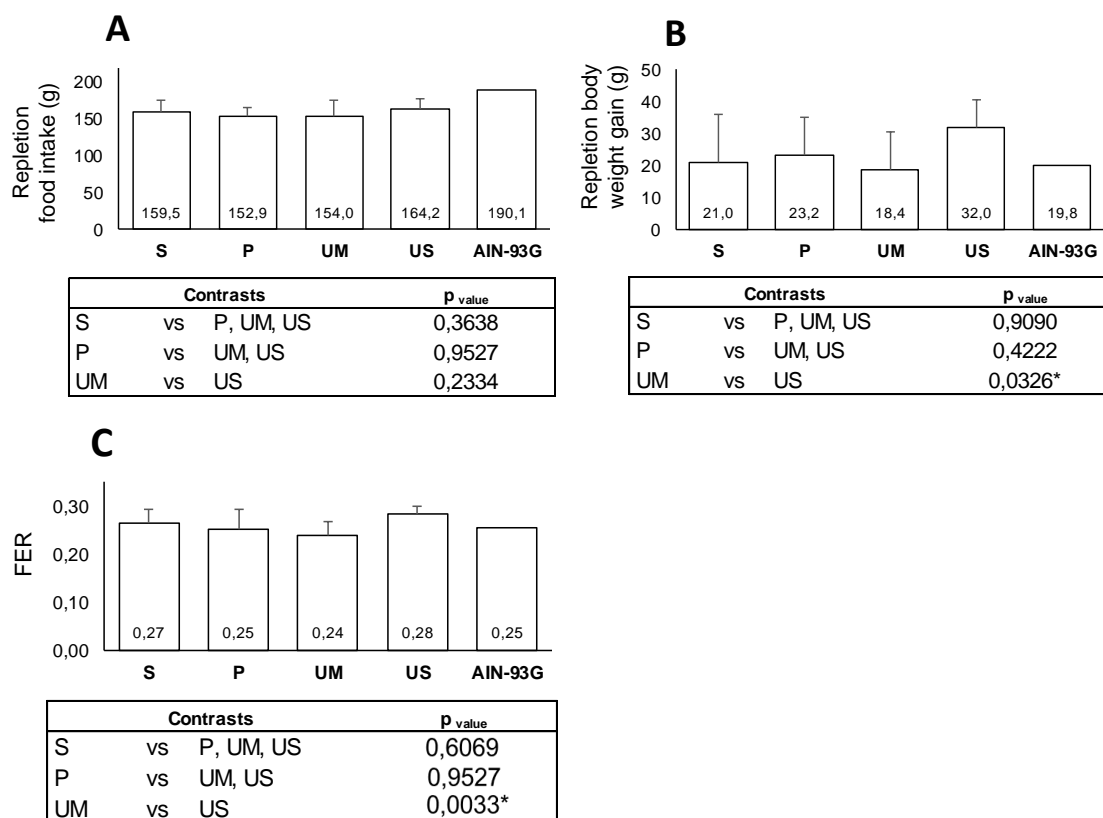


Figure 2 – Total intake (A), body weight gain (B) and food efficiency ratio (FER) (C) of Wistar rats (n=8). S: Diet with ferrous sulfate; P: Diet with micronized ferric pyrophosphate; UM: Diet with fortified dessert with Ultra Rice® and cow's milk; US: Diet with fortified dessert with Ultra Rice® and SSE (soy soluble extract).

* Significant difference among contrasts groups ($p < 0.05$).

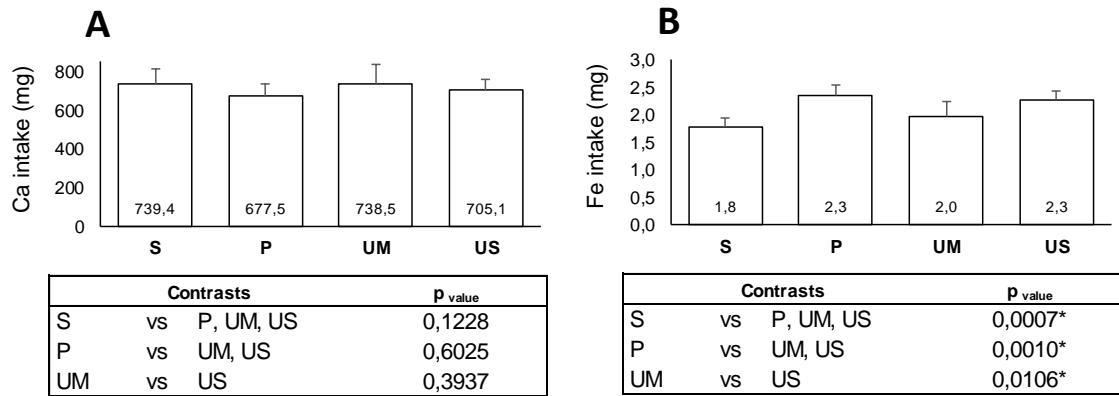


Figure 3 – Ca intake (A) and Fe intake (B). S: Diet with ferrous sulfate; P: Diet with ferric micronized pyrophosphate; UM: Diet with fortified dessert with Ultra Rice® and cow's milk; US: Diet with fortified dessert with Ultra Rice® and SSE (soy soluble extract).
* Significant difference among contrasts groups ($p < 0.05$).

The depletion phase (21 days) was sufficient to cause iron deficiency in the animals (7.10 ± 0.91 mg/dL) (Fig. 4). After the repletion period (14 days), all groups increased hemoglobin levels ($p < 0.05$) in different forms. The group P showed lower recovery of hemoglobin levels ($p < 0.05$) than S group, and UM and US did not differ than P and S groups ($p > 0.05$).

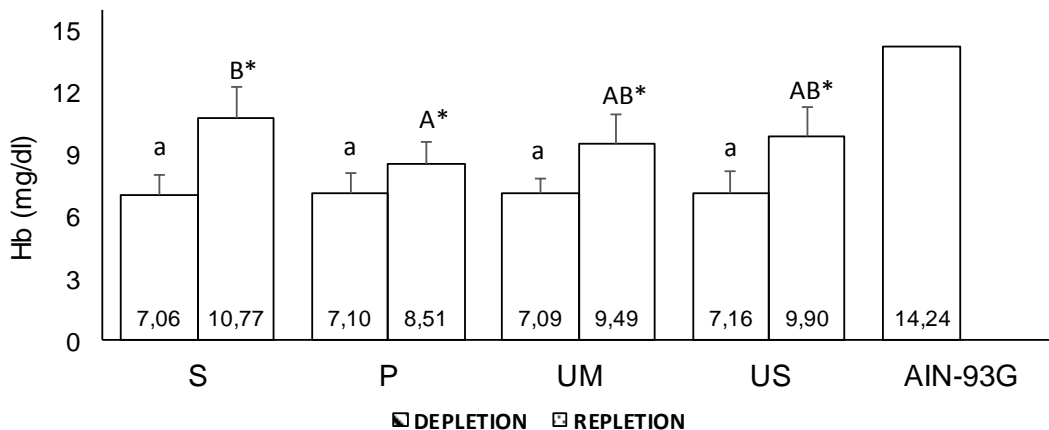


Figure 4 - Depletion and repletion phase of hemoglobin levels. S: Diet with ferrous sulfate; P: Diet with micronized ferric pyrophosphate; UM: Diet with fortified dessert with Ultra Rice® and cow's milk; US: Diet with fortified dessert with Ultra Rice® and SSE (soy soluble extract).
Small letters: significant difference among treatments during the Depletion phase by Tukey test ($p < 0.05$);
Capital letters: significant difference among treatments during the Repletion phase by Tukey test ($p < 0.05$);
* Significant difference between the periods of depletion and repletion within one treatment by t test ($p < 0.05$).

The S group showed the highest gain in hemoglobin levels ($p < 0.05$), while the others groups did not differ ($p > 0.05$) among them (Fig. 5A). The hemoglobin gain values were corrected by the different amount of Fe intake among the groups, in order to calculate the hemoglobin regeneration efficiency (HRE) and the relative biological value of HRE (RBV-HRE). The S group showed HRE and RBV-HRE higher than three the others ($p < 0.05$). The P group showed lower HRE and RBV-

HRE values compared to those found for UM and US ($p < 0.05$) (Fig. 5 B-C). Concerning the iron content and the hemoglobin regeneration efficiency (HRE) for each group, the total iron bioavailability obtained for UM and US were 2.7 mg/ 100 g and 3.8 mg/ 100 g, respectively.

Finally, the iron content in serum and liver did not differ among the four experimental groups ($p > 0.05$) with average equal 49.33 ± 22.70 (Fig.6 A-B).

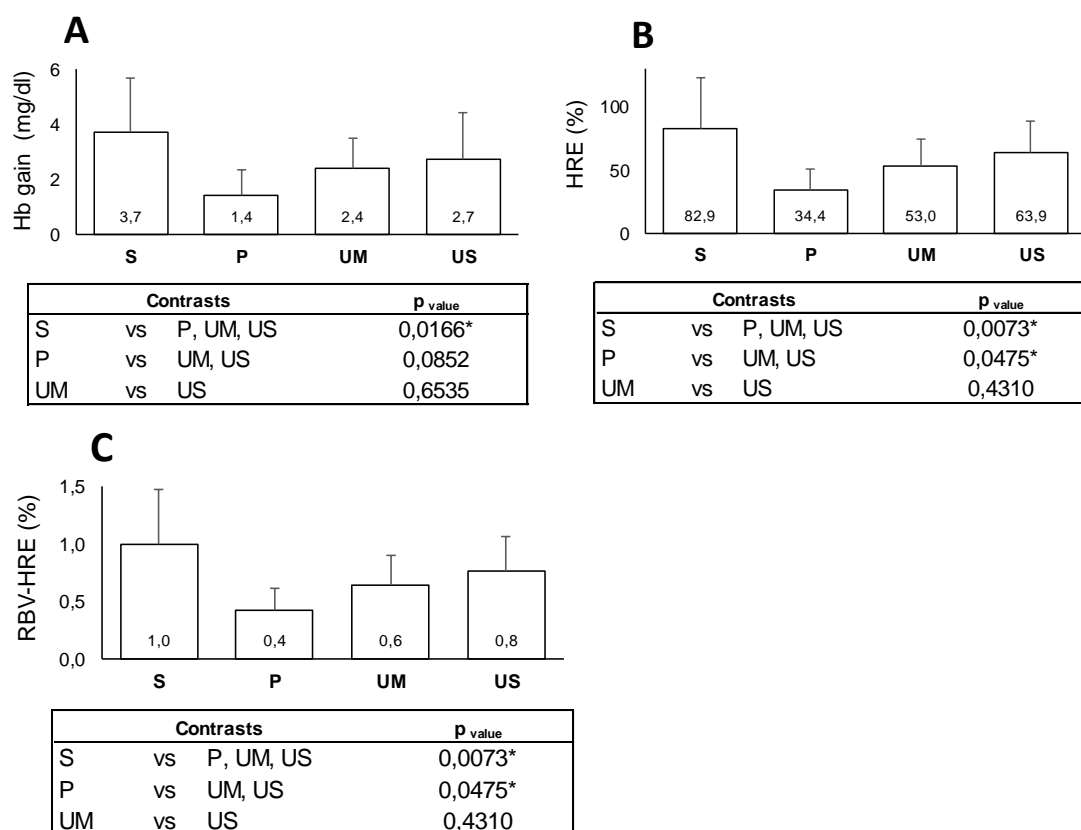


Figure 5 – Hb gain (A), Hemoglobin regeneration efficiency (HRE) (B); Relative biological value of HRE (RBV-HRE) (C). S: Diet with ferrous sulfate; P: Diet with micronized ferric pyrophosphate; UM: Diet with fortified dessert with Ultra Rice® and cow's milk; US: Diet with fortified dessert with Ultra Rice® and SSE (soy soluble extract).

* Significant difference among contrasts groups ($p < 0.05$).

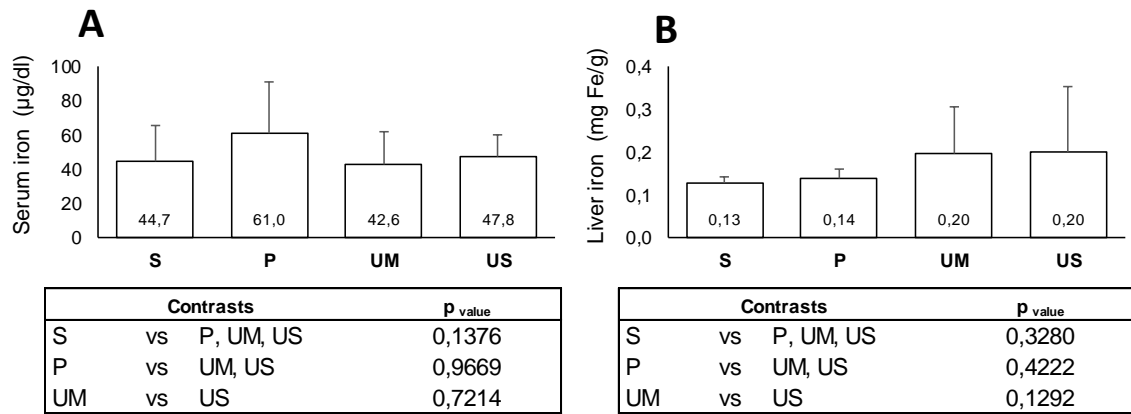


Figure 6 – Serum iron (A), Liver iron (B). S: Diet with ferrous sulfate; P: Diet with micronized ferric pyrophosphate; UM: Diet with fortified dessert with Ultra Rice® and cow's milk; US: Diet with fortified dessert with Ultra Rice® and SSE (soy soluble extract).

* Significant difference among contrasts groups ($p < 0.05$).

5.4.2. Gene expression of proteins involved in iron metabolism

The S group showed lower gene expression of DcytB, DMT-1, Ferroportin and Hephaestin, proteins involved in iron absorption in enterocytes (Fig.7 A-D). On the other hand, the P group had gene expression of these proteins higher than UM and US groups. Between UM and US groups, only DcytB gene expression differed ($p < 0.05$).

For proteins involved in iron metabolism by liver, the S group obtained the lower gene expression of ferritin than the others groups ($p < 0.05$). In addition, the US group showed higher gene expression of ferritin than the UM group ($p < 0.05$) (Fig. 8A). For the serum ferritin content, despite higher average, the S group did not differ from the others ($p > 0.05$). In contrast, the US group had a higher content of ferritin than UM group ($p < 0.05$) as observed by ferritin gene expression (Fig.8 A-B). For transferrin, the S group also had lower gene expression in relation to others groups ($p < 0.05$), and the US group differed from UM group ($p < 0.05$), presenting the highest transferrin gene expression in the liver (Fig. 8C). Concerning the serum transferrin content, the S group did not differ from the others ($p > 0.05$). However, P group showed higher serum transferrin content than both US and UM groups (Fig. 8D).

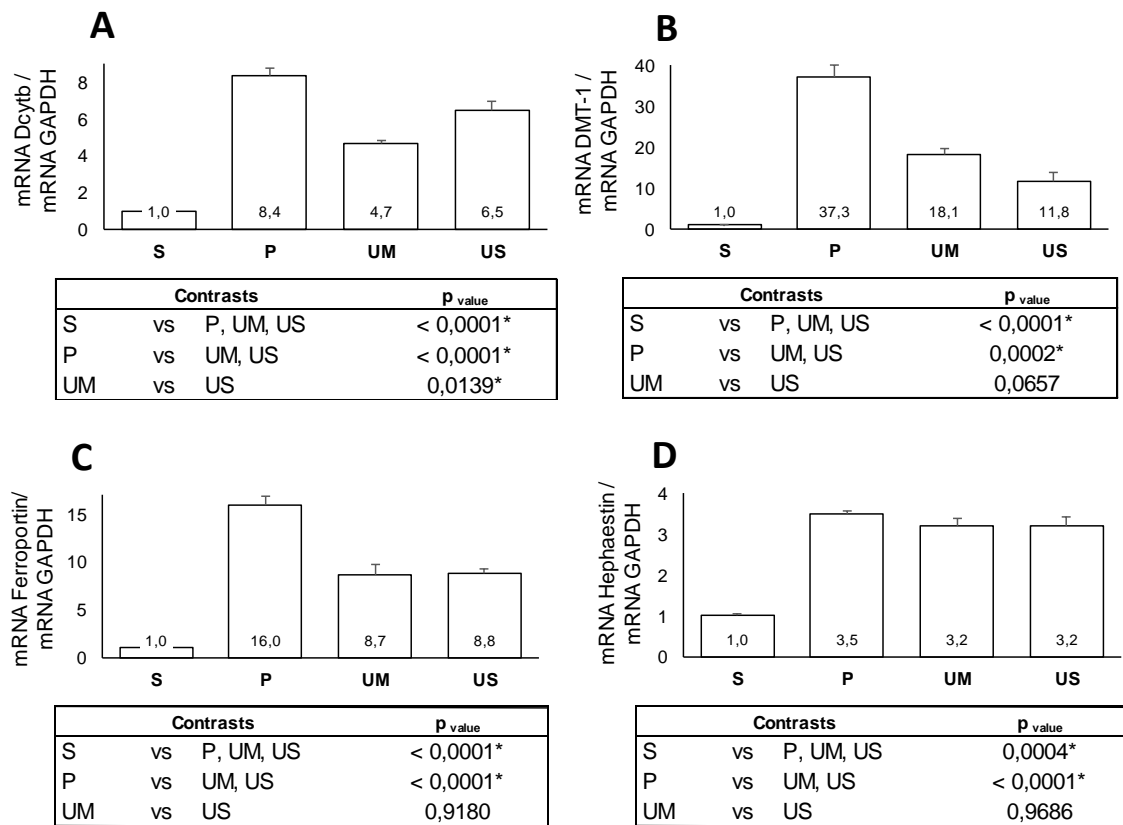


Figure 7 - Effect of the ingestion of different iron sources on the gene expression of proteins in duodenal tissue. RT-PCR Analysis. Dcytb (A), DMT-1 (B), Ferroportin (C), Hephaestin (D). S: Diet with ferrous sulfate; P: Diet with micronized ferric pyrophosphate; UM: Diet with fortified dessert with Ultra Rice® and cow's milk; US: Diet with fortified dessert with Ultra Rice® and SSE (soy soluble extract).

*** Significant difference among contrasts groups (p < 0.05).**

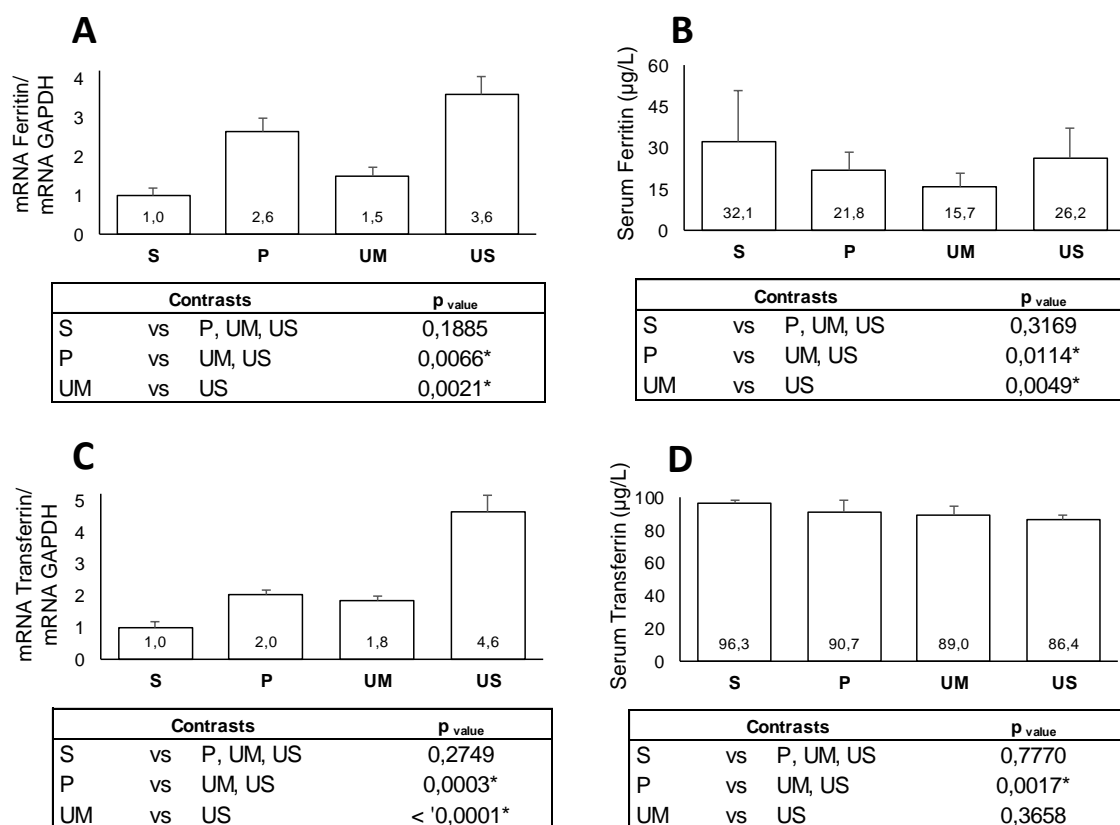


Figure 8 - Effect of different iron sources intake on the gene expression of proteins in liver tissue and serum content of these proteins. RT-PCR Analysis. Ferritin expression (A), Serum ferritin content (B), Transferrin expression (C), Serum transferrin content (D). S: Diet with ferrous sulfate; P: Diet with micronized ferric pyrophosphate; UM: Diet with fortified dessert with Ultra Rice® and cow's milk; US: Diet with fortified dessert with Ultra Rice® and SSE (soy soluble extract). (*) Significant difference between contrasts groups ($p < 0.05$).

5.5. DISCUSSION

This study was focused on evaluating the bioavailability in vivo of iron present in fortified desserts formulated with micronized ferric pyrophosphate (Ultra Rice® matrix), containing either cow's milk or soy protein extract to analyze the influence on bioavailability due to the Fe and Ca interactions.

The total consumption during the repletion period was not different among the groups ($p > 0.05$). Since there were no significant differences of caloric density of diets, there are no clear reasons for the animals fed with soy protein extract-based diet have had higher weight gain ($p < 0.05$) than those fed with cow's milk-based diet. Proteins with higher lysine content, such as soy proteins, are well-known to possess better capacity to convert the feed intake into body mass,²⁷ which is a hypothesis to explain this higher FER observed in the groups of rats fed with soy extract-based diet.

The four experimental groups recovered their nutritional iron status, regardless the Ca:Fe molar ratio (between 403 and 582 mol Ca/mol Fe). Similarly, Sachdeva et al. reported that milk and its components did not seem to influence negatively on the Fe absorption of 48 anemic rats.²⁸ Gaitan et al., with 54 healthy

non pregnant women, observed that non-heme iron absorption was reduced only in cases in which the iron compound was intake simultaneously with more than 800 mg of Ca.¹⁷ Minihane and Fairweather-Tait obtained similar results with 14 healthy adult humans when their diet contained calcium amounts above 1200 mg/day during six months.²⁹ Based on these previous findings, and considering that the adequate fortified dessert portion for each child is about 100 g, for cow's milk-based dessert the iron and calcium intake will be respectively 5.09 ± 0.08 mg (being 2,7 mg bioavailable) and 91.53 ± 2.86 mg. Thus, one can expect no negative calcium impact on iron bioavailability of "arroz doce" formulated with Ultra-Rice.

As expected, the experimental groups that intake ferrous sulfate had the best hemoglobin regeneration efficiency than micronized ferric pyrophosphate with or without Ultra Rice[®]. Della Lucia et al. observed that fortified rice with micronized ferric pyrophosphate had a high iron bioavailability in Wistar rats.³⁰ Other studies found a better Fe bioavailability in ferrous sulfate diet front of micronized ferric pyrophosphate in rats.³¹⁻³³ However, Fidler et al. noted that this behavior can be different in humans, because in their work micronized ferric pyrophosphate showed better bioavailability than ferrous sulfate in humans.³⁴ In our study, the diet containing only micronized ferric pyrophosphate showed lower HRE than diets with the micronized ferric pyrophosphate inside Ultra Rice[®] matrix with cow's milk or soy extract, which did not differ between them. Although they have the same type of iron source, it is likely that the Ultra Rice[®] matrix protected Fe cations against oxidation all along its passage through the digestive system, resulting in improved duodenum absorption.³³ This hypothesis is further supported by gene expression analyses of DcytB, protein responsible for converting Fe^{3+} to Fe^{2+} for absorption by enterocytes,³⁵ since test groups fed with formulations containing only micronized ferric pyrophosphate showed higher gene expression of DcytB than groups fed with diets containing Ultra Rice[®]. It is reasonable to believe that, in animals fed with micronized ferric pyrophosphate, higher amounts of oxidized iron (Fe^{3+}) have reached the enterocytes brush border, increasing the DcytB expression and favoring the transformation $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + e^{-}$ (Fig.9). Also, DMT-1 plays a crucial role in transporting Fe^{2+} into the enterocytes.³⁶ The expression of this gene was significantly more pronounced in animals fed with micronized ferric pyrophosphate diet than in those that consumed Ultra Rice[®] diets.

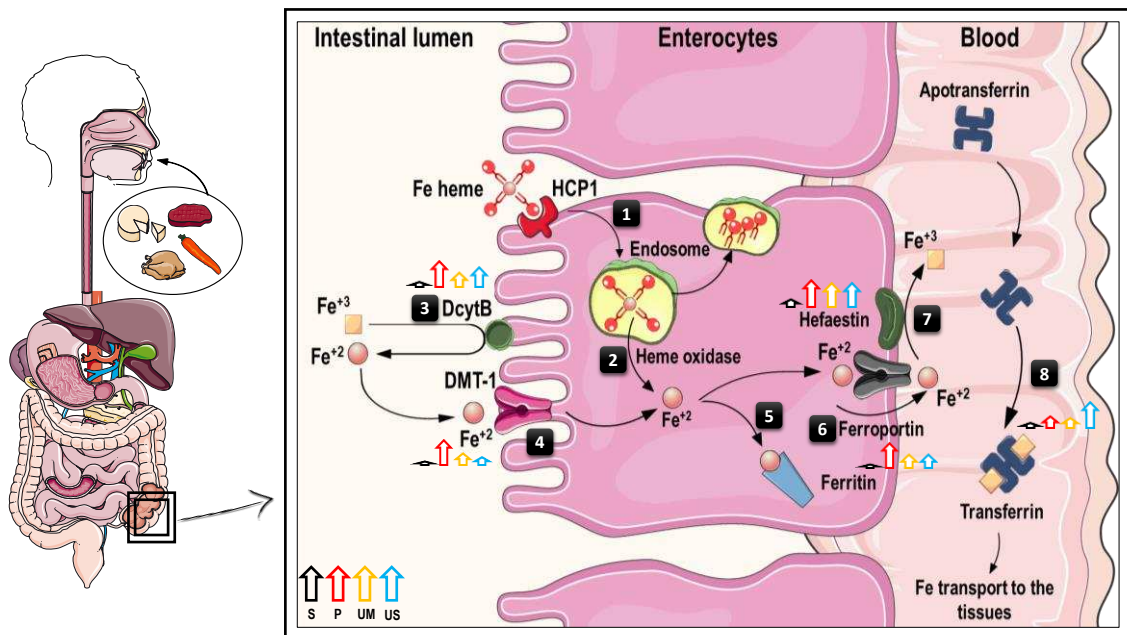


Figure 9 – Numbers 1-8 indicate the stages of heme and non-heme iron absorption: 1. Heme iron absorption by HCP-1; 2. Fe²⁺ release from the heme iron; 3. Conversion of Fe³⁺ to Fe²⁺ by DcytB; 4. Transport of Fe²⁺ from lumen to the enterocyte by DMT-1; 5. Provisional storage of Fe²⁺ in the ferritin form within the enterocyte; 6. Transport of Fe²⁺ of the enterocyte into the bloodstream mediated by ferroportin; 7. Oxidation of Fe²⁺ to Fe³⁺ by hephaestin; 8. Coupling of Fe³⁺ to apotransferrin and Fe ion transport to the needy tissue. S: Diet with ferrous sulfate; P: Diet with micronized ferric pyrophosphate; UM: Diet with fortified dessert with Ultra Rice[®] and cow's milk; US: Diet with fortified dessert with Ultra Rice[®] and SSE (soy soluble extract).

From another point of view, the iron deficiency is one factor able to promote an increase of the iron absorptive capacity in mammals.³⁷ Ferroportin is a protein responsible for transporting the Fe²⁺ from enterocytes to bloodstream,³⁸ whilst hephaestin is a protein directly involved in the conversion of Fe²⁺ into Fe³⁺, so that it can be incorporated in transferrin.³⁹ In the present study, both hephaestin and ferroportin gene expression increased when the nutritional iron status of animals decreased. It suggests that the increase on iron absorptive capacity of animals fed with the micronized ferric pyrophosphate diet can be correlated to an increased gene expression of ferroportin and hephaestin. This is supported by the fact that there was a dynamic balance in the serum iron and liver iron content ($p > 0.05$) among the groups controlled by the increase or decrease of ferroportin and hephaestin gene expression.

It is also important to consider that lowering the iron release into bloodstream can trigger a reduction of genes coding expression for proteins involved in storage and transport of the iron absorbed, such as ferritin and transferrin.³⁷ In the present study, there were an increase in gene expression of ferritin and serum ferritin content in animals fed with soy diets, compared to those fed with cow's milk diets. Ferritin plays an important role in iron storage, and the serum ferritin content is considered as a marker of iron nutritional status.⁴⁰ Although no statistical difference was detected between groups that intake Ultra Rice[®] diets ($p > 0.05$),

the group that fed diet with SSE showed HRE average 20% higher than the group fed with cow's milk diet, suggesting that the increase in serum ferritin levels in animals fed diet with Ultra Rice[®] and SSE can be correlated to an improvement of their nutritional iron status, compared to those fed with Ultra Rice[®] and cow's milk. Nonetheless, it is to be noted that this improvement could not be significantly expressed in HRE due to the short repletion period.

Transferrin has the function of transporting iron from bloodstream to the body tissues.⁴¹ The experimental group fed with soy extract diet presented significantly higher transferrin gene expression compared to the others groups, which is probably associated with the highest growth rate of the animals fed with US diet, as these later presented higher FER at the end of the repletion phase. Such situation is desirable, for example, in individuals at high tissues production stage, such as children and pregnant women,⁴² in order to favor the proper transport of iron cations through the bloodstream and from this later to the tissues that are developing.

5.6. CONCLUSION

Both cow's milk and soy extract-based "arroz doce" formulations allowed the recovery of the iron nutritional status of depleted rats, and presented about 70% of ferrous sulfate bioavailability. Moreover, formulations with Ultra Rice[®] matrix led to a significantly increased bioavailability of micronized ferric pyrophosphate. Finally, the iron nutritional status of the animals influenced directly the gene expression of proteins involved in iron metabolism: in animals fed with diets with lower iron bioavailability, the gene expression of DcytB, DMT-1, ferroportin and hephaestin was more pronounced, confirming that the iron deficiency is one factor that can trigger an increase of the body iron absorptive capacity.

5.7. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Brazilian research agencies CAPES, CNPq, FAPEMIG, and FUNARBE, for the financial support to carry out this study, and to the enterprises URBANO, OLVEBRA and BioClin, for kindly providing different materials and reagents used in experiments. Mr. T.V. Oliveira also acknowledges the agency CNPq for his fellowship.

5.8. REFERENCE

- 1 K.V. Grebmer, A. Saltzman, E. Birol, D. Wiesmann, N. Prasai, S. Yin, Y. Yohannes, P. Menon, J. Thompson, A. Sonntag, *Global Hunger Index: The*

- Challenge of Hidden Hunger*, Bonn, Washington D.C. and Dublin: Welthungerhilfe, International Food Policy Research Institute and Concern Worldwide, 2014, **1**, pp.51.
- 2 M, Nutti, J.L.V. Carvalho, E. Watanabe, *A biofortificação como ferramenta para combater as deficiências em micronutrientes*, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, 2016.
 - 3 S. Akhtar, A. Ahmed, A. Ahmad, Z. Ali, M. Riaz, T. Ismail, Iron status of the Pakistani population-current issues and strategies, *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.*, 2013, **22**, 340-347.
 - 4 F. R. Wang, Z.G. Xie, X.Q. Ye, S.G. Deng, Y.Q. Hu, X. Guo, S.G. Chen, Effectiveness of treatment of iron deficiency anemia in rats with squid ink melanin-Fe, *Food Funct.*, 2014, **5**, 123-128.
 - 5 J.E. Andrade, E. Rosales, J.R. Lopez, E.P. Carrillo, N.J. Engeseth, W.G. Helferich, Development of a point-of-use fortification technology for delivery of micronutrients in Honduras, *J. Sci. Food Agric.*, 2015, **95**, 393-400.
 - 6 BMZ, *Supplementation, Food Fortification and Dietary Diversification - A three-pronged approach to reducing hidden hunger*. Federal Ministry for Economic Cooperation and Development, Bonn, Germany, 2012.
 - 7 S.S. Queiroz, M.A.A. Torres, Iron deficiency anemia in children, *J Pediatr (Rio J)*, 2000, **76**, S298-S304.
 - 8 R. Hurrell, Fortification: Overcoming technical and practical barriers, *J. Nutr.*, 2002, **132**, 806S-812S.
 - 9 PATH, *Technology Solutions for Global Health - Ultra Rice Technology*, Program for Appropriate Technology in Health, Seattle, 2013.
 - 10 S.D. Segall, *Building and innovative commercial model to address micronutrient malnutrition*, Scaling Up Fortification in Brazil, Brasília: PATH, 2012.
 - 11 D. Matthias, *Ultra-Rice: Improving the Nutritional Value of Rice*, International Food Aid Conference: Nutritional Panel, [S.l.]: PATH, 2012.
 - 12 S. Cali, PATH's Ultra Rice Project, *Food and Global Health Seminar*, Washington, 2008.
 - 13 R.S. Gibson, The role of diet- and host-related factors in nutrient bioavailability and thus in nutrient-based dietary requirement estimates, *Food Nutr. Bull.*, 2007, **28**, S77-S100.
 - 14 M. Li, J. Wu, T. Ren, R. Wang, W. Li, J. Piao, J. Wang, X. Yang, Effect of NaFeEDTA-fortified soy sauce on zinc absorption in children, *Food Funct.*, 2015, **6**, 788-792.
 - 15 C. Icard-Vernière, C. Picq, L. Courbis, C. Mouquet-Rivier, The type of fortificant and the leaf matrix both influence iron and zinc bioaccessibility in iron fortified green leafy vegetable sauces from Burkina Faso, *Food Funct.*, 2016, **7**, 1103-1110.

- 16 I. López-Aliaga, J. Díaz-Castro, T. Nestares, J. M. Alférez, M.S. Campos, Calcium supplemented goat milk does not interfere with iron absorption in rats with anaemia induced by dietary iron depletion, *Food Chem.*, 2009, **113**, 839-841.
- 17 D. Gaitan, S. Flores, P. Saavedra, C. Miranda, M. Olivares, M. Arredondo, D.L. Romana, B. Lonnerdal, F. Pizarro, Calcium Does Not Inhibit the Absorption of 5 Milligrams of Nonheme or Heme Iron at Doses Less Than 800 Milligrams in Nonpregnant Women, *J. Nutr.*, 2011, **141**, 1652-1656.
- 18 M. Olivares, F. Pizarro, M. Ruz, New insights about iron bioavailability inhibition by zinc, *Nutrition*, 2007, **23**, 292-295.
- 19 M. Parker, E. Mosites, K. Reider, N. Ndayishimiye, M. Waring, G. Nyandimbane, D. Masumbuko, L. Ndikuriyo, D. Matthias, Treatment of Anemia with Iron-fortified Rice in a School Lunch Program in Burundi, *European J. Nutr. Food. Saf.*, 2015, **5**, 357-358.
- 20 C. Hotz, M. Porcayo, G. Onofre, A. García-Guerra, T. Elliott, S. Jankowski, T. Greiner, Efficacy of iron-fortified Ultra Rice in improving the iron status of women in Mexico, *Food. Nutr. Bull.*, 2008, **29**, 140-149.
- 21 P.L. Minotti, M.S. Buchowski, D.D. Miller, Effects of calcium supplementation, calcium source and lactose on iron absorption in the rat, *Nutr. Res.*, 1993, **13**, 1173-1181.
- 22 R.F. Hurrell, S.R. Lynch, T.P. Trinidad, S.A. Dassenko, J.D. Cook, Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1989, **49**, 546-552.
- 23 AOAC, *Official methods of analysis 16th ed.*, Association of Official Analytical Chemistry, Washington: D.C., 1998.
- 24 AOAC, *Official methods of analysis. 19th ed.*, Association of Official Analytical Chemistry, Gaithersburg, 2012.
- 25 P.G. Reeves, F.H. Nielsen, G.C. Fahey Jr, AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, *J. Nutr.*, 1993, **123**, 1939-1951.
- 26 M. Hernández, V. Sousa, A. Moreno, S. Villapando, M. López-Alarcón, Iron bioavailability and utilization in rats are lower from lime-treated corn flour than from wheat flour when they are fortified with different sources of iron. *J. Nutr.*, 2003, **133**, 154-159.
- 27 S.A. Chadd, W. Davies, J.M. Koivisto, *Practical production of protein for food animals, in: Protein sources for the animal feed industry*, Bangkok, 2004.
- 28 B. Sachdeva, R. Kaushik, S. Arora, Bioavailability of iron in multiple fortified milk, *Journal of Food Science and Technology*, 2015, **52**, 6017-6023.
- 29 A.M. Minihane, S.J. Fairweather-Tait, Effect of calcium supplementation on daily nonheme-iron absorption and long-term iron status. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, **68**, 96-102.

- 30 C.M. Della Lucia, M.G.V. Tostes, C.M.M. Silveira, L.A. Bordalo, C.R. Fabiana, H.M.P. Sant'Ana, H.S.D. Martino, N.M.B. Costa, Iron bioavailability in Wistar rats fed with fortified rice by Ultra Rice® technology with or without addition of yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*). *Arch. Latinoam. Nutr.*, 2013, **63**, 64-73.
- 31 A.R. Lobo, M.L. Cocato, P. Borelli, E.H.S. Gaievski, A.R. Crisma, K. Nakajima, E.Y. Nakano, C. Colli, Iron bioavailability from ferric pyrophosphate in rats fed with fructan-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius*) flour, *Food. Chem.*, 2011, **126**, 885-891.
- 32 R. Wegmuller, M.B. Zimmermann, D. Moretti, M. Arnold, W. Langhans, R.F. Hurrell, Particle size reduction and encapsulation affect the bioavailability of ferric pyrophosphate in rats. *J. Nutr.*, 2004, **134**, 3301–3304.
- 33 P.R. Henry, E.R. Miller, in: *Bioavailability of nutrients for animals: amino acids minerals and vitamins*, A.C. Ammerman, D.H. Baker, A.J. Lewis, Academic Press. San Diego, California, 1995, Iron bioavailability, 169-200.
- 34 M.C. Fidler, T. Walczyk, L. Davidsson, C. Zeder, N. Sakaguchi, L.R. Juneja, R.F. Hurrell, A micronised, dispersible ferric pyrophosphate with high relative bioavailability in man. *Br. J. Nutr.*, 2004, **91**, 107-112.
- 35 G.O. Latunde-Dada, J.V. Westhuizen, C.D. Vulpe, G.L. Anderson, R.J. Simpson, A.T. McKie, Molecular and Functional Roles of Duodenal Cytochrome B (Dcytb) in Iron Metabolism, *Blood Cells Mol. Dis.*, 2002, **29**, 356-360.
- 36 N.C. Andrews, A genetic view of iron homeostasis, *Semin. Hematol.*, 2002, **39**, 227-234.
- 37 M. Bluffer, C. Becker, W. Windisch, K. Schümann, Inflammation neither increases hepatic hepcidin nor affects intestinal ⁵⁹Fe-absorption in two murine models of bowel inflammation, hemizygous TNFARE/+ and homozygous IL-10-/- mice, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2015, **32**, 162-167.
- 38 E. Nemeth, M. Tuttle, J. Powelson, M. Vaughn, A. Donovan, D. Ward, Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization, *Science*, 2004, **306**, 2090–2093.
- 39 S.S. Nadadur, K. Srirama, A. Mudipalli, Iron transport & homeostasis mechanisms: Their role in health & disease, *Indian J. Med. Res.*, 2008, **128**, 533-544.
- 40 E. Balogh, E. Tolnai, B. J. Nagy, B. Nagy, G. Balla, J. Balla, V. Jeney, Iron overload inhibits osteogenic commitment and differentiation of mesenchymal stem cells via the induction of ferritin, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2016, **1862**, 1640-1649.
- 41 P. Aisen, C. Enns, M. Wessling-Resnick, Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2001, **33**, 940-959. *Biochem. Cell Biol.*, 2001, **33**, 940-959.
- 42 FAO / WHO, Iron: The role of iron in human metabolic processes. *FAO/WHO expert consultation on human vitamin and mineral requirements*, 2002, 195-221.

6. CONCLUSÕES GERAIS

As formulações fortificadas desenvolvidas atendem às exigências para sobremesas do Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE) e ultrapassam a concentração mínima de ferro exigida pela Anvisa para serem classificadas como sobremesas fortificadas com ferro. No tocante à aceitação sensorial, não foram observadas diferenças significativas entre as formulações fortificadas por meio de questionário de ingestão. Porém, ao se observar a aceitação sensorial por meio do resto de ingestão, observou-se que as formulações à base de leite provocaram menor “surpresa” ao paladar das crianças comparadas às formulações com soja.

As formulações fortificadas com ferro à base de Ultra Rice® com leite e extrato hidrossolúvel de soja apresentaram alta absorção de ferro, comparáveis às observadas com o sulfato ferroso. O elevado teor de cálcio da formulação à base de leite não afetou negativamente a biodisponibilidade de ferro em relação à formulação fortificada à base de extrato hidrossolúvel de soja.

Os custos de produção das sobremesas são compatíveis com os custos das sobremesas servidas atualmente nas escolas, sendo o produto viável do ponto de vista financeiro e tecnológico para ser fornecido às crianças em escolas públicas.

Por tudo isso, pode-se afirmar que o arroz doce fortificado com Ultra Rice® à base de leite é uma alternativa viável e promissora para contribuir no combate à fome oculta, principalmente em relação à anemia ferropriva endêmica, podendo ser levado às crianças por meio da merenda escolar.

Para a continuidade deste trabalho, tem-se como perspectiva a realização de testes hematológicos com crianças para que sejam avaliados a porção e a frequência de consumo ideais para que a sobremesa fortificada forneça melhoras significativas no estado nutricional das crianças.

ANEXO 1

Aprovação comitê de ética para pesquisas com seres humanos

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Arroz doce fortificado para merendas escolares: aspectos tecnológicos, avaliação sensorial e biodisponibilidade *in vivo* de ferro

Pesquisador: Eduardo Basílio de Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49051315.8.0000.5153

Instituição Proponente: Departamento de Tecnologia de Alimentos

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.328.871

Apresentação do Projeto:

Esse projeto pertence à Grande Área 1. Ciências Exatas e da Terra e tem por título "Arroz doce fortificado para merendas escolares: aspectos tecnológicos, avaliação sensorial e biodisponibilidade "in vivo" de ferro". Segundo os pesquisadores cerca de um terço da população mundial sofre de deficiência nutricional de um ou mais micronutrientes essenciais. A essa carência não explícita de um ou mais nutrientes dá-se o nome de "fome oculta". As crianças são consideradas grupo de risco, pois possuem demandas elevadas de vitaminas e minerais para seu desenvolvimento. Neste contexto, com o objetivo de auxiliar na erradicação da fome oculta, pesquisadores têm trabalhado na fortificação e distribuição de alguns alimentos. Este trabalho terá como objetivo o desenvolvimento de uma formulação de arroz doce fortificado à base de Ultra Rice®, com ou sem leite, que atenda às especificações do PNAE para distribuição na merenda escolar. Para as análises de composição centesimal, estabilidade química e microbiológica e aceitação sensorial, será utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 em que as fontes de variação serão o tipo de arroz (polido comum ou Ultra Rice®) e o fluido de base (leite ou extrato hidrossolúvel de soja), com 3 repetições. Também será realizado ensaio sobre biodisponibilidade de ferro das formulações por meio do método de depleção/repleção de hemoglobina utilizando delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2, com 6

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 36.570-900
UF: MG **Município:** VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br

Continuação do Parecer: 1.328.871

repetições (animais), em que as fontes de variação serão a fonte de ferro (sulfato ferroso ou Ultra Rice®) e o fluido base da formulação (leite ou extrato hidrossolúvel de soja). Serão avaliados a possível diferença entre os grupos de animais quanto ao ganho de peso, coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e ganho de hemoglobina. Os dados serão analisados por meio da análise de variância, a 5 % de probabilidade, e as variáveis que apresentarem diferenças significativas serão comparadas através de teste de médias de Tukey, a 5% de significância, com auxílio do software Statistical Analysis System (SAS), versão 9.0, licenciado para a UFV.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Desenvolver uma formulação de arroz doce fortificado à base de Ultra Rice®, com ou sem leite, que atenda às especificações do PNAE para distribuição na merenda escolar.

Objetivo Secundário:

- Elaborar quatro formulações distintas de arroz doce, diferindo quanto à fonte de arroz (arroz polido comum ou Ultra Rice®) e quanto ao fluido de base (leite ou extrato hidrossolúvel de soja).
- Caracterizar as formulações quanto a sua composição centesimal (umidade, lipídios, carboidratos, fibra alimentar total, cinzas e proteínas) e quanto aos teores de ferro e cálcio;
- Caracterizar as formulações quanto ao seu valor calórico por unidade de massa, para definir a massa de cada porção de modo a atender às especificações do PNAE.
- Realizar estudo prévio da estabilidade físico-química e microbiológica das formulações após armazenamento refrigerado.
- Avaliar sensorialmente as formulações, por meio de teste de aceitação em escolares.
- Avaliar biodisponibilidade de Fe das diferentes formulações em ratos Wistar e avaliar a possível interferência do mineral Ca na absorção do Fe.
- Determinar características do processo produtivo: fluxograma de produção, balanços de massa e energia, demanda de equipamentos e elaboração de um projeto de uma planta piloto de produção.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores apontam como riscos:

- Alguns tratamentos levam leite bovino em sua composição. Portanto, há risco de que alguma criança que não seja previamente diagnosticada com intolerância à lactose ou alergia à proteínas

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário CEP: 36.570-900
UF: MG Município: VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 E-mail: cep@ufv.br

Continuação do Parecer: 1.328.871

do leite realize a análise sensorial.

Para minimizar este risco, três estratégias serão aplicadas:

I – Uma reunião prévia com os pais das crianças será realizada e serão discutidos os objetivos do projeto assim como os riscos associados à análise sensorial.

II – Participarão do trabalho apenas crianças que tiveram o “Termo de Consentimento Livre Esclarecido” preenchido e assinado pelos pais após apresentação do projeto em reunião. Este documento deixa claro que crianças com intolerância à lactose e alergia a produtos lácteos não poderão participar da pesquisa.

III – Toda a análise sensorial será acompanhada pela nutricionista Débora Sabino dos Santos, responsável pela alimentação servida nas escolas participantes do estudo, e que possui documentação e conhecimento sobre as crianças que possuem algum tipo de restrição alimentar.

- As sobremesas serão dimensionadas e distribuídas de acordo com as diretrizes do Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE). Seu consumo em quantidades superiores a recomenda semanalmente pode ter como consequência desequilíbrio nutricional e elevação do peso da criança. Para minimizar este risco, previamente será realizado um estudo da composição centesimal do alimento e seu teor energético (calórico). Desta forma, no momento da realização da análise sensorial, saberemos qual a porção ideal para que não haja sobrecarga calórica nas crianças. Além

disso, a nutricionista responsável pela alimentação das escolas participantes acompanhará a análise sensorial e reorganizará o cardápio da semana com o objetivo de minimizar este risco.

- Há risco de contaminação microbiológica das formulações.

Para minimizar este risco, todas as formulações serão elaboradas na planta piloto de processamento de alimentos da DTA da UFV de acordo com as boas práticas de fabricação para produção de alimentos, transportadas até as escolas sob refrigeração (5°C +/-2°C) e servidas no mesmo dia de sua produção. O risco de contaminação, neste caso, será bastante reduzido. Além disso, serão realizadas análises prévias de estabilidade

microbiológica e físico-química e caso seja identificado algum risco para a saúde das crianças as amostras não serão servidas.

Os benefícios apresentados incluem:

- Há a POSSIBILIDADE de melhora do estado nutricional dos indivíduos participantes quanto aos

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes

Bairro: Campus Universitário CEP: 36.570-900

UF: MG Município: VICOSA

Telefone: (31)3899-2492

E-mail: cep@ufv.br

Continuação do Parecer: 1.328.871

níveis de ferro, zinco, vitamina A e vitaminas do complexo B.

- Após o desenvolvimento do produto e seu fornecimento em escolas e creches a longo prazo, espera-se que seja reduzido consideravelmente os índices de deficiência de ferro em pré-escolares e escolares, melhorando sua qualidade de vida e reduzindo o risco de doenças como anemia ferropriva.

Obs: A melhora do conteúdo de ferro nos voluntários da pesquisa não será avaliada neste projeto. Serão realizados testes de biodisponibilidade de ferro e outros minerais em animais (ratos Wistar). Caso o resultado seja positivo para os ratos, é possível que as formulações estudadas também melhorem o estado nutricional de ferro em crianças, sendo uma motivação para a realização de um novo projeto com este objetivo principal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante pois aponta uma alternativa para minimizar a carência de ferro entre escolares da região de Viçosa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados.

Recomendações:

Quando da coleta de dados, o TCLE deve ser elaborado em duas vias, rubricado em todas as suas páginas e assinado, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa ou responsável legal, bem como pelo pesquisador responsável, ou pessoa(s) por ele delegada(s), devendo todas as assinaturas constar na mesma folha.

Não é necessário apresentar os TCLEs assinados ao CEP/UFV. Uma via deve ser mantida em arquivo pelo pesquisador e a outra é do participante da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Ao término da pesquisa é necessário apresentar, via notificação, o Relatório Final (modelo disponível no site www.cep.ufv.br). Após ser emitido o Parecer Consubstanciado de aprovação do Relatório Final, deve ser encaminhado, via notificação, o Comunicado de Término dos Estudos.

Projeto analisado durante a 8ª reunião de 2015.

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário CEP: 36.570-900
UF: MG Município: VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 E-mail: cep@ufv.br

Continuação do Parecer: 1.328.871

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_572839.pdf	28/10/2015 10:08:21		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	CARTA_RESPOSTA.pdf	28/10/2015 10:07:00	Eduardo Basílio de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Modificado.pdf	28/10/2015 10:03:42	Eduardo Basílio de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	03/09/2015 11:08:41	Eduardo Basílio de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO.pdf	03/09/2015 11:01:35	Eduardo Basílio de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	03/09/2015 11:00:53	Eduardo Basílio de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto2.pdf	27/08/2015 09:44:12	Eduardo Basílio de Oliveira	Aceito
Outros	QUESTIONARIO.pdf	27/08/2015 09:37:36	Eduardo Basílio de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VICOSA, 19 de Novembro de 2015

Assinado por:

HELEN HERMANA MIRANDA HERMSDORFF
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes

Bairro: Campus Universitário

CEP: 36.570-900

UF: MG

Município: VICOSA

Telefone: (31)3899-2492

E-mail: cep@ufv.br

ANEXO 2

Aprovação comitê de ética para pesquisas com animais



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-3783

Viçosa, 17 de fevereiro de 2016

Ilmo. Prof.
Eduardo Basílio de Oliveira
Coordenador do projeto
DTA/UFV

Sr. Coordenador,

Após avaliação da Metodologia utilizada no Projeto de Pesquisa intitulado "Arroz doce fortificado para merendas escolares: aspectos tecnológicos, avaliação sensorial e biodisponibilidade *in vivo* de ferro", aqui nomeado Processo 66/2015, a CEUA/UFV emite parecer favorável ao protocolo de utilização de animais proposto, tendo como base para análise a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, bem como a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI.

Acresce a esse Parecer a exigência de Relatório Final de Atividades conforme itens a seguir:

RESUMO DOS RESULTADOS FINAIS OBTIDOS A PARTIR DOS EXPERIMENTOS ENVOLVENDO A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NO PROJETO DE PESQUISA

- 1 Número do protocolo de submissão do projeto de pesquisa à CEUA/UFV:
- 2 Metodologia completa obrigatoriamente com:
 - Local (is) Geral (is) e específico (s) oficial (is) onde ocorreu a experimentação;
 - O nome científico do animal em questão;
 - Número total de animais utilizados na pesquisa.
- 3 Resultados:
- 4 Nome do Coordenador do Projeto:
Assinatura:
- 5 Nome do Responsável Técnico:

Inscrição em CRMV:


Prof.ª Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente


Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 66/2015, intitulado “Arroz doce fortificado para merendas escolares: aspectos tecnológicos, avaliação sensorial e biodisponibilidade *in vivo* de ferro”, coordenado pelo professor Eduardo Basílio de Oliveira do Departamento de Tecnologia de Alimentos, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 17/02/2016, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 66/2015, named “Sweet fortified rice for school lunches: technological, sensory evaluation and *in vivo* bioavailability of iron”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on February 17, 2016 valid for 12 months.

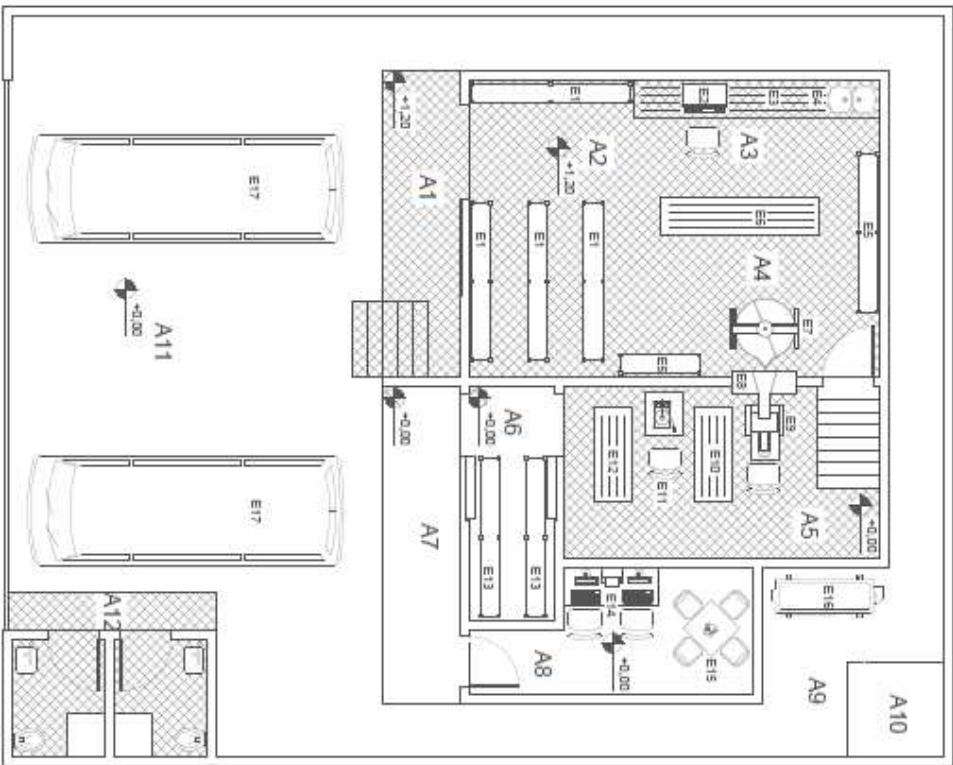

Prof. Atima Clemente Alves Zuanon
Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

APENDICE 1

Planta piloto de produção de arroz doce fortificado à base de leite ou soja

PROPOSTA LAYOUT
 ESCALA 1:80



NOTAS GERAIS

SETORES:

- A1 - RECEPCÃO DE MATÉRIA-PRIMA
- A2 - SETOR DE ESTOQUE DE MATÉRIA-PRIMA E INSULADOS
- A3 - SETOR DE PESAGEM DE MATÉRIA-PRIMA E INSULADOS
- A4 - SETOR DE PRODUÇÃO
- A5 - ESTOQUE DE PRODUTO ACABADO
- A6 - EXPEDIENTE DE PRODUTO ACABADO
- A7 - ESCRITÓRIO
- A8 - SETOR DE GERAÇÃO DE VAPOR
- A9 - ESTOQUE DE LENHA
- A10 - SETOR DE TRÁNSITO DE VEÍCULOS
- A11 - BANHEIROS
- A12 - BANHEIROS

EQUIPAMENTOS

- E1 - PRATELEIRAS PARA ESTOQUE DE MATÉRIA-PRIMA E INSULADOS
- E2 - BALANÇA
- E3 - BANCADELA DE AUXÍLIO À PESAGEM
- E4 - PVA
- E5 - PRATELEIRA DE ARMAZENAMENTO DE PRODUTOS PESADOS
- E6 - BANCADELA DE AUXÍLIO À PRODUÇÃO
- E7 - TACHO ENCAMISADO COM AQUECIMENTO
- E8 - ACESSO ENTRE TACHO E ENBALADORA
- E9 - ENBALADORA
- E10 - BANCADELA DE AUXÍLIO À ENBALADORA
- E11 - SELADORA
- E12 - BANCADELA DE AUXÍLIO À SELADORA
- E13 - PRATELEIRA PARA ESTOQUE DE PRODUTO ACABADO
- E14 - MESA DA ADMINISTRAÇÃO
- E15 - MESA DE REUNIÕES
- E16 - CALDEIRA A LENHA
- E17 - VEÍCULOS

PROJETO:

Proposta de layout de fábrica de produção de amarelo doce fortificado em Vigosa, Minas Gerais.

EQUIPE:

Thomas Vazient de Oliveira
 Eduardo Sallio de Oliveira

Projeto	Proposta - Vigosa/MG
Data	31/07/2015
Escala	1:80



APENDICE 2

Memorial de cálculo para custos de produção e indicadores econômicos

LEVANTAMENTO DE DEMANDA

CIDADE FOCO:	VIÇOSA - MG
ESTIMATIVA DE ESTUDANTES (REDE MUNICIPAL E ESTADUAL):	15.000 estudantes
RECOMENDAÇÃO DO PRODUTO (gramas por criança por dia):	100 g/dia
RECOMENDAÇÃO DO PRODUTO (dias servidos/semana):	3 dias/semana
TOTAL DEMANDADO (gramas por criança por semana):	300 g/semana
TOTAL DEMANDADO (kg de produto produzido/semana):	4.500 kg/semana
PRODUÇÃO DIÁRIA (kg/dia):	900 kg/dia
PRODUÇÃO MENSAL (kg/mês):	18.000 kg/mês

RENDIMENTO MÉDIO DAS FORMULAÇÕES:	45,5%
-----------------------------------	-------

INFORMAÇÕES DA FORMULAÇÃO

CUSTOS VARIÁVEIS				
MATÉRIA-PRIMA	R\$/und	COEFICIENTE (%/kg)	DEMANDA (kg/mês)	DEMANDA (R\$/mês)
ARROZ POLIDO	R\$ 1,90 R\$/kg	4,20%	1.662 kg	R\$ 3.156,92
ULTRA RICE	R\$ 2,50 R\$/kg	1,30%	514 kg	R\$ 1.285,71
ÁÇÚCAR	R\$ 0,52 R\$/kg	5,30%	2.097 kg	R\$ 1.090,29
LEITE	R\$ 1,00 R\$/L	39,20%	15.508 L	R\$ 15.507,69
PROT. SOJA	R\$ 6,00 R\$/kg	0,00%	- kg	R\$ -
ÁGUA SOLUÇÃO (6%)	R\$ 3,54 R\$/m3	0,00%	- m3	R\$ -
AROMATIZANTE:	R\$ 45,00 R\$/L	0,25%	99 L	R\$ 4.450,55
SAL	R\$ 0,60 R\$/kg	0,03%	12 kg	R\$ 7,12
ÁGUA DE COZIMENTO	R\$ 3,54 R\$/m3	49,72%	20 m3	R\$ 69,63
INSUMOS	R\$/und	COEFICIENTE (kg/und)	DEMANDA (und/mês)	DEMANDA (R\$/mês)
EMBALAGEM	R\$ 0,04 R\$/und	0,1	180.000 und	R\$ 7.200,00
SELO DE VEDAÇÃO	R\$ 0,03 R\$/und	0,1	180.000 und	R\$ 5.400,00
ENERGIA	R\$ 0,55 R\$/kwh	35,484	507 kwh	R\$ 281,40
LENHA	R\$ 24,00 R\$/m3	1.000,0	18 m3	R\$ 432,00
ÁGUA DE HIGIENIZAÇÃO	R\$ 3,54 R\$/m3	900,0	20 m3	R\$ 70,80
MATERIAL LIMPEZA	R\$ 2,65 R\$/und	500,0	36 m3	R\$ 95,40
MÃO-DE-OBRA	R\$/homem	COEFICIENTE (kg/homem)	DEMANDA (homem/mês)	DEMANDA (R\$/mês)
OPERACIONAL	R\$ 1.000,00 R\$/homem	3000	3 homens	R\$ 5.400,00
TOTAL:				R\$ 44.447,52

CUSTOS FIXOS				
DESCRIÇÃO	UNIDADE	QUANTIDADE	VALOR (R\$/und)	DEMANDA (R\$/mês)
MO ADMINISTRATIVA	Homens/Planta	1	R\$ 2.000,00 /homem	R\$ 3.600,00
MO ESPECIALIZADA	Homens/Planta	1	R\$ 3.500,00 /homem	R\$ 6.300,00
IMPOSTO DE RENDA	Alíquota	15%		R\$ -
ENERGIA ESCRITÓRIO	R\$/mês	1	R\$ 80,00 /mês	R\$ 80,00
TOTAL:				R\$ 9.980,00

DEPRECIÇÃO				
DEPRECIÇÃO EQUIPAMENTOS	meses	120	135.112,00 /mês	R\$ 1.125,93
DEPRECIÇÃO OBRAS CIVIS	meses	600	61.500,00 /mês	R\$ 102,50
TOTAL:				R\$ 1.228,43

RECEITA				
PRODUTO PRINCIPAL	UNIDADE	QUANTIDADE	VALOR (R\$/und)	RECEITA (R\$/mês)
	Unidades	180.000	R\$ 0,40 R\$/und	R\$ 72.000,00

INVESTIMENTOS - CAPITAL DE GIRO				
CAPITAL DE GIRO	dias	5	R\$ 2.222,38 R\$/dia	R\$ 11.111,88
TOTAL:				R\$ 11.111,88

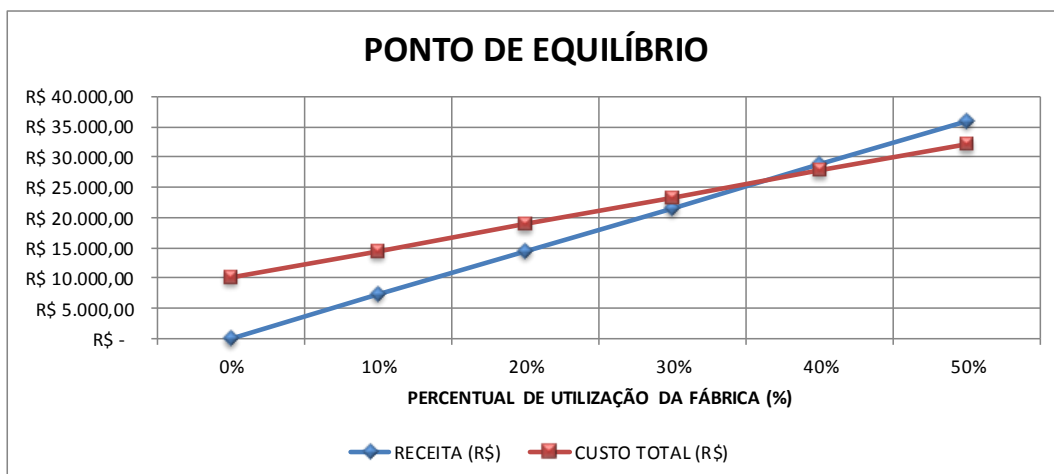
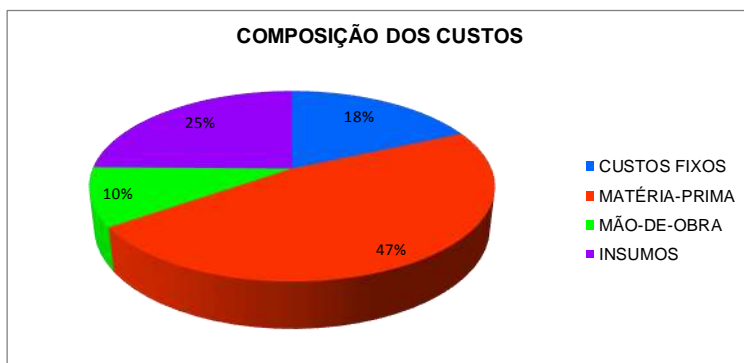
INVESTIMENTOS - CAPITAL FIXO				
	UNIDADE	QUANTIDADE	VALOR (R\$/und)	INVESTIMENTO
LOTE	m2	180	PROGRAMA DE DOAÇÃO MUNICIPAL	
OBRAS E BENFEITORIAS	m2	82	R\$ 750,00 R\$/und	R\$ 61.500,00
PRATELEIRA	und	8	R\$ 1.700,00 R\$/und	R\$ 13.600,00
BANCADA DE INOX	und	4	R\$ 600,00 R\$/und	R\$ 2.400,00
PIA INOXIDÁVEL	und	1	R\$ 200,00 R\$/und	R\$ 200,00
BALANÇA	und	1	R\$ 430,00 R\$/und	R\$ 430,00
CADEIRAS	und	3	R\$ 80,00 R\$/und	R\$ 240,00
TACHO ENCAMISADO 300 L	und	1	R\$ 20.000,00 R\$/und	R\$ 20.000,00
EMBALADORA	und	1	R\$ 39.260,00 R\$/und	R\$ 39.260,00
SELADORA	und	1	R\$ 1.600,00 R\$/und	R\$ 1.600,00
CÂMARA FRIA (3,70 m x 1,50 m)	und	1	R\$ 14.850,00 R\$/und	R\$ 14.850,00
CALDEIRA	und	1	R\$ 15.000,00 R\$/und	R\$ 15.000,00
COMPUTADOR	und	2	R\$ 1.300,00 R\$/und	R\$ 2.600,00
MESA + 6 CADEIRAS	und	1	R\$ 2.500,00 R\$/und	R\$ 2.500,00
VEÍCULO DE ENTREGA (TIPO FURGÃO)	und	1	R\$ 44.402,00 R\$/und	R\$ 44.402,00
CUSTOS COM O PROJETO	10% do investimento	10%	R\$ 21.858,20 R\$/und	R\$ 17.418,00
TOTAL:				R\$ 236.000,00

INDICADORES ECONÔMICOS

CUSTO DE PRODUÇÃO (und)	R\$ 0,30
INVESTIMENTO TOTAL	R\$ 247.111,88
PONTO DE EQUILÍBRIO (%)	36,22%
TIR (%)	68,86%
TRC (ANOS)	1,47
TMA (%)	12%
VPL (%)	R\$ 627.646,65

COMPOSIÇÃO DOS CUSTOS

CUSTOS FIXOS	R\$ 9.980,00
MATÉRIA-PRIMA	R\$ 25.567,92
MÃO-DE-OBRA	R\$ 5.400,00
INSUMOS	R\$ 13.479,60



FLUXO DE CAIXA

ITEM	0	ANO												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
INVESTIMENTO INICIAL														
CAPITAL FIXO	-R\$ 236.000,00													
CAPITAL DE GIRO		-R\$ 11.111,88												
RECEITAS TOTAIS		R\$ 864.000,00	R\$ 864.000,00	R\$ 864.000,00	R\$ 864.000,00	R\$ 864.000,00	R\$ 864.000,00	R\$ 864.000,00	R\$ 864.000,00	R\$ 864.000,00	R\$ 864.000,00	R\$ 864.000,00	R\$ 864.000,00	R\$ 864.000,00
CUSTOS TOTAIS		R\$ 667.871,43	R\$ 667.871,43	R\$ 667.871,43	R\$ 667.871,43	R\$ 667.871,43	R\$ 667.871,43	R\$ 667.871,43	R\$ 667.871,43	R\$ 667.871,43	R\$ 667.871,43	R\$ 667.871,43	R\$ 667.871,43	R\$ 667.871,43
LUCRO LÍQUIDO		R\$ 196.128,57	R\$ 196.128,57	R\$ 196.128,57	R\$ 196.128,57	R\$ 196.128,57	R\$ 196.128,57	R\$ 196.128,57	R\$ 196.128,57	R\$ 196.128,57	R\$ 196.128,57	R\$ 196.128,57	R\$ 196.128,57	R\$ 196.128,57
IMPOSTO DE RENDA		R\$ 29.419,29	R\$ 29.419,29	R\$ 29.419,29	R\$ 29.419,29	R\$ 29.419,29	R\$ 29.419,29	R\$ 29.419,29	R\$ 29.419,29	R\$ 29.419,29	R\$ 29.419,29	R\$ 29.419,29	R\$ 29.419,29	R\$ 29.419,29
LUCRO LÍQUIDO		R\$ 166.709,29	R\$ 166.709,29	R\$ 166.709,29	R\$ 166.709,29	R\$ 166.709,29	R\$ 166.709,29	R\$ 166.709,29	R\$ 166.709,29	R\$ 166.709,29	R\$ 166.709,29	R\$ 166.709,29	R\$ 166.709,29	R\$ 166.709,29
DEPRECIACÃO		R\$ 1.228,43	R\$ 1.228,43	R\$ 1.228,43	R\$ 1.228,43	R\$ 1.228,43	R\$ 1.228,43	R\$ 1.228,43	R\$ 1.228,43	R\$ 1.228,43	R\$ 1.228,43	R\$ 1.228,43	R\$ 1.228,43	R\$ 1.228,43
FC LÍQUIDO	-R\$ 236.000,00	R\$ 156.825,84	R\$ 167.937,72	R\$ 167.937,72	R\$ 167.937,72	R\$ 167.937,72	R\$ 167.937,72	R\$ 167.937,72	R\$ 167.937,72	R\$ 167.937,72	R\$ 167.937,72	R\$ 167.937,72	R\$ 167.937,72	R\$ 167.937,72
FC ACUMULADO	-R\$ 236.000,00	-R\$ 79.174,16	R\$ 88.763,56	R\$ 256.701,28	R\$ 424.639,00	R\$ 592.576,72	R\$ 760.514,44	R\$ 928.452,16	R\$ 1.096.389,87	R\$ 1.264.327,59	R\$ 1.432.265,31			
TRC		R\$ 1,47												