

PAULO ROGÉRIO FONTES

VALOR PROTÉICO, BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E
ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DE MORTADELAS FORMULADAS COM
SANGUE TRATADO COM MONÓXIDO DE CARBONO

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F683v
2006

Fontes, Paulo Rogério, 1971-

Valor protéico, biodisponibilidade de ferro e aspectos toxicológicos de mortadelas formuladas com sangue tratado com monóxido de carbono / Paulo Rogério Fontes. – Viçosa : UFV, 2006.
xxiii, 168f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Lúcio Alberto de Miranda Gomide.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 131-156.

1. Embutidos (Alimentos) - Composição. 2. Sangue na nutrição humana. 3. Sangue - Toxicologia. 4. Suíno - Sangue. 5. Proteínas. 6. Ferro - Bioviabilidade. 7. Monóxido de carbono. 8. Rato como animal de laboratório. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 664.907

PAULO ROGÉRIO FONTES

VALOR PROTÉICO, BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E
ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DE MORTADELAS FORMULADAS COM
SANGUE TRATADO COM MONÓXIDO DE CARBONO

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

APROVADA: 31 de março de 2006

Prof^a Neuza Maria Brunoro Costa
(Conselheira)

Prof^a Nilda de F. Ferreira Soares

Prof^a Cristina M. G. Chaves Dias

Prof^a Maria Cristina Bressan

Prof. Lúcio Alberto de Miranda Gomide
(Orientador)

A Deus,
por todas as bênçãos e graças.

À Maria,
pela sua intercessão junto a seu filho Jesus.

À minha esposa Edimar,
pelo carinho, pelo amor, pela amizade e pela ajuda incondicional.

À minha filha Débora,
uma das mais felizes motivações da minha vida.

Aos meus pais Paulo Afonso Fontes e Margarida Teixeira Fontes,
pelo amor, pelo apoio, pela compreensão e pelo exemplo que sempre tenho
recebido.

À minha irmã Patrícia,
pela amizade e pelo carinho.

“Deus não escolhe os capacitados, mas capacita os escolhidos.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa e aos Departamentos de Tecnologia de Alimentos (DTA) e Nutrição e Saúde (DNS), pela acolhida e pela oportunidade de aprimoramento.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro para a condução do trabalho.

Ao professor Lúcio Alberto de Miranda Gomide, pela orientação, pelo apoio, pela inestimável amizade, pela confiança, pela dedicação e pela contribuição na redação final, imprescindíveis neste trabalho.

À Professora Neuza Maria Brunoro Costa, pela valiosa co-orientação, pela dedicação e atenção durante os experimentos, pelo estímulo e pelas constantes e enriquecedoras contribuições ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Luiz Alexandre Peternelli, Cristina Maria Ganns Chaves Dias, Nilda de Fátima Ferreira Soares e José Benício Paes Chaves, pelo auxílio, pelas valiosas sugestões e pelas informações técnicas sempre oportunas.

À Professora Edimar Aparecida Filomeno Fontes, pelas análises estatísticas e pela contribuição na discussão dos resultados.

À professora Maria Cristina Bressan, pela disponibilidade de participação na defesa e pelas sugestões oportunas.

Ao frigorífico Novo Suíno, pela concessão da matéria-prima para a realização deste projeto.

Aos meus amigos Eduardo, Alcinéia, Marquinhos, Nathália, Socorro, Márcio, Rodrigo, Marlene, Mirim e Fred, pelas orações, pela amizade e pela vida partilhada.

Ao Cassiano e Lucía, pela ajuda, pelos conselhos e pelos bons momentos que compartilhamos juntos.

A todos os amigos e colegas de curso, pela amizade, pelo companheirismo e pela vida partilhada.

Aos estudantes de Nutrição, Marília, Cássia, Clair, Fábria, Karina, Alda e Geruza, pelo auxílio na realização deste trabalho.

Aos alunos das disciplinas NUT 621/2005, pela contribuição nos experimentos.

A todos os funcionários do DNS e do DTA, em especial: Cassiano, Adão e Wandick, pela companhia e pelo auxílio fundamental na condução desta pesquisa.

Aos funcionários Carlinhos e Cláudio do Departamento de Solos, pela contribuição nas leituras de ferro das amostras.

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

BIOGRAFIA

PAULO ROGÉRIO FONTES, filho de Paulo Afonso Fontes e Margarida Teixeira Fontes, nasceu em Viçosa, Estado de Minas Gerais, em 11 de abril de 1971.

Em fevereiro de 1990, ingressou na Universidade Federal de Viçosa – UFV, onde, em fevereiro de 1995, graduou-se em Engenharia de Alimentos.

Em março de 1995, iniciou o Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se aos exames finais de defesa de tese em maio de 1999.

Em abril de 2001, iniciou o programa de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na mesma Instituição, submetendo-se aos exames finais de defesa de tese em março de 2006.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Composição do sangue.....	5
2.2. Disponibilidade e aproveitamento do sangue.....	7
2.3. Utilização do sangue em alimentos.....	10
2.4. Valor nutricional das proteínas do sangue.....	13
2.5. Ferro e sua importância biológica.....	17
2.6. Biodisponibilidade de ferro.....	23
2.6.1. Fatores que afetam a biodisponibilidade do ferro.....	27
2.6.1.1. Fatores fisiológicos.....	28
2.6.1.2. Fatores químicos e dietéticos.....	30
2.6.2. Ferro e carne.....	35
2.6.2.1. O "fator carne" e a biodisponibilidade de ferro.....	37
2.7. Sangue animal como fonte potencial de ferro.....	40
2.8. Utilização do monóxido de carbono em carnes e produtos	

cárneos.....	44
2.8.1. Efeito sobre a cor.....	44
2.8.2. Aspectos toxicológicos.....	47
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.1. Obtenção e tratamento do sangue.....	50
3.2. Formulação e processamento das mortadelas.....	51
3.3. Procedimentos analíticos.....	53
3.3.1. Proteínas totais.....	53
3.3.2. Lipídios totais.....	54
3.3.3. Umidade.....	54
3.3.4. Cinzas.....	54
3.3.5. Carboidratos.....	54
3.3.6. Determinação de ferro.....	54
3.3.7. Composição em aminoácidos.....	55
3.3.8. Escore Químico (EQ).....	56
3.4. Avaliação da qualidade protéica da mortadela.....	56
3.4.1. Preparo das dietas.....	56
3.4.2. Ensaio biológico.....	58
3.4.3. Escore químico corrigido pela digestibilidade <i>in vivo</i> (PDCAAS).....	60
3.5. Avaliação dos animais.....	61
3.5.1. Dosagem dos parâmetros bioquímicos.....	61
3.5.2. Determinação dos níveis de hemoglobina.....	62
3.5.3. Análise anatomopatológica.....	62
3.6. Determinação da carboxiemoglobina.....	63
3.6.1. Quantificação da carboxiemoglobina.....	64
3.7. Biodisponibilidade de ferro em mortadelas.....	64
3.7.1. Preparo das dietas.....	65
3.7.2. Ensaio biológico.....	68
3.7.2.1. Fase de depleção.....	68
3.7.2.2. Fase de repleção.....	69
3.7.2.3. Eficiência na recuperação de hemoglobina (HRE).....	70
3.8. Biodisponibilidade de ferro em mortadela com e sem nitrito.....	70
3.9. Análise estatística.....	71
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4.1. Teores de proteínas, lipídios e ferro nas mortadelas.....	73
4.2. Composição de aminoácidos das mortadelas formuladas e PDCAAS.....	74
4.3. Avaliação da qualidade protéica.....	78
4.3.1. Consumo de dieta e ganho de peso dos animais experimentais.....	78
4.3.2. Valores de PER e NPR.....	81

4.3.3. Digestibilidade <i>in vivo</i>	84
4.4. Avaliação dos animais.....	87
4.4.1. Avaliação comportamental.....	87
4.4.2. Ganho de peso, consumo e coeficiente de eficiência alimentar.....	88
4.4.3. Dosagens bioquímicas.....	90
4.4.4. Determinação da hemoglobina.....	97
4.4.5. Exame anatomopatológico.....	98
4.5. Determinação da Carboxiemoglobina.....	101
4.6. Ensaio de biodisponibilidade de ferro.....	105
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	126
6. RECOMENDAÇÕES FUTURAS.....	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
APÊNDICE.....	157

LISTA DE QUADROS

	Página
1 Conteúdo de aminoácidos essenciais da carne, sangue integral, plasma e globina de bovinos (g/100g de proteína), comparado aos padrões recomendados pela FAO (1985).....	15
2 Requerimentos diários de ferro (mg/dia) de acordo com diferentes idades e sexo.....	21
3 Recomendações diárias de ferro (mg/dia), em função dos diferentes níveis de biodisponibilidade estimada de ferro da dieta, em várias categorias de acordo com a idade e o sexo.....	22
4 Conteúdo de ferro heme em relação a % de ferro total, em diferentes tipos de carnes.....	36

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Composição e teor de proteína das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico de avaliação da qualidade protéica das mortadelas (g/100g de mistura).....	57
2 Médias de peso dos animais distribuídos em blocos casualizados.....	58
3 Composição percentual da dieta basal oferecida aos ratos na fase de depleção.....	65
4 Composição das dietas experimentais oferecidas aos ratos na fase de repleção (g/kg de mistura).....	67
5 Composição das dietas experimentais oferecidas aos ratos na fase de repleção (g/kg de mistura) do segundo ensaio de biodisponibilidade.....	71
6 Composição de aminoácidos (mg/g de proteína) ^a das mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue e escore químico (%)......	75
7 Valores médios (e desvios-padrão) das variáveis ganho de peso (GP), consumo alimentar (CA), proteína consumida (PC) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais alimentados com dietas à base de mortadelas formuladas com sangue e sua comparação com os valores	

	da dieta à base de caseína, após 14 dias de experimento....	79
8	Valores médios (e desvios-padrão) referentes ao PER, PERR, NPR e NPRR das dietas à base de mortadelas formuladas com sangue tratado com monóxido de carbono e sua comparação com a dieta à base de caseína.....	81
9	Valores médios (e desvios-padrão) referentes à digestibilidade e digestibilidade relativa das dietas à base de mortadelas formuladas com sangue tratado com monóxido de carbono e sua comparação com a dieta à base de caseína.....	85
10	Valores médios (e desvios-padrão) das variáveis ganho de peso (GP), consumo alimentar (CA) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais alimentados com dietas à base de mortadelas formuladas com sangue e sua comparação com os valores da dieta à base de caseína, após 28 dias de experimento.....	88
11	Valores médios (e desvios-padrão) dos níveis sanguíneos de colesterol, triacilglicerol, glicose, creatinina, bilirrubina, albumina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em ratos alimentados com dietas à base de mortadelas formuladas com sangue e sua comparação com os valores da dieta à base de caseína, após 28 dias de experimento.....	92
12	Valores médios (e desvios-padrão) dos níveis sanguíneos de hemoglobina em ratos alimentados com dietas à base de mortadelas formuladas com sangue e sua comparação com os valores da dieta à base de caseína, após 28 dias de experimento.....	97
13	Valores médios (e desvios-padrão) referentes aos pesos de fígado e de rim direito, porcentagens de fígado e de rim direito, em relação ao peso corporal de ratos, que receberam dietas à base de mortadelas formuladas com sangue tratado com CO e sua comparação com os valores da dieta à base de caseína, após 28 dias de experimento....	99
14	Composição centesimal e teor de ferro das mortadelas após secagem.....	105
15	Equações ajustadas aos dados de ganho de hemoglobina	

	das dietas experimentais avaliadas, em função dos níveis de ferro testados.....	107
16	Valores médios (e desvios-padrão) do ganho de hemoglobina e do valor de hematócrito dos ratos alimentados com dietas contendo sulfato ferroso (padrão) e mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue com 6, 12 e 24 mg de ferro/kg de dieta.....	108
17	Valores médios (e desvios-padrão) da eficiência na recuperação de hemoglobina (HRE) e de HRE (% do controle) dos ratos anêmicos para os níveis de ferro determinados nas dietas experimentais.....	109
18	Valores médios (e desvios-padrão) do ganho de hemoglobina e do valor de hematócrito dos ratos alimentados com dietas contendo sulfato ferroso (padrão) e mortadela adicionada ou não de nitrito com 6, 12 e 24 mg de ferro/kg de dieta.....	118
1A	Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais da composição centesimal das mortadelas adicionadas de diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono.....	158
2A	Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais do teor de ferro das mortadelas adicionadas de diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono.....	158
3A	Resumo da análise de variância das variáveis ganho de peso, consumo alimentar, proteína consumida e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais alimentados com dietas contendo caseína e mortadelas com sangue tratado com monóxido de carbono durante o ensaio de qualidade protéica.....	159
4A	Resumo da análise de variância do PER, NPR, digestibilidade (DIG), PERR, NPRR e digestibilidade relativa (DIGR) das dietas de caseína e de mortadelas com sangue tratado com monóxido de carbono.....	159
5A	Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais do ganho de peso, consumo alimentar, proteína consumida e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais alimentados com dietas contendo mortadelas	

	com sangue tratado com monóxido de carbono durante o ensaio de qualidade protéica.....	159
6A	Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais do PER, NPR, digestibilidade (DIG), PERR, NPRR e digestibilidade relativa (DIGR) das mortadelas com sangue tratado com monóxido de carbono.....	160
7A	Resumo da análise de variância das variáveis ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais alimentados com dietas contendo caseína e mortadelas com sangue tratado com monóxido de carbono após 28 dias de ensaio.....	160
8A	Resumo da análise de variância das variáveis Colesterol, glicose, triacilglicerol, AST, ALT, Albumina, bilirrubina, creatinina e hemoglobina de ratos submetidos a dietas de caseína e de mortadelas com diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono após 28 dias de ensaio..	161
9A	Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais das variáveis colesterol, glicose, triacilglicerol, AST, ALT, albumina, bilirrubina, creatinina e hemoglobina de ratos submetidos a dietas de mortadelas com diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono após 28 dias de ensaio.....	161
10A	Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais das variáveis ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) de ratos submetidos a dietas de mortadelas com diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono após 28 dias de ensaio.....	162
11A	Resumo da análise de variância das variáveis peso do fígado, % fígado, peso do rim direito (g) e % rim direito de ratos submetidos a dietas de caseína e de mortadelas com diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono após 28 dias de ensaio.....	162
12A	Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais das variáveis peso do fígado, % fígado, peso do rim direito (g) e % rim direito de ratos submetidos a dietas de mortadelas com diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono após 28 dias de ensaio..	163

13A	Resumo da análise de variância das variáveis ganho de peso, consumo alimentar e teor de carboxiemoglobina (COHb) dos animais alimentados com dietas contendo mortadelas com sangue tratado com monóxido de carbono após 14 dias de ensaio.....	163
14A	Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais das variáveis ganho de peso, consumo alimentar e teor de carboxiemoglobina (COHb) de ratos submetidos a dietas de mortadelas com diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono após 14 dias de ensaio.....	163
15A	Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais para o ganho de peso, em função de diferentes níveis de ferro nas dietas experimentais.....	164
16A	Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais para o consumo alimentar, em função de diferentes níveis de ferro nas dietas experimentais.....	165
17A	Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais para coeficiente de eficiência alimentar, em função de diferentes níveis de ferro nas dietas experimentais.....	165
18A	Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais para o ganho de hemoglobina, em função de diferentes níveis de ferro nas dietas experimentais.....	166
19A	Resumo da análise de variância para o valor de hematócrito, em função de diferentes níveis de ferro nas dietas experimentais.....	166
20A	Resumo da análise de variância para a eficiência na recuperação de hemoglobina (HRE%) e HRE (% do controle) dos ratos anêmicos para os níveis de ferro determinados nas dietas experimentais.....	166
21A	Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais para o ganho de hemoglobina, em função de diferentes níveis de ferro nas dietas experimentais.....	167
22A	Resumo da análise de variância para o valor de hematócrito, em função de diferentes níveis de ferro nas dietas experimentais.....	167

23A	Valores médios (e desvios-padrão) dos níveis sanguíneos de carboxiemoglobina (COHb) dos animais alimentados com dietas à base de mortadelas formuladas com sangue tratado com monóxido de carbono.....	167
24A	Resumo da análise de variância para os coeficientes de inclinação das curvas de regressão (ganho de Hb/mg de ferro), em função de diferentes níveis de ferro nas dietas experimentais.....	168

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Distribuição de ferro e a relação entre os compartimentos no organismo.....	19
2 Mecanismos de absorção do ferro não-heme (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) e do ferro heme (1h, 2h, 3h, 4h, 5, 6, 7, 8, 9, 10) compreendendo a captação do ferro pelo lúmen intestinal, trânsito pela célula e liberação da célula para a circulação.....	25
3 Variação das médias do teor de ferro da mortadela adicionada de sangue.....	74
4 Escore do aminoácido limitante primário (EALP) e escore de aminoácido corrigido pela digestibilidade <i>in vivo</i> (PDCAAS) das mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue.....	78
5 Variação das médias do coeficiente de eficiência protéica (PER) das mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue tratado com monóxido de carbono.....	83
6 Variação das médias da razão protéica líquida (NPR) das mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue tratado com monóxido de carbono.....	84

7	Variação das médias da digestibilidade das mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue tratado com monóxido de carbono.....	87
8	Variação das médias de ganho de peso de ratos alimentados com mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.....	89
9	Variação das médias de consumo alimentar de ratos alimentados de mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.....	90
10	Variação das médias de glicose de ratos alimentados com mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.....	94
11	Variação das médias de aspartato aminotransferase (AST) de ratos alimentados com mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.....	95
12	Variação das médias de creatinina de ratos alimentados com mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.....	95
13	Variação das médias de alanina aminotransferase (ALT) de ratos alimentados com mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.....	96
14	Variação das médias de peso do fígado de ratos alimentados com mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.....	100
15	Variação das médias de porcentagem de fígado de ratos alimentados com mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.....	100
16	Ganho de peso (a) e consumo alimentar (b) dos ratos durante o experimento.....	102
17	Variação das médias de ganho de peso de ratos alimentados com mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.....	102
18	Variação do ganho de hemoglobina em relação aos níveis de ferro nas dietas experimentais (mortadelas) e na dieta-padrão de sulfato ferroso.....	107

RESUMO

FONTES, Paulo Rogério, D.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2006.
Valor protéico, biodisponibilidade de ferro e aspectos toxicológicos de mortadelas formuladas com sangue tratado com monóxido de carbono. Orientador: Lúcio Alberto de Miranda Gomide. Conselheiros: Neuza Maria Brunoro Costa e Luiz Alexandre Peternelli.

Visando o aproveitamento do sangue animal para consumo humano, estudou-se o efeito da substituição, em níveis de 0, 5, 10, 15 e 20% de carne por sangue líquido tratado com monóxido de carbono (CO) sobre a qualidade protéica, biodisponibilidade de ferro, os teores de proteínas, lipídios e ferro. Também se estudou os parâmetros bioquímicos séricos, hematológicos e histológicos de ratos alimentados com dietas à base de mortadelas para se avaliar o potencial toxicológico da ingestão de produtos cárneos formulados com sangue tratado com CO, uma vez que esta informação não está disponível na literatura. Os valores de lipídios e proteínas das mortadelas com diferentes níveis de adição de sangue não diferiram ($P > 0,05$) entre si. O aminograma das mortadelas mostrou que todas apresentaram escore químico maior que 100%, indicando ausência

de aminoácidos limitantes. Os resultados do PDCAAS não indicaram diferença entre as mortadelas. A qualidade protéica foi avaliada por ensaios biológicos em ratos pela determinação do Coeficiente de Eficiência Protéica (PER), da Razão Protéica Líquida (NPR) e da digestibilidade verdadeira. Os valores de PER, PER Relativo, NPR e NPR Relativo das dietas à base de mortadelas não diferiram ($P>0,05$) daqueles obtidos para a dieta à base de caseína. Entre as mortadelas, aquela formulada com nível de 15% de sangue apresentou valores de PER, PERR, NPR e NPRR superiores ($P<0,05$) aos dos demais níveis testados. A digestibilidade verdadeira da dieta de caseína (93,99%) foi superior ($P<0,05$) à das dietas de mortadelas. Entre as mortadelas, o aumento na adição de sangue promoveu redução ($P<0,05$) da digestibilidade, que, ainda assim, se manteve acima de 90%. Verificou-se que não houve alteração nos níveis séricos de albumina, bilirrubina, creatinina e triacilglicerol, glicose e alanina aminotransferase (ALT) quando comparados com a dieta à base de caseína. Em relação ao colesterol, a dieta de caseína alcançou valor inferior ($P<0,05$) ao das dietas de mortadelas formuladas com 10 e 20% de sangue. Já para aspartato aminotransferase (AST), a dieta de caseína apresentou um nível superior ($P<0,05$) ao das dietas de mortadelas formuladas com 0, 15 e 20% de sangue. Apesar dos testes estatísticos terem evidenciado efeito da substituição de carne por sangue sobre os níveis de glicose, creatinina, AST e ALT, entre os níveis testados, os valores de todos os tratamentos estavam dentro da faixa de normalidade. Quanto à hemoglobina, os ratos que consumiram dietas à base de mortadela não apresentaram diferença ($P>0,05$) em relação àqueles submetidos à dieta de caseína. Também não houve diferença ($P>0,05$) entre os níveis de sangue quanto ao teor de hemoglobina. Os exames macro e microscópico dos animais não mostraram alteração anatomopatológica que pudesse ser atribuída ao efeito do CO sobre órgãos e tecidos analisados. O ensaio para o estudo do efeito do CO sobre dosagem sanguínea de carboxiemoglobina (COHb)

mostrou que as concentrações não variaram ($P>0,05$) em função dos níveis de sangue adicionados na mortadela. O aumento na adição de sangue promoveu elevação ($P<0,05$) do teor de ferro das mortadelas. Entretanto, ao se considerar todos os níveis de repleção (6, 12 e 24 mg de Fe/kg de dieta), a biodisponibilidade de ferro, avaliada por meio da recuperação dos níveis de hemoglobina em ratos anêmicos, indicou que as dietas de mortadelas apresentaram eficiência semelhante ($P>0,05$) na recuperação de hemoglobina e comparável à da dieta-padrão de sulfato ferroso. Porém, ao se considerar apenas o nível de repleção de 24 ppm de ferro na dieta, observou-se uma tendência de aumento na biodisponibilidade de ferro com a elevação no nível de utilização de sangue nas mortadelas. Neste nível de repleção (24 ppm) apenas a dieta de mortadela formulada com 20% de substituição de carne por sangue apresentou ganho de hemoglobina similar ao da dieta controle de sulfato ferroso. No período de 14 dias do experimento, observou-se incremento no ganho de hemoglobina proporcional à adição de ferro na dieta, demonstrando que grande parte do ferro fornecido pelas mortadelas foi absorvida, embora nenhuma das fontes (inclusive sulfato ferroso) fosse capaz de restituir os níveis de hemoglobina em ratos, mesmo quando foram fornecidas 24 mg de Fe/kg de dieta. Em resumo, as mortadelas, independente dos níveis de sangue adicionados, apresentaram proteína de alta digestibilidade e valor nutricional, além de ferro de boa biodisponibilidade. Diante dos parâmetros avaliados, pode-se concluir que a presença do CO nos embutidos não é tóxica, como sugerido pelos parâmetros bioquímicos, especialmente os níveis de COHb no sangue dos ratos. Assim, sangue tratado com CO pode ser empregado, em substituição à carne, em produtos cárneos em níveis de até 20%.

ABSTRACT

FONTES, Paulo Rogério, D.S., Universidade Federal de Viçosa, March, 2006.
Protein nutritive value, iron bioavailability and toxicological aspects of mortadela formulated with blood treated with carbon monoxide. Adviser: Lúcio Alberto de Miranda Gomide. Committee Members: Neuza Maria Brunoro Costa and Luiz Alexandre Peternelli.

Aiming a greater animal blood use for human consumption, the effect of substituting beef for carbon monoxide treated pork blood at levels of 0, 5, 10, 15 and 20% in mortadela's formulation was evaluated in Wistar rats fed mortadela based diets for protein quality, iron bioavailability, protein, fat and iron concentration. Blood serum biochemical parameters, hematological and histological parameters were also evaluated in order to establish the toxicological potential of ingesting meat products formulated with the addition of carbon monoxide treated blood, an information not available in the literature. Mortadela's fat and protein levels were not affected ($P>0.05$) by blood substitution level while its iron level increased ($P<0.05$) with increasing blood level of addition. The aminograms showed that all the formulated mortadelas had chemical score above 100% indicating absence of limiting aminoacids. PDCAAS results did not show differences among the various mortadelas. Protein

quality was evaluated by biological assays with Wistar rats as Protein Efficiency Ratio (PER), Net Protein Ratio (NPR) and true digestibility. PER, PERR, NPR and NPRR did not differ ($P>0.05$) from those of casein based control diet. Among the mortadelas those formulated with 15% of beef replacement for blood presented higher ($P<0.05$) PER, PERR, NPR and NPRR values than the other levels. Casein diet had higher ($P<0.05$) true digestibility (93.99%) than all the mortadela containing diets. Among the mortadela containing diets an increase in beef replacement lead to a decrease ($P<0.05$) in digestibility which, even so, was held above 90%. Compared to the casein based diet, the administration of mortadela based diets did not produce ($P>0.05$) alterations on blood serum levels of albumin, bilirubin, creatinine and triglycerides, glucose and GTP (Glutamic Pyruvic Transaminase). For serum cholesterol levels, casein based diets presented lower ($P<0.05$) levels only than that of mortadela based diets containing 10% and 20% replacement of beef for blood. As for GOT (Glutamic Oxalacetic Transaminase), casein based diets presented lower ($P<0.05$) levels than that of mortadela based diets containing 0%, 15% and 20% replacement of beef with blood. Despite statistical evidence of effect of beef replacement level on glucose, creatinine, GTP and GOT levels the values of all of them were within the normal range. Also, blood hemoglobin content of rats consuming mortadela based diets did not differ ($P>0.05$) from that of rats on casein based diets. There was no effect, as well, of level of beef replacement with blood on rats blood hemoglobin content. Macro and microscopic exams did not evidence anatomic-pathological alterations that could be attributed to the CO effect over the analyzed organs and tissues. The assay relating the effect of carboxyhemoglobin ingestion on blood COHb level did not evidence differences ($P>0.05$) due to levels of beef replacement for CO treated blood in the mortadelas formulations. Increasing blood addition in the formulation lead ($P<0.05$) to an increase in mortadela's iron content. Even so, considering all the iron repletion levels (6, 12 and 24 mg Fe/kg of

diet), iron bioavailability, evaluated through hemoglobin recovery levels in anemic rats, indicated that mortadela based diets had a similar hemoglobin recovery efficiency that was comparable to that of the ferrous sulfate. However, considering only the 24 ppm iron repletion level there was ($P < 0.05$) a tendency of increasing iron bioavailability with increasing substitution of meat for blood in mortadela's formulation. In this repletion level (24 ppm) only mortadela diet formulated with 20% of meat substitution for blood revealed hemoglobin gain similar to that of the control ferrous sulfate diet. In the 14 days of the experiment there was an increase ($P < 0.05$) in blood hemoglobin gain with increasing diet iron content suggesting that a great proportion of the mortadela's iron was absorbed. Even so, none of the iron sources, including ferrous sulfate, was able to restore the normal hemoglobin levels of the rats, even when the diet contained 24 mg Fe/kg of diet. In conclusion, independent of the levels of beef replacement with blood, the mortadela's presented protein of high quality and digestibility as well as iron of good bioavailability. From the parameters evaluated it can be also be concluded that the presence of CO in sausages does not present toxicological hazard, since it did not alter the biochemical indexes, specially the blood COHb level, which is an indication of its safety when used in meat products. So, carbon monoxide treated blood may be used, as a replacement for meat, in meat sausages at levels up to 20%.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial e os altos custos de produção da agricultura convencional incentivaram, nas últimas décadas, as pesquisas sobre fontes alternativas de proteína.

Do processamento de carne resultam diversos subprodutos: sangue, vísceras e ossos, dentre outros. Uma tarefa muito importante da indústria de carne é, então, a máxima transformação desses subprodutos, dentre os quais se destaca o sangue, em produtos alimentícios, o que viria contribuir na suplementação do nível de proteínas e aumentar a eficiência dessa indústria.

O Brasil produz, anualmente, em seus abatedouros cerca de 655 milhões de litros de sangue (ANUALPEC, 2005), que até o momento é mal aproveitado, sendo usado, apenas em parte, em rações para animais e fertilizantes ou na elaboração de chouriços e molhos. A maior parte é lançada nos mananciais hídricos constituindo-se em significativa fonte poluidora (MOURE et al., 1998). Com conteúdo protéico elevado (18%), semelhante ao da carne, o sangue animal poderia ter um aproveitamento mais intensivo e racional no Brasil, como se faz em alguns países da Europa.

O ferro é outro componente importante no sangue, onde existe em concentração 10 vezes maior (0,30 mg/g) do que na carne (GORBATOV, 1988). Esse elevado teor de ferro heme presente no sangue, associado à sua excelente

biodisponibilidade quando comparado com o ferro não-heme, pode ajudar na prevenção de anemias com a inclusão do sangue na alimentação humana, visto que no Brasil a prevalência da anemia é de 20% em adolescentes, de 15 a 30% em gestantes e de até 50% em crianças de 6 a 60 meses (BRASIL, 2002).

No Brasil, onde a deficiência protéica e de ferro constitui sério problema de alimentação, é muito importante que se desenvolva uma tecnologia apropriada para o aproveitamento do sangue animal que permita à indústria incorporá-lo na alimentação humana. Além disso, as proteínas do sangue, particularmente as do plasma, apresentam elevado valor nutritivo e excelentes propriedades funcionais para serem usadas como ingredientes em um grande número de produtos cárneos.

Por outro lado, o sangue, quando não sofre aproveitamento para consumo humano ou animal, representa um importante fator de aumento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e de sólidos totais nos efluentes, gerando aumento de custos no tratamento de resíduos, além de determinar perda de eficiência do reator. Por outro lado, esses custos podem levar à tentação do seu descarte sem tratamento prévio, determinando o comprometimento dos mananciais de água, um recurso cada vez mais ameaçado e escasso. Assim, o uso racional e comercial de sangue é uma das medidas previstas na ferramenta Tecnologias Limpas, permitindo a queda da poluição industrial e, assim, possibilitando a certificação ISO 14.000 da empresa.

Segundo dados do ANUALPEC (2005), em 2004 o abate de bovinos e suínos no Brasil gerou cerca de 609.000 toneladas de sangue, correspondendo a cerca de 109.000 toneladas de proteína e 183 toneladas de ferro heme, não aproveitadas para a alimentação humana.

Apesar das potencialidades apresentadas, a pequena utilização de sangue para consumo humano tem como principal obstáculo a coloração escura dos produtos à base de sangue, ou aos quais este é adicionado. Tentativas para solucionar este inconveniente têm sido baseadas na adição das frações isoladas do sangue, plasma ou globina descolorida, nos produtos cárneos processados. No entanto, tais alternativas reduzem a utilização de parte da proteína disponível e diminui a biodisponibilidade do ferro heme, ou causam problemas sensoriais e

nutricionais. Além disso, a adição de sangue descolorido leva à geração de produtos cárneos pálidos, impedindo sua adição em níveis elevados.

Entretanto, estudos recentes em nossos laboratórios (FONTES et al., 2004; FONTES, 1999) mostraram que a saturação do sangue suíno integral com monóxido de carbono gera um produto de cor agradável e estável, com potencial para permitir tanto a produção de produtos estritamente à base de sangue, como também a incorporação de níveis mais elevados de sangue em produtos cárneos processados. A partir destes resultados, novos estudos do nosso grupo de pesquisa (PEREIRA, 2000) evidenciaram ser viável, do ponto de vista químico, a adição de sangue tratado com CO a produtos cárneos emulsionados. Um dos pontos positivos foi, sem dúvida, o aumento do teor de ferro conferido a esses produtos. Além disso, mortadelas formuladas com sangue tratado com CO apresentaram alterações de cor substancialmente inferiores às provocadas pela adição de sangue fresco (não-tratado). Assim, seus resultados sugerem que, em adições acima de 10% de sangue tratado, a viabilidade de comercialização das mortadelas necessitaria apenas de outra denominação para o produto formulado com sangue tratado com CO, o que seria completamente inviável em mortadelas formuladas com adição de 5% de sangue não-tratado.

Apesar das vantagens citadas, o sangue possui deficiência em metionina e, especialmente, em isoleucina (KNIPE, 1988; FAO, 1982). Isso determina a necessidade em realizar ensaios biológicos com ratos para a avaliação do crescimento ou da retenção de nitrogênio (balanço nitrogenado) a fim de determinar o efeito nutricional de embutidos cárneos (mortadelas) formulados pela substituição de carne por diferentes concentrações de sangue tratado com monóxido de carbono. Outrossim, sendo o sangue fonte de ferro de origem animal, espera-se que as mortadelas adicionadas de sangue apresentem ferro de elevada biodisponibilidade.

Embora o CO venha sendo utilizado em embalagens de carne com atmosfera modificada, para se evitar alterações de cor e, assim, aumentar sua vida-de-prateleira (VIANA et al., 2005; JOHN et al., 2005; KRAUSE et al., 2003; JAYASINGH et al., 2001; LUÑO et al., 2000; SØRHEIM et al., 1999;

1997), o uso de CO em carnes e produtos derivados levanta questões em relação à sua segurança toxicológica.

Até onde foi possível se verificar na literatura, estudos sobre a toxicidade do CO se baseiam somente na sua inalação ambiental, responsável por envenenamentos (NAS, 1977). Embora cálculos estequiométricos indiquem a baixa probabilidade de problemas para a saúde (SØRHEIM et al., 1999; 1997; EL-BADAWI et al., 1964), se o CO é usado com o propósito de ingrediente na formulação de embutidos, deve-se analisar a possibilidade de potenciais efeitos tóxicos resultantes da ingestão de tal produto, uma vez que a toxidez do sangue, ou mesmo de carnes, tratados com CO ainda não é conhecida.

Assim sendo, o presente trabalho foi realizado com os seguintes objetivos:

1. Produzir várias formulações de mortadelas com níveis crescentes (0, 5, 10, 15 e 20%) de substituição de carne por sangue líquido tratado com monóxido de carbono;
2. Avaliar a composição centesimal e o perfil de aminoácidos de mortadelas formuladas pela substituição, em 5 níveis, de carne por sangue tratado com monóxido de carbono;
3. Avaliar a qualidade protéica das mortadelas formuladas com os diferentes níveis de substituição de carne por sangue;
4. Avaliar a biodisponibilidade de ferro presente nas mortadelas adicionadas de sangue líquido tratado com CO;
5. Avaliar, pela dosagem de parâmetros bioquímicos séricos, hematológicos e exames anatomopatológicos em ratos, um possível efeito toxicológico da presença de CO em mortadelas formuladas pela substituição de carne por sangue saturado com CO.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Composição do sangue

O sangue é constituído de componentes celulares (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e de uma fase líquida, denominada plasma, que contém substâncias orgânicas e inorgânicas em solução. As proteínas mais abundantes no sangue são: hemoglobina nos eritrócitos e albumina no plasma (HALLIDAY, 1975). Por meio de fracionamento do sangue obtém-se em volume, cerca de 65 a 70% de plasma e 35 a 40% de massa celular (HALLIDAY, 1973).

As células sangüíneas no animal vivo desempenham funções específicas. Os eritrócitos são responsáveis pelo transporte de oxigênio aos tecidos, e os leucócitos fazem parte do mecanismo de defesa do organismo, protegendo os tecidos contra a invasão de bactérias e vírus. As plaquetas participam no mecanismo de coagulação do sangue; liberam enzimas que reagem com o fibrinogênio para formar a fibrina, quando o sangue é exteriorizado. A fibrina precipita sob a forma de uma fina rede que retém os elementos celulares, formando o coágulo. O líquido, de coloração clara, remanescente é o soro. Para preservar o sangue integral e impedir a sua coagulação, a fibrina pode ser removida mediante rápida agitação mecânica ou ser tratado com anticoagulante (PISKE, 1982).

DELANEY (1977) relatou que a composição química do sangue de bovinos e suínos é semelhante, variando, principalmente, de acordo com a idade, o sexo e a alimentação dos animais. Todos os componentes do sangue justificam e contribuem para as características nutricionais e funcionais do sangue também como alimento (PISKE, 1982).

O sangue suíno possui uma composição semelhante à carne e segundo GORBATOV (1988), contém cerca de 79% de água, 18,5% de proteína, 0,15% de gordura, 0,07% de carboidratos e 0,86% de minerais, em que se destaca o ferro (0,30 mg/g), com cerca de 10 vezes a concentração encontrada na carne.

O plasma contém albuminas (3,3%), globulinas (4,2%), fibrinogênio (0,4%) e lipoproteínas, totalizando em base líquida 7,9% de proteínas (HOWELL e LAWRIE, 1983).

A hemoglobina (Hb), pigmento vermelho presente nas hemácias, é a proteína mais abundante no sangue (150 g/L de sangue humano) e responsável pela sua cor vermelha intensa característica. A Hb contém quatro subunidades, cada uma delas contendo uma cadeia polipeptídica (globina) e quatro grupos prostéticos (heme), nos quais o átomo de ferro está no estado ferroso. A porção protéica, chamada de globina, consiste de duas cadeias α (141 resíduos em cada uma) e duas cadeias β (146 resíduos em cada uma), totalizando 574 resíduos para toda a molécula (STRYER, 1996; AUTIO et al., 1984; GIDDINGS, 1977; ORTEN e NEWHAUS, 1975; WEISSBLUTH, 1974). Cada uma das quatro cadeias tem estrutura terciária característica, na qual a cadeia está enovelada. Como na mioglobina, as cadeias α e β da Hb contêm vários segmentos em α -hélice separados um dos outros por curvaturas. As quatro cadeias polipeptídicas reúnem-se em um arranjo tetraédrico, formando a estrutura quaternária. A Hb tem um peso molecular quatro vezes maior que a mioglobina; ambas possuem caráter α -helicoidal acima de 70%; ambas têm segmentos em α -hélice de comprimento similar, e as curvaturas, ou voltas, têm ângulos quase iguais. A mioglobina tem uma única cadeia polipeptídica (globina) e um único grupo prostético (heme) (STRYER, 1996; LEHNINGER, 1982; WEISSBLUTH, 1974).

Na Hb, cada cadeia possui um grupo heme que consiste de um átomo central de ferro e um grande anel planar, o anel porfirínico, cuja estrutura é composta de quatro grupos pirrólicos ligados entre si por pontes de metileno. A porfirina encontrada na Hb é, normalmente, conhecida como protoporfirina IX, característica dada pelas cadeias laterais (quatro grupos metil, dois vinil e dois propil em posições fixas) ligadas ao anel pirrólico. O átomo de ferro possui seis valências de coordenação e pode ser encontrado nos estados de oxidação Fe^{+2} e Fe^{+3} , sendo protegido no centro do anel por meio de quatro ligações covalentes com átomos de nitrogênio de cada grupo pirrólico e uma ligação com o nitrogênio da histidina proximal F8 da cadeia da globina. A outra valência perpendicular (6ª ligação) é livre e serve como sítio de ligação para vários átomos ou moléculas (STRYER, 1996; ORTEN e NEWHAUS, 1975; WEISSBLUTH, 1974; FANELLI et al., 1964), permitindo a geração de derivados da Hb de colorações e estabilidades diversas e que respondem pelas trocas gasosas e pelo transporte de gases no organismo.

2.2. Disponibilidade e aproveitamento do sangue

De acordo com GORBATOV (1988), a FAO estima que o déficit mundial de proteína animal é cerca de 70% da produção corrente ou cinco milhões de toneladas por ano, assumindo que a necessidade diária de ingestão é de 90 g “per capita”, das quais 50,6 g devem ser proteína animal.

A economia das indústrias de carnes exige o aproveitamento dos subprodutos para poder competir com outras fontes protéicas de origem vegetal. Se os subprodutos do abate de animais não forem utilizados, além de se perder um valioso potencial alimentar, elevam-se consideravelmente os custos adicionais na eliminação dos resíduos para se evitar a poluição ambiental. Atualmente, os animais vivos podem chegar a custar mais que sua carne, portanto, são os subprodutos que têm que pagar os gastos de transformação e gerar os benefícios nos abatedouros. Em abatedouros de pequeno porte, o sangue, usualmente, não é aproveitado, sendo

descartado nos mananciais hídricos, o que acarreta riscos de contaminação e eleva a concentração de sólidos suspensos em três vezes (OCKERMAN e HANSEN, 1994).

O aproveitamento do sangue nos abatedouros poderia representar um aumento no rendimento (6 a 7% em termos de proteína) da carcaça de bovinos e suínos, além de diminuir a poluição ambiental (WISMER-PEDERSEN, 1979). Nesse sentido, o sangue seria uma matéria-prima de excelente qualidade que poderia ser aproveitada. Porém, poucos estudos têm sido feitos para o seu uso na alimentação humana (MARQUEZ et al., 1997; NAKAMURA et al., 1984), ou seu aproveitamento em alimentos tem sido negligenciado (WISMER-PEDERSEN, 1979).

MOURE et al. (1998) relataram a grande quantidade e o alto poder contaminante (DQO de 500.000 mg/L) desse resíduo gerado nos matadouros, bem como o custo elevado para purificação e os inúmeros problemas de sobrecarga nas estações depuradoras.

Apesar de seu baixo custo, estimado em U\$0,19 por litro, apenas alguns países aproveitam volume considerável de sangue com finalidades alimentícias (WISMER-PEDERSEN, 1979). Dentre estes, cita-se os países da ex-URSS, que fazem uso de quantidades expressivas (80.000 toneladas/ano) na elaboração de alimentos, como embutidos cozidos de sangue, patês e produtos cárneos enlatados (DILL e LANDMAN, 1988; DILL, 1976). Em alguns países europeus o sangue tem sido tradicionalmente usado no preparo de produtos típicos. É o caso da Suécia, onde 80% do sangue é destinado, direta ou indiretamente, à alimentação humana (PISKE, 1982). A Indonésia utiliza somente 1.000 toneladas, ou seja, cerca de 25% do sangue coletado (FAO, 1982). Segundo MARQUEZ et al. (1997), na Venezuela, somente pequena quantidade de sangue proveniente dos abates é usada para alimentação humana, e de forma empírica. WANG e LIN (1994) relataram que o sangue de porco coagulado, feito a partir de uma mistura de sangue fresco de porco e água, e coagulada pelo calor, é um dos mais populares alimentos consumidos em Taiwan.

No Brasil, o aproveitamento do sangue como alimento é mínimo, sendo feito em pequena escala, em nível rural, para consumo próprio, como a elaboração de chouriços e molhos. Segundo dados do ANUALPEC (2005), em 2004 o Brasil abateu 47 milhões de bovinos e cerca de 31 milhões de suínos, dos quais poderiam ser obtidas cerca de 609.000 toneladas de sangue, considerando-se o fato de que se podem obter de 10 a 12 litros de sangue a partir de bovinos e de 2,5 a 3 litros a partir de suínos (OCKERMAN e HANSEN, 1994; KNIPE, 1988; WISMER-PEDERSEN, 1979). Levando em consideração que a partir de 100 kg de sangue obtém-se entre 60 e 70 kg de plasma, com 7 a 8% de proteína, e 30 a 40% de eritrócitos, com 30 a 40% de proteína (YANG e LIN, 1996; GORBATOV, 1988; WISMER-PEDERSEN, 1979), isso representaria mais de 99.000 toneladas de proteína concentrada. Este número poderia ser substancialmente aumentado caso se considere que cerca de 50% dos abates bovinos efetuados no país são clandestinos (SOUZA, 1992).

Outro componente muito importante do sangue integral é o ferro, que poderia ser usado com o intuito de ajudar na prevenção da deficiência nutricional provocada por esse mineral (TSENG et al., 1997; TORRES et al., 1997; FERREIRA et al., 1994; ANSEJO et al., 1985).

Além disso, as proteínas do sangue apresentam, do ponto de vista funcional, excelentes propriedades, como capacidade emulsificante, de formação de espuma, de retenção de água e de gelatinização, que permite a sua incorporação em produtos cárneos, massas e panificação (RAEKER e JOHNSON, 1995; HAAST et al., 1987; SHAHIDI et al., 1984; NAKAMURA et al., 1984; WISMER-PEDERSEN, 1979; DELANEY, 1977; DILL, 1976; TYBOR et al., 1975).

Em animais sadios, o sangue, dentro do corpo, é um fluido estéril. A utilização do sangue para fins alimentícios exige precauções durante a coleta e processamento para que se garanta baixos níveis de contaminação microbológica (OCKERMAN e HANSEN, 1994; STIEBING, 1990; KNIPE, 1988; GILL, 1988; DILL, 1976). Uma coleta higiênica pode ser feita por sistemas fechados e com

utilização de facas especiais de sangria, denominadas facas "vampiro" (STIEBING, 1990).

De acordo com STIEBING (1990) e GORDON (1971), o sangue pode ser armazenado por 3 a 4 dias à temperatura de 3 a 4°C, mas, para fins alimentícios, seu processamento deve ocorrer imediatamente após a coleta.

Segundo KNIPE (1988), quando assepticamente coletado, os sangues bovino e suíno líquidos apresentam, respectivamente, contagens de 200 a 300 e 2.000 a 3.000 UFC/mL.

2.3. Utilização do sangue em alimentos

Muitos estudos têm sido realizados visando a utilização do sangue animal, integral ou fracionado na alimentação humana. Ainda em 1968, o “Commonwealth Scientific & Industrial Research Organization”, da Austrália, desenvolvia processos para obtenção de globina a partir da hemoglobina da massa celular (VICKERY, 1968). Nos Estados Unidos, a Universidade do Texas A & M iniciou, a partir de 1971, investigações sobre o aproveitamento do sangue bovino (TYBOR et al., 1975). Em 1972 um projeto foi implantado no “Moorepark Research Center”, Irlanda, com o principal objetivo de se preparar produtos de alto valor protéico para consumo humano, utilizando o sangue animal (DELANEY et al., 1975).

Em alguns tipos de embutidos, o principal ingrediente é o sangue integral. Neste caso, o sangue é coletado e adicionado de um anticoagulante ou mantido sob agitação durante o resfriamento. Imediatamente após a coleta o sangue é adicionado de nitrito (156 a 200 ppm) e, ocasionalmente, adiciona-se 1,5 a 2,0% de sal, com o objetivo de garantir certa estabilidade microbiológica. Dependendo do tipo de embutido a ser fabricado, acrescentam-se outros ingredientes à formulação, com utilização de sangue variando de 10 a 40% (RUST, 1988).

No entanto, o principal uso do sangue integral, devido à sua cor, está restrito a produtos cuja cor escura é tradicional, como embutidos, sopas, pães e biscoitos de sangue. A demanda para esse tipo de produto, contudo, é extremamente

limitada, e somente porcentagem muito pequena de sangue pode ser aproveitada (OCKERMAN e HANSEN, 1994).

De acordo com WISMER-PEDERSEN (1979), a utilização do sangue em quantidades relativamente grandes na indústria somente acontecerá quando as propriedades sensoriais dos produtos finais permanecerem inalteradas. Porém, um dos principais problemas encontrados no aproveitamento do sangue integral na indústria alimentícia, em especial na indústria de produtos cárneos, está relacionado com a cor marrom escura apresentada pelos produtos elaborados (TORRES et al., 1997; YANG e LIN, 1996; STIEBING, 1990; KNIPE, 1988; MIELNIK e SLINDE, 1983; CALDIRONI e OCKERMAN, 1982), devido à grande quantidade do pigmento hemoglobina presente no sangue.

Segundo FERREIRA et al. (1994), a adição de sangue em produtos cárneos resulta no escurecimento da cor do produto, até mesmo quando curado com nitrito de sódio ou adicionado em emulsões. Assim, as quantidades adicionadas devem ser controladas de modo a não prejudicar a aceitabilidade do produto final com respeito a cor e sabor.

STIEBING (1990) verificou que o valor máximo para adição de sangue que não afeta negativamente a cor de embutidos de sangue é de 10%. O mesmo resultado em embutidos emulsionados foi relatado por WISMER-PEDERSEN (1979).

SLINDE e MARTENS (1982) relataram que a impressão sensorial de cor começa a ficar prejudicada com níveis de adição de sangue acima de 3,5%. RUST (1988) afirmou que a incorporação de sangue em embutidos cárneos, em níveis superiores a 3%, produz tonalidade escura indesejável, em oposição à cor rósea ou vermelha desejável.

Em muitos países, é comum adicionar sangue integral em salsichas tipo Frankfurter para intensificar a cor do produto, visando reduzir os teores de nitrato e nitrito (MUSCLE..., 1986).

MITEVA et al. (1986), estudando a utilização de pequenas quantidades (0,2%) de sangue desidratado por atomização em produtos cárneos cozidos e

defumados, concluíram que a utilização do sangue, obtido por desfibrinação e atomização, não foi prejudicial à cor dos produtos elaborados.

Na tentativa de contornar os problemas de cor, têm sido adotadas diversas medidas, nem sempre totalmente satisfatórias. Dentre elas, a mais utilizada é a incorporação de uma das frações do sangue, ou elas todas, em forma separada e em quantidades diferentes para uso em alimentos para o consumo humano (HAAST et al., 1987; CALDIRONI e OCKERMAN, 1982; DELANEY, 1977).

A incorporação do plasma líquido ou concentrado e desidratado (TYBOR et al., 1975) a produtos alimentícios tem sido a mais utilizada, por não envolver problemas de cor aos produtos. Contudo, a utilização do plasma resulta no aproveitamento de apenas cerca de 30% das proteínas do sangue, não permitindo custo competitivo com outras proteínas, como as do leite e da soja, usadas nas formulações de embutidos, além de não incorporar ferro à dieta, fundamental para o combate de anemias (OCKERMAN e HANSEN, 1994; WISMER-PEDERSEN, 1979). Além disso, CALDIRONI e OCKERMAN (1982) mostraram que a adição de mais de 12% de plasma sangüíneo em embutidos cárneos leva à geração de produtos de cor pálida.

Segundo PISKE (1982), outras alternativas para aproveitamento mais amplo da fração vermelha, como também do sangue integral, estão surgindo mediante o desenvolvimento de técnicas diversas de clarificação ou descoloração, bem como a obtenção de produtos protéicos estáveis de boa aplicação. Essas técnicas, atualmente, ainda não estão totalmente exploradas, e os produtos obtidos não estão suficientemente caracterizados.

Outra maneira de se resolver o problema de cor é a adição de sangue e, ou, globina descoloridos através da eliminação do grupo heme da hemoglobina (TORRES et al., 1997; WISMER-PEDERSEN, 1979; TYBOR et al., 1975). Contudo, as técnicas de descoloração levam a uma diminuição no valor biológico e funcional das proteínas do sangue e conferem-lhe sabor desagradável (OCKERMAN e HANSEN, 1994; WISMER-PEDERSEN, 1979; GIDDINGS,

1977; TYBOR et al., 1973), além de diminuir a disponibilidade biológica do ferro.

Segundo WISMER-PEDERSEN (1988), os métodos de remoção com solventes orgânicos requerem consideráveis volumes de solvente, não menos que 50 litros para cada kg de globina produzido, e os resíduos são difíceis de serem removidos do produto final.

De acordo com OCKERMAN e HANSEN (1994), a remoção do grupo heme ou a descoloração diminuem a qualidade nutricional da proteína do sangue pela redução do seu valor biológico. A descoloração por hidrólise enzimática freqüentemente produz sabor amargo, que pode ser removido por tratamento com ácidos fortes como HCl e, posteriormente, com carbono ativado. Entretanto, o tratamento com ácido reduz a qualidade nutricional do sangue pela destruição do triptofano e produz alto conteúdo de cinzas no produto final (OCKERMAN e HANSEN, 1994).

2.4. Valor nutricional das proteínas do sangue

A função primordial de uma proteína alimentícia é fornecer os aminoácidos necessários para o anabolismo dos tecidos. Como é sabido, as proteínas orgânicas são objeto de uma incessante renovação (turnover) e, ou, catabolismo, liberando os aminoácidos que as constituem, de sorte que a reserva protéica de cada indivíduo está em constante renovação. Se os aminoácidos liberados com o catabolismo fossem integralmente reutilizados para a síntese protéica, o organismo não precisaria recorrer às proteínas exógenas (alimentares). Porém, sabe-se que sua reciclagem é parcial e que uma parte dos aminoácidos liberado pelo catabolismo é oxidado e excretado (GROFF et al., 1995).

A qualidade da proteína refere-se à sua capacidade de satisfazer os requerimentos nutricionais do homem por aminoácidos essenciais e nitrogênio não-essencial em quantidades e proporções adequadas. É necessário que os aminoácidos, particularmente os essenciais, estejam biodisponíveis, isto é, sejam

absorvidos em sua forma metabolicamente ativa, para desempenhar suas funções específicas nos vários tecidos e órgãos (SGARBIERI, 1996).

A qualidade das proteínas pode variar amplamente, e é afetada por diversos fatores. Por isso, é de suma importância a existência de métodos de avaliação, pois, dessa forma, pode-se estimar a quantidade do alimento a ser consumido, para que esse forneça proteína contendo aminoácidos essenciais em quantidades adequadas para o crescimento e manutenção corporais. Além disso, possibilita a avaliação de alterações da qualidade de determinada proteína quando do seu processamento e formas possíveis de minimizar essas alterações (DAMODARAN, 1996).

O valor nutritivo do sangue foi reconhecido por muito tempo em famílias residentes na zona rural de vários países europeus, onde o sangue tem sido usado como ingrediente em vários tipos de embutidos de sangue e chouriços, sopas de sangue, pães ou biscoitos (OCKERMAN e HANSEN, 1994; WISMER-PEDERSEN, 1979).

Nutricionalmente, o sangue possui quase todos os aminoácidos essenciais nos níveis recomendados pela FAO; é deficiente em metionina e, especialmente, em isoleucina (OCKERMAN e HANSEN, 1994; KNIPE, 1988; FAO, 1982; WISMER-PEDERSEN, 1979; SATTERLEE, 1975; YOUNG et al., 1973). Por serem ricas em lisina, leucina, valina, treonina, fenilalanina e triptofano, as proteínas do sangue complementam, do ponto de vista nutricional, as proteínas de cereais (SHAHIDI et al., 1984; TYBOR et al., 1975; DELANEY, 1975). O sangue concentrado e desidratado possui teores de proteína duas, três e sete vezes superiores ao leite em pó desnatado, leite em pó integral e soro de leite em pó, respectivamente (GORBATOV, 1988).

A composição em aminoácidos dos isolados protéicos de plasma e globina, avaliada por TYBOR et al. (1975), indicou que ambos os isolados são excelentes fontes de lisina e leucina. Os níveis de treonina, valina, fenilalanina e triptofano foram também superiores quando comparados ao padrão FAO/WHO (1965). Isoleucina e metionina foram limitantes para ambos os isolados.

No Quadro 1, encontra-se a composição comparativa, em aminoácidos essenciais, da carne, do sangue integral, do plasma e da globina de bovinos.

Segundo estudo apresentado por YOUNG et al. (1973), o plasma sangüíneo possui um coeficiente de eficiência protéica (PER) maior do que o da caseína. Nesse estudo, o PER da caseína foi de 1,94, ao passo que o plasma tinha um PER de 2,15. Entretanto, a adição de 1,2% de isoleucina à globina provocou aumento do PER de -1,05 para 2,88. Dados referentes ao valor protéico (PER) do sangue integral não estavam disponíveis na literatura consultada.

Quadro 1 - Conteúdo de aminoácidos essenciais da carne, sangue integral, plasma e globina de bovinos (g/100g de proteína), comparado aos padrões recomendados pela FAO (1985).

Aminoácidos essenciais	Carne bovina	Sangue bovino	Plasma bovino	Globina bovina	Exigências de aminoácidos essenciais para adultos (FAO)
	g/100g de proteína				
Isoleucina	5,1	0,4	3,4	0,3	4,2
Leucina	8,4	13,6	10,1	13,8	4,8
Lisina	8,4	9,4	8,3	10,5	4,2
Metionina	2,3	1,8	1,3	1,7	2,2
Fenilalanina	4,0	8,0	5,7	8,0	2,8
Treonina	4,0	4,7	7,1	4,1	2,8
Triptofano	1,1	1,4	1,7	2,0	1,4
Valina	5,7	8,0	7,4	9,6	4,2
Histidina	—	5,6	3,5	7,8	—

Fonte: OCKERMAN e HANSEN (1994) e FAO (1982).

Segundo DELANEY (1975), o plasma suíno contém quantidades adequadas de treonina, leucina, tirosina e lisina, e apresenta valores abaixo do padrão utilizado (albumina de ovo), para os aminoácidos valina, isoleucina, fenilalanina, triptofano e aminoácidos sulfurados. O escore químico foi de 49,0 sendo a isoleucina o primeiro aminoácido limitante. Comparando os valores de

utilização líquida da proteína (NPU) de ratos alimentados com dieta contendo plasma suíno e caseína, o autor encontrou valores médios de 65,8% e 72,1% para plasma e caseína, respectivamente.

BELKOT (2001) também avaliou o valor nutricional do sangue bovino. Os resultados indicaram, em ambas as frações do sangue, isoleucina como o aminoácido limitante. O PER do plasma (2,54) foi significativamente maior que o das células vermelhas (0,96) e foi equivalente ao da caseína (2,50).

As deficiências protéicas do sangue integral e da globina, em especial, podem ser minimizadas pela sua combinação com outras fontes protéicas, como soro desidratado de leite, cereais, caseinato etc. Algumas dessas combinações e seus efeitos são analisados nos parágrafos subseqüentes.

As proteínas de cereais possuem os aminoácidos lisina, triptofano e treonina como limitantes (GORBATOV, 1988). O sangue contém teor elevado de lisina e pode ser usado para aumentar o valor biológico desses cereais. Como os cereais são ricos em isoleucina, a deficiência do sangue em relação a esse aminoácido seria diminuída. De acordo com Nilsson (1975), citado por KNIPE (1988), a suplementação de formulações de pão, com 1,5% de hemoglobina, aumentou em 50% o valor biológico do pão.

OCKERMAN e HANSEN (1994) relataram que a incorporação de 2% de plasma sangüíneo ao pão aumenta o seu teor de proteína em 15% e o nível de lisina em 75%.

LANDMANN et al. (1980) mostraram que a combinação de globina com glúten de trigo e, ou, de glúten de milho produz aumentos no PER desses produtos de 0,40 e 0,53, respectivamente, para 1,50. Esses autores acrescentaram que as diferentes combinações percentuais da hemoglobina com esses dois cereais podem produzir mudança no aminoácido limitante.

O estudo apresentado por BATES et al. (1974) evidenciou claramente o melhoramento, do ponto de vista nutricional, obtido ao serem adicionadas diferentes proporções de sangue e soro de leite à formulação de pão. Nesse trabalho, a adição de sangue e soro foi testada nas proporções de 1:1, 3:1 e 1:3 (sangue:soro), além da

adição de cada um separadamente. O teor de proteínas aumentou de 11,6% no pão tradicional para 14,2; 17,6; e 12,6, respectivamente, e para 19,2 e 12,9% na adição de sangue e soro integral separadamente. Os valores de PER apresentados nesse mesmo estudo confirmaram o ganho nutricional da adição de sangue e soro. Em relação ao PER da caseína (2,50), o pão tradicional apresentou um PER de 0,83, ao passo que as formulações supracitadas apresentaram um PER de 1,82; 1,85; 1,38; 1,52; e 0,90, respectivamente.

O soro desidratado do leite contém 8,8 a 13,4% de proteína (SATTERLEE, 1975), com baixos teores de fenilalanina e tirosina. Os níveis desses aminoácidos podem ser aumentados através de combinações adequadas com o sangue. Reciprocamente, o soro pode contribuir para melhorar os níveis de isoleucina e metionina do sangue.

A composição porcentual de aminoácidos da mistura de 47% de proteínas do sangue e 53% de caseinato, apresentada por WISMER-PEDERSEN (1979), mostrou um escore químico de 94,0 em relação ao padrão FAO (1965), sendo a metionina o primeiro aminoácido limitante.

DA SILVA e MELLADO (1994) caracterizaram química, microbiológica e nutricionalmente um biscoito de chocolate enriquecido com sangue bovino. Foi elaborado um biscoito tipo amanteigado com sabor de chocolate, contendo 6% de sangue seco, com granulometria inferior a 100 mesh. O produto obtido apresentou 60% mais proteína e seis vezes mais ferro que um biscoito semelhante, sem sangue, com valor energético (524,4 kcal/100 g) e qualidade de sua proteína (NPU: 48,4) satisfatórios. A aceitação do produto (escala hedônica) foi avaliada por 156 estudantes com um resultado “gostei muito” em 90% das respostas.

2.5. Ferro e sua importância biológica

O ferro é um dos elementos mais essenciais ao organismo animal e humano, sendo o segundo metal mais abundante na crosta terrestre (MARTÍNEZ et al., 1999). Seu estado de oxidação, na maioria das formas naturais é +2 (ferroso) ou +3

(férico). O íon ferroso é totalmente hidrossolúvel nos níveis fisiológicos de pH, mas, na presença de oxigênio molecular, ele pode ser oxidado para o estado férrico, menos solúvel. Portanto, apesar de sua abundância, o ferro não é captado facilmente pelos organismos vivos em razão da sua insolubilidade na água, exceto quando em solução ácida (MILLER, 1996).

A concentração de ferro no organismo é de aproximadamente 35 a 45 mg/Kg de peso corporal no adulto (ANDREWS, 1999). Setenta por cento desse total são considerados ferro funcional, por desempenhar funções fisiológicas e ocorrem na hemoglobina (60%), mioglobina (5%) e enzimas intracelulares (5%). Os 30 % restantes constituem o ferro de armazenamento, ocorrendo na forma de ferritina (20%) e hemossiderina (10%). Menos que 1% de ferro circulam no plasma, ligados à transferrina. Essa proteína é responsável pelo transporte do ferro entre os diversos compartimentos e para a síntese da hemoglobina (CONRAD et al., 1999; MARTÍNEZ et al., 1999).

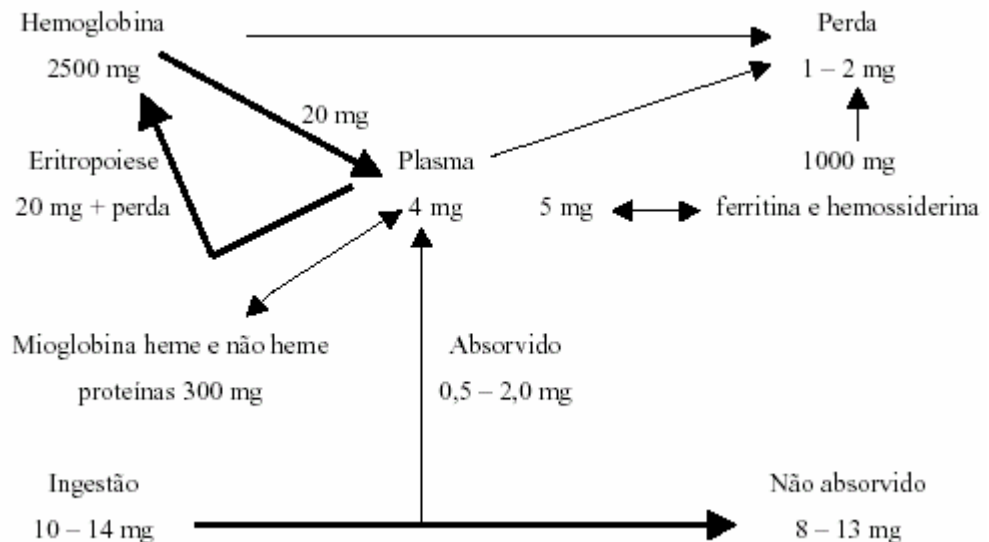
Aproximadamente 20 mg de ferro são utilizados diariamente para a produção de hemoglobina e são reciclados a partir da destruição dos eritrócitos, cuja vida média é de 120 dias (FINCH et al., 1970). Após esse período, eles são removidos por macrófagos presentes em muitas partes do organismo, principalmente no fígado (células de Kupffer), baço e medula óssea, e metabolizados. Entretanto, o ferro que permanece ligado à proteína volta à medula óssea, onde é reutilizado para produção de novos glóbulos vermelhos. Apenas uma pequena quantidade é perdida diariamente, através da urina, suor, menstruação na mulher, descamação celular e fezes (FAIRBANKS, 1994; GUYTON, 1997).

As perdas de ferro ocorrem a partir do trato gastrointestinal e pelo trato urinário. Dois terços das perdas gastrintestinais são oriundas de esfoliação das células da mucosa e o restante do extravasamento das células vermelhas (DE ANGELIS e CTENAS, 1993).

Em humanos, a quantidade total de ferro no corpo varia com o peso, concentração de hemoglobina, sexo e tamanho do compartimento de estocagem. Este compartimento, no qual o ferro está contido na ferritina e hemossiderina, é

também influenciado pela idade, sexo, tamanho do corpo, bem como por situações como a gravidez, lactação e ocorrência de hemocromatose (FAIRBANKS, 1994).

A Figura 1 demonstra a variação das quantidades de ferro nos diversos compartimentos do organismo do homem normal (FINCH et al., 1970).



Fonte: FINCH et al. (1970).

Figura 1 - Distribuição de ferro e a relação entre os compartimentos no organismo.

De um modo geral, a alimentação provê ferro a partir de quatro origens diferentes: origem animal, origem vegetal, alimentos fortificados com sais de ferro e alimentos com ferro proveniente de contaminação (BIANCHI et al., 1992). Nos alimentos, o ferro existe sob duas formas: uma forma orgânica denominada ferro heme, presente em tecidos animais, e as formas inorgânicas ou ferro não-heme, presentes tanto em tecidos animais como em todos os vegetais que contêm ferro e em alimentos fortificados (WILLIAMS, 1997).

O ferro heme está firmemente ligado ao centro de um anel porfirínico, de onde só se dissocia após captação pelas células intestinais. A maior parte do ferro heme ingerido está na forma de hemoglobina ou mioglobina. Todo o ferro vegetal e entre 40 e 60% do ferro de tecidos animais são do tipo não-heme. Esta forma encontra-se ligada, principalmente, a proteínas, mas também pode estar complexada

com citrato, fitatos, oxalatos, polifenóis ou outros ligantes (WILLIAMS, 1997; MILLER, 1996).

As funções do ferro resultam de suas propriedades físicas e químicas, principalmente de sua habilidade de participar das reações de oxidação e redução, como é o caso das enzimas envolvidas no processo de respiração celular (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998). Na hemoglobina, suas funções principais são: atuar como vetor de oxigênio, formando com ele uma combinação facilmente dissociável, permitindo que o oxigênio transportado seja cedido aos tecidos na medida das suas necessidades; servir de catalisador da oxidação, nas células e nas moléculas livres de heme e como constituinte das diastases oxidantes (catalase, peroxidase, citocromos), intervindo em numerosas reações de oxidação, por meio das quais se libera energia dos constituintes alimentares (GUYTON e HALL, 1997). A atividade de muitas enzimas envolvidas nestas reações bioquímicas diminui durante a deficiência de ferro nos tecidos (BEARD et al., 1996).

Existem evidências consideráveis de que o ferro pode desempenhar um papel na conversão de β -caroteno em vitamina A, na síntese de purinas e na detoxificação de drogas no fígado. A resposta à questão de se o estado do ferro tem efeito sobre a imunocompetência e, assim, sobre a susceptibilidade à infecção ainda não é clara. Apesar de o ferro ser essencial ao crescimento de microorganismos, ele também é uma parte integrante de enzimas e imunoproteínas necessárias para a destruição de organismos infecciosos (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

As necessidades de ferro podem ser determinadas em termos da quantidade que se deve absorver para repor as perdas do organismo, e que seja suficiente para cobrir o aumento normal da necessidade durante o crescimento e a gestação (FAO, 1991). O ferro, ao contrário de outros minerais traços, é mantido ou regulado em indivíduos adultos pela quantidade absorvida que é, aproximadamente, igual à perda (HALLBERG e HULTHEN, 2000).

As recomendações nutricionais de ferro são quantidades, que devem conter os alimentos consumidos, diariamente, para satisfazer as exigências, corrigidas segundo a biodisponibilidade e a quantidade, para satisfazer as variações

individuais. As doses diárias exigidas variam, conforme a idade, o estado nutricional. Na mulher, varia com a idade fértil, na gravidez e na lactação. Os requerimentos e as recomendações diárias de ferro são mostrados nos Quadros 2 e 3.

Quadro 2 - Requerimentos diários de ferro (mg/dia) de acordo com diferentes idades e sexo

Grupo	Idade (anos)	Peso corporal médio (kg)	Quantidade necessária para o crescimento (mg/dia)	Média de ferro perdida (mg/dia)		Requerimentos absolutos totais ^a (mg/dia)
				Basal	Menstruação	
Crianças	0,5-1	9,0	0,55	0,17		0,72
	1-3	13,3	0,27	0,19		0,46
	4-6	19,2	0,23	0,27		0,50
	7-10	28,1	0,32	0,39		0,71
Homens	11-14	45,0	0,55	0,62		1,17
	15-17	64,4	0,60	0,90		1,50
	>18	75,0		1,05		1,05
Mulheres	11-14 ^b	46,1	0,55	0,65		1,20
	11-14	46,1	0,55	0,65	0,48	1,68
	15-17	56,4	0,35	0,79	0,48	1,62
	>18	62,0		0,87	0,48	1,46
Pós-menopausa		62,0		0,87		0,87
Lactante		62,0		1,15		1,15

Fonte: WHO/UNU/UNICEF (2001).

^a inclui o requerimento de ferro para o crescimento, a perda basal e, em mulheres, a perda por menstruação.

^b não menstruando.

A deficiência nutricional de ferro ocorre quando a quantidade absorvida da dieta é insuficiente para alcançar as necessidades normais. Elas abrangem as perdas obrigatórias do organismo e os requerimentos nutricionais para o crescimento. Se essa deficiência persiste, os estoques orgânicos de ferro são exauridos e a anemia ferropriva se instala, afetando os níveis de hemoglobina sanguínea. A deficiência pode ser causada por ingestão inadequada, absorção deficiente, metabolização

imperfeita, perda sangüínea crônica ou aumento das necessidades como na infância, adolescência e gravidez (BRASIL, 2002; CARPENTER e MAHONEY, 1992).

Quadro 3 - Recomendações diárias de ferro (mg/dia), em função dos diferentes níveis de biodisponibilidade estimada de ferro da dieta, em várias categorias de acordo com a idade e o sexo

Grupo	Idade (anos)	Peso corporal médio (kg)	Recomendação de ferro (mg/dia) em diferentes níveis de biodisponibilidade de ferro da dieta (%)			
			Alta (15%)	Média (12%)	Baixa (10%)	Muito Baixa (5%)
Crianças	0,5-1	9,0	6,2 ^a	7,7 ^a	9,3 ^a	18,6 ^a
	1-3	13,3	3,9	4,8	5,8	11,6
	4-6	19,2	4,2	5,3	6,3	12,6
	7-10	28,1	5,9	7,4	8,9	17,8
Homens	11-14	45,0	9,7	12,2	14,6	29,2
	15-17	64,4	12,5	15,7	18,8	37,6
	>18	75,0	9,1	11,4	13,7	27,4
Mulheres	11-14 ^b	46,1	9,3	11,7	14,0	28,0
	11-14	46,1	21,8	27,7	32,7	65,4
	15-17	56,4	20,7	25,8	31,0	62,0
	>18	62,0	19,6	24,5	29,4	58,8
Pós-menopausa		62,0	7,5	9,4	11,3	22,6
Lactante		62,0	10,0	12,5	15,0	30,0

Fonte: WHO/UNU/UNICEF (2001).

^a A biodisponibilidade de ferro da dieta durante este período varia significativamente.

^b não menstruando.

Quando o estoque de ferro do organismo é depletado, o corpo sofre conseqüências funcionais, tais como a ineficiência do transporte de oxigênio e prejuízos no metabolismo oxidativo, no metabolismo nuclear e na transcrição gênica. As seqüelas clínicas incluem a anemia em si, a redução da atividade física, do rendimento do aprendizado e da diminuição da performance no trabalho e a diminuição de eficiência da função imune (BRASIL, 2002; BEARD et al., 1996; CARPENTER e MAHONEY, 1992). A imunocompetência reduzida é um possível sinal de deficiência precoce de ferro, notada particularmente por defeitos na

imunidade mediada por células e na atividade fagocítica dos neutrófilos, que podem levar a uma propensão aumentada para infecção (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

A carência de ferro pode resultar em anemia ferropriva e a perda parcial da atividade das enzimas dependentes. O excesso pode provocar danos principalmente relacionados à oxidação, resultando na formação de radicais livres capazes de provocar doenças degenerativas, cirrose hepática, diabetes, doenças cardiovasculares, etc. (SMITH et al., 1992; CONNOR et al., 1992; DEXTER et al., 1991).

Geralmente, a deficiência de ferro é caracterizada por três estágios (HALLBERG et al., 1993), cada um mudando gradativamente para o outro, de acordo com a gravidade da deficiência. O primeiro estágio se caracteriza pela queda da ferritina sérica. No segundo estágio, a saturação da transferrina está diminuída. O terceiro estágio se caracteriza pela redução da hemoglobina. Os critérios para o diagnóstico de anemia estabelecem que valores de hemoglobina menores que 11g/dL de sangue são sugestivos de anemia, dependendo da idade e da situação fisiológica (DALLMAN e REEVES, 1984).

2.6. Biodisponibilidade de ferro

O termo biodisponibilidade ou disponibilidade biológica tem sido extensivamente usado na área de alimentos e nutrição. Define-se biodisponibilidade como a proporção do nutriente em uma dieta, ou nos alimentos, que é efetivamente absorvida e utilizada pelo organismo. Tal conceito engloba o processo de assimilação, transporte e conversão de um nutriente para suas formas fisiologicamente ativas (FAIRWEATHER-TAIT, 1992). Biodisponibilidade, portanto, não é propriedade de dieta ou alimento por si, mas do indivíduo em relação ao alimento ou dieta (COZZOLINO e PEDROSA, 1995).

A biodisponibilidade de ferro é definida como a quantidade de ferro ingerida e que é absorvida e utilizada em funções metabólicas normais (BIANCHI et al., 1992).

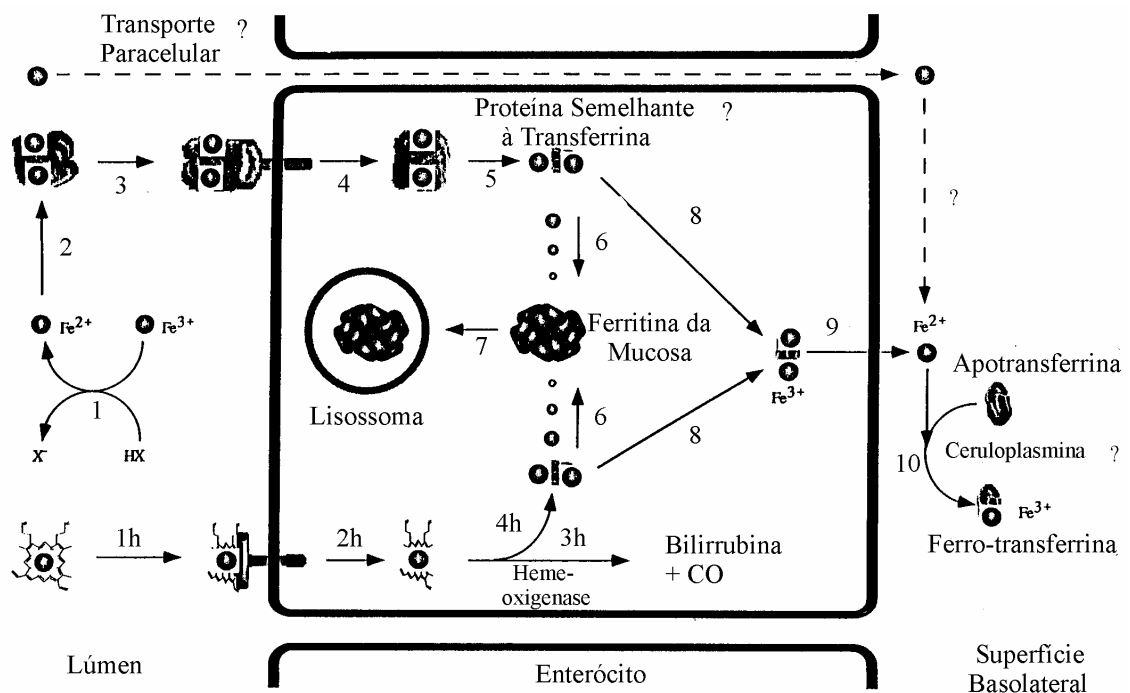
A absorção de nutrientes pelo trato gastrintestinal (ou a absorção luminal) ocorre pelas seguintes vias: a) transcelular, através da membrana apical das células epiteliais; b) paracelular, através das junções fechadas presentes entre as células epiteliais; e c) endocitose, com englobamento de material pela membrana celular. A absorção pode ocorrer sem gasto energético (difusão simples ou facilitada) ou com gasto energético (transporte ativo). Outro fator regulador é a presença de um ou mais transportador (carreador), para transpor a membrana celular; nesse caso haverá uma limitação da velocidade absorptiva por saturação dos transportadores, e competitividade entre nutrientes que são absorvidos com o auxílio do mesmo transportador (DE ANGELIS, 1998).

Os mecanismos de absorção do ferro discutidos envolvem três passos: captação do ferro pela membrana luminal (apical), trânsito pela célula e liberação da célula para a circulação, e estão esquematicamente ilustrados na Figura 2 (BEARD et al., 1996).

Os processos pelos quais o ferro é absorvido, tanto os processos bioquímicos específicos, quanto os de transporte e sua regulação, não estão completamente esclarecidos. Porém, a maioria dos autores relata que a maior parte da absorção do ferro ocorre na porção proximal do intestino, especificamente no duodeno e na parte superior do jejuno (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998; GARCÍA-CASAL et al., 1998; LYNCH, 1997; BEARD et al., 1996; BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1995; BIANCHI et al., 1992), e está diretamente relacionada à forma em que o ferro se encontra (heme ou não-heme), à solubilidade e à presença de outros componentes.

Do total de ferro ingerido, em torno de 50% são transformados para a forma solúvel, sendo que aproximadamente 20% são captados pelas células da mucosa do trato gastrintestinal e apenas 6% são transferidos ao plasma (DE ANGELIS e CTENAS, 1993).

Antes da captação pela borda em escova das células da mucosa, o ferro deve atravessar a camada de muco. A passagem do ferro por esta camada pode ser facilitada por ácidos orgânicos ou por polipeptídeos, como aqueles derivados da digestão de carnes. Na borda em escova das células epiteliais, Fe^{2+} é ligado a proteínas ligantes de ferro, que o solubilizam e transferem para o espaço intracelular. Uma dessas proteínas é a mucina. O ferro não-heme, ao chegar ao intestino, sofre a ação do meio alcalino e poderia ser completamente oxidado à forma férrica, se não houvesse fatores luminiais que o mantivessem solúvel. Moléculas ligantes de ferro, além dos fatores dietéticos, atuam para manter o ferro solúvel, sendo que muitas podem ser proteínas produzidas pelo estômago e fígado, porém não são completamente conhecidas (BENITO e MILLER, 1998; GUYTON e HALL, 1997; BEARD et al., 1996; BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1995).



Fonte: BEARD et al. (1996).

Figura 2 - Mecanismos de absorção do ferro não-heme (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) e do ferro heme (1h, 2h, 3h, 4h, 5, 6, 7, 8, 9, 10) compreendendo a captação do ferro pelo lúmen intestinal, trânsito pela célula e liberação da célula para a circulação.

Apesar do mecanismo de passagem do ferro através do enterócito (células da mucosa) não ser ainda muito claro, parece ser mediado por proteínas ligantes, denominadas integrina e mobilferrina, semelhantes à transferrina. A primeira, localizada nas vilosidades intestinais, é responsável pelo transporte do ferro para o interior do enterócito, enquanto a segunda protege e transporta o ferro até a membrana basolateral (BENITO e MILLER, 1998; BEARD et al., 1996).

O ferro absorvido, que não é ligado à ferritina, é liberado na membrana basolateral do enterócito e oxidado a Fe^{+3} pela ceruloplasmina para ser captado pela transferrina no “pool” plasmático. Aí combina-se com a apotransferrina para formar a transferrina, que é, então, transportada no plasma até os tecidos corporais, onde liberará o ferro que poderá ser estocado no fígado, baço e medula óssea ou utilizado pelas células. A transferrina não somente é responsável pela liberação do ferro da superfície basolateral dos enterócitos para os tecidos, mas também pela redistribuição do ferro aos vários compartimentos do corpo e pela proteção ao ferro durante a filtração glomerular (BEARD et al., 1996). Nem todo o ferro que entra na mucosa do trato gastrintestinal é transferido para o plasma. Isto pode ser devido às perdas por descamação das células do epitélio intestinal, com conseqüente descarga de ferro na forma de ferritina (BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1995).

Ligado à transferrina, o ferro circula pelo organismo. Alcançando a superfície das células, onde será utilizado, o ferro liga-se a receptores específicos, que são abundantes nas células que sintetizam hemoglobina e apresentam crescimento muito rápido. O complexo transferrina-ferro ligado aos receptores penetra na célula por endocitose e forma uma vesícula no interior da célula. As enzimas lisossomais liberam o Fe^{+3} , deixando a outra parte (apotransferrina) voltar à superfície celular, retornando em seguida à circulação e continuando o seu ciclo. Dentro dos eritrócitos, o ferro se une à protoporfirina nas mitocôndrias. A maior parte do complexo transferrina-ferro plasmático é usada nos eritrócitos. Uma menor quantidade é utilizada em outros locais, como no parênquima hepático, onde é armazenada como ferritina. A ferritina armazena mais de 50% do total de ferro do

organismo, principalmente no fígado, no baço e na medula óssea (BEARD et al., 1996; FAIRBANKS, 1994; DE ANGELIS e CTENAS, 1993).

O mecanismo de absorção do ferro heme é diferente daquele descrito anteriormente para o ferro não-heme. O ferro heme é mais bem absorvido e penetra intacto no enterócito como metaloporfirina através dos poros da membrana celular (HALLBERG e SÖLVELL, 1967; CONRAD et al., 1966). A absorção ocorre após a digestão proteolítica da mioglobina e da hemoglobina (UZEL e CONRAD, 1998). No citosol, o ferro inorgânico, na forma férrica, é liberado do anel porfirínico pela heme-oxigenase (BÖNI et al., 1993; RAFFIN et al., 1974) e entra para o “pool” celular comum, e é processado de maneira análoga ao ferro não-heme. O receptor intestinal para o grupamento heme tem sido parcialmente caracterizado na membrana da borda em escova, indicando que a molécula do heme é absorvida intacta (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998; BEARD et al., 1996; BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1995).

A absorção do ferro pode ocorrer por difusão passiva (permeação) e depende da diferença de concentração do ferro existente no lúmen intestinal e no plasma. Esse mecanismo não é regulado pelo organismo, não sendo ainda estabelecido o quanto representa no processo de absorção.

2.6.1. Fatores que afetam a biodisponibilidade do ferro

A deficiência, pelo menos para o ferro, quase sempre não é somente causada pela baixa ingestão deste mineral na dieta, mas também por uma série de fatores que afetam a sua biodisponibilidade nos alimentos. Exemplo disso são os muitos alimentos que são, aparentemente, boas fontes de ferro, mas são limitados pela sua disponibilidade biológica; que se dá em função de sua forma química e da presença de itens alimentares que promovam ou inibam sua absorção (DE ANGELIS, 1999; LATUNDE-DADA e NEALE, 1986).

Segundo BENITO e MILLER (1998), muitos fatores afetam a biodisponibilidade de ferro, mas a maior parte das pesquisas tem focado nos

aspectos dietéticos. Pouco é conhecido sobre os fatores fisiológicos que influenciam a absorção. Isso torna mais difícil os estudos de comparação de metodologias e a avaliação dos resultados.

Por causa do mecanismo absorptivo único e sua solubilidade elevada no pH intestinal, o ferro heme praticamente não é afetado por fatores químicos ou alimentares que podem alterar a biodisponibilidade do ferro não-heme. Sua absorção é determinada principalmente pelo nível de ferro corporal (MARTÍNEZ et al., 1999).

2.6.1.1. Fatores fisiológicos

O estado nutricional relativo ao ferro é o fator fisiológico mais importante que afeta sua absorção intestinal (BENITO e MILLER, 1998). Em condições normais, a taxa de absorção em humanos adultos é de 5% a 15% do ferro dos alimentos. Já em condições de deficiência de ferro, esta taxa pode chegar a 50%. Os mecanismos para esta indução são em grande parte desconhecidos. Com relação ao ferro heme, um fator que possivelmente contribua para o aumento de sua absorção, é a heme-oxigenase intestinal que é ativada pela deficiência somática de ferro. Em um experimento com humanos, esta enzima não foi influenciada pela administração oral de hemoglobina, mas foi influenciada pela deficiência de ferro. Sua distribuição no intestino era idêntica às áreas de absorção máxima de ferro heme (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998; BEARD et al., 1996).

Observações na diminuição da absorção de ferro em pacientes com acloridria (ausência de ácido clorídrico no suco gástrico), quando comparados a indivíduos em condições normais de secreção ácida no estômago, têm indicado que o ácido gástrico é fundamental no processo de absorção do ferro não-heme. O mecanismo pelo qual o suco gástrico influencia a absorção do ferro, contudo, não é ainda bem conhecido (BENITO e MILLER, 1998). Estudos realizados por CONCEIÇÃO et al. (2001) em ratos também comprovaram que a acidez gástrica é

um fator luminal importante e necessária para melhorar a absorção de ferro não-heme.

Outro fator que afeta a absorção de ferro decorre do tempo de trânsito da dieta ou alimento. A principal dificuldade para se estudar esse efeito sobre a absorção de ferro é isolá-lo de outros fatores como pH e tipo de dieta. Entretanto, acredita-se que um tempo maior de trânsito no estômago e intestino aumenta a oportunidade de dissolver e absorver minerais ingeridos (POWELL et al., 1994).

O muco é uma secreção complexa composta de glicoproteínas (mucina). É produzido e liberado, principalmente, pelas células caliciformes ao longo da mucosa gastrintestinal, desempenhando funções de lubrificação e proteção. Também desempenha um papel importante na quebra e absorção de nutrientes provenientes da digestão no lúmen. Pesquisas têm mostrado que a mucina liga-se ao ferro, mantendo-o disponível para a absorção no elevado pH (7,0) do intestino (CONRAD et al., 1991).

Qualquer condição ou doença que cause anormalidades nas células da mucosa intestinal pode afetar a absorção de ferro. Por exemplo, a doença celíaca, caracterizada por uma inflamação intestinal, torna o epitélio intestinal achatado, reduzindo a superfície de absorção de nutrientes. Pacientes acometidos têm uma alta incidência de deficiência de ferro (BENITO e MILLER, 1998)

Outro mecanismo de controle da absorção de ferro decorre de estados de hipóxia e pela produção de eritrócitos. Qualquer condição que cause a diminuição da quantidade de oxigênio transportada para os tecidos normalmente aumenta a velocidade de produção das hemácias. Assim, quando uma pessoa se torna extremamente anêmica em virtude de uma hemorragia ou outra condição, a medula óssea começa imediatamente a produzir grandes quantidades de hemácias. O principal fator que estimula a produção de hemácias é um hormônio circulante chamado eritropoetina. Na ausência de eritropoetina, a hipóxia tem pouco ou nenhum efeito sobre a estimulação da produção de hemácias. No outro extremo, quando grandes quantidades de eritropoetina são produzidas e se há ferro abundante e disponível, além de outros nutrientes necessários, a velocidade de produção de

hemácias aumenta dez vezes ou mais em relação ao normal (GUYTON e HALL, 1997).

Ambas as situações aumentam a mobilização de ferro para a produção de hemácias, tanto dos estoques corporais, quanto da transferrina circulante no plasma. Esta, por sua vez, acaba por liberar o ferro preso à molécula, deixando mais apotransferrina livre, sinalizando aos enterócitos sobre a necessidade de aumento da absorção (GUYTON e HALL, 1997).

A biodisponibilidade do ferro muda de acordo com certos estados fisiológicos como o crescimento e a gravidez. Sabe-se que as maiores necessidades do organismo durante estes estados, freqüentemente, levam a um aumento da absorção de ferro (BIANCHI et al., 1992).

2.6.1.2. Fatores químicos e dietéticos

Fatores químicos, como estado de oxidação, solubilidade e pH, afetam a biodisponibilidade do ferro não-heme (Van DOKKUM, 1992). O estado de oxidação do ferro varia dependendo do ambiente químico. Na água, bem como nos alimentos, observam-se os estados de oxidação Fe^{+2} (ferroso) e Fe^{+3} (férico), que são os mais estáveis nestes meios. A maior solubilidade dos sais ferrosos Fe^{+2} sobre os sais féricos (Fe^{+3}) é, em parte, responsável pela maior biodisponibilidade dos íons ferrosos no trato gastrintestinal do que os íons féricos (BIANCHI et al., 1992).

No meio ácido, os íons ferrosos e féricos não ocorrem em estado livre e são hidratados, respectivamente para $Fe(H_2O)_6^{+2}$ e $Fe(H_2O)_6^{+3}$. Com o aumento do pH, as moléculas de água doam prótons para formar hidróxidos insolúveis de ferro: o $Fe(H_2O)_6^{+3}$ forma $Fe(OH)_3$ e o $Fe(H_2O)_6^{+2}$ forma $Fe(OH)_2$. No pH = 2, do estômago, o ferro é solúvel e está na forma hidratada. Quando o pH aumenta, o ferro torna-se um hidróxido insolúvel e, como a solubilidade é pré-requisito para a sua captação pelo intestino, a insolubilidade do ferro é o fator que, neste caso, dificulta sua absorção. Íons féricos no meio alcalino intestinal precipitam-se

irreversivelmente e as macromoléculas resultantes de hidróxido férrico são muito grandes para serem absorvidas (GUYTON e HALL, 1997; BIANCHI et al., 1992).

A forma alimentar do ferro também afeta a sua biodisponibilidade. O ferro heme, proveniente da hemoglobina e mioglobina, é encontrado no músculo de vaca, porco, galinha, peixe e em outros tipos de carnes. Sua absorção é de três a cinco vezes maior do que o ferro não-heme, contido nos vegetais, nos cereais e nas leguminosas (LAYRISSE e GARCÍA-CASAL, 1997). A fonte dietética de ferro influencia bastante a eficiência de sua absorção. A quantidade de ferro absorvida varia de menos de 1% para mais de 20%, dependendo do alimento. O ferro presente em alimentos de origem vegetal é menos absorvido. Esta absorção é intermediária para leite e derivados e maior para carne (YIP, 1997). Segundo HIGGS (2000), a absorção de ferro heme é tipicamente de 15 a 25%, comparado com 1 a 7% do ferro não-heme de fontes vegetais.

De acordo com KAPSOKEFALOU e MILLER (1995), a composição dos constituintes da alimentação é um importante fator que influencia a biodisponibilidade do ferro não-heme. Alguns componentes dos alimentos como oxalatos, fibras, fitatos, taninos, caseína e sais de cálcio inibem, ou diminuem a absorção do ferro, porque formam precipitados, quelatos insolúveis ou macromoléculas de baixa biodisponibilidade. Outros chegam a competir com os sítios de ligação das células da mucosa intestinal para a absorção, ou mesmo com as proteínas ligantes presentes na luz intestinal, que o tornariam mais solúvel (CLYDESDALE, 1983).

O ácido oxálico, presente em alguns vegetais como o espinafre e a beterraba, e seus sais são considerados fatores antinutricionais; eles podem tornar certos nutrientes minerais indisponíveis por ligarem-se a eles formando sais insolúveis que não são absorvidos no intestino (VITAKON, 1986). Entretanto, alguns estudos têm demonstrado um efeito neutro e até positivo na absorção do ferro, tanto em ratos quanto em humanos (GORDON e CHAO, 1984; HALLBERG, 1981).

O ácido fítico, constituinte de muitos alimentos de origem vegetal, é um excelente quelante de íons minerais. Já que o fitato não pode ser absorvido e os seres humanos têm limitada capacidade de hidrolisar a molécula de fitato, um efeito prejudicial do ácido fítico na biodisponibilidade de minerais é esperado (LONNERDAL, 1980). Porém, o efeito inibitório do ácido fítico é ainda muito contraditório. MORRIS e ELLIS (1976) demonstraram que o fitato monoférrico complexado ao ferro permanece solúvel e, portanto, biodisponível. Este tipo de fitato corresponde a cerca de 60 % no trigo. Quando se associa a mais moléculas de ferro, como no caso do fitato férrico (com 3 ou 4 moles de ferro/molécula), torna-se insolúvel e, portanto, com baixa biodisponibilidade. Em outro estudo, os mesmos autores descreveram que há razões para acreditar que os fitatos inibam a absorção já que ambos, fitato diférrico e tetraférrico, apresentaram-se pobremente biodisponíveis (MORRIS e ELLIS, 1976) e estas são as formas encontradas em vários vegetais como o gérmen de trigo e as lentilhas (GILLOOLY et al., 1984).

Os polifenóis reduzem a absorção de ferro não-heme de alimentos. Dentre estes, os taninos são os mais importantes. Os principais efeitos antinutricionais dos taninos são a inativação de enzimas digestivas, pela sua ligação seletiva às mesmas, formando complexos insolúveis e a capacidade de complexação com minerais, diminuindo a absorção, principalmente de ferro, pois são quelantes naturais desse mineral (GEIL e ANDERSON, 1994; GOYCOOLEA et al., 1990). Agem através da formação de complexos entre os grupos hidroxila dos componentes fenólicos e a molécula de ferro, tornando-o indisponível para absorção (LYNCH, 1997).

O tanino, presente no chá e no café, é um inquestionável inibidor da absorção do ferro. O alto conteúdo antinutricional, nestas bebidas, formaria um complexo insolúvel com o ferro, inviabilizando sua absorção (GARCÍA-CASAL e LAYRISSE, 1998). Outros experimentos demonstraram que o café reduziu cerca de 33% da absorção do ferro contido na carne de hambúrguer. Já com uma xícara de chá preto, essa redução foi de aproximadamente 64% (MORCK et al., 1983). Os taninos presentes em feijões (*Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus acutifolius*) também são citados como os maiores fatores inibidores da solubilidade do ferro (BENITEZ

et al., 1994). Entretanto, AMAYA et al. (1991) constataram que o conteúdo de taninos não tem correlação com a disponibilidade do ferro em feijões.

A questão da fibra como fator interferente ainda é discutível. REINHOLD et al. (1981) demonstram que componentes da fibra do trigo e do milho ligam-se ao ferro *in vitro*. Entretanto, a adição de farelo de trigo a pães com a mesma quantidade de fitato não teve efeito sobre a absorção do ferro em ratos (FAIRWEATHER-TAIT, 1982). Já GILLOOLY et al. (1984), em seu estudo sobre a absorção de cereais, concluíram que, embora a lignina e a hemicelulose tenham inibido a absorção do ferro em humanos, a pectina e a celulose, mostraram efeito oposto. DAVIDSSON et al. (1996), estudando formulados infantis à base de cereais, não encontraram efeito de altos conteúdos de fibra na absorção de zinco, cálcio ou ferro; ao contrário, afirmam que o aumento no teor de fibras implica num aumento do teor de ácido fítico.

A adição de cálcio, seja na forma de leite ou sal inorgânico a um alimento, reduz a absorção de ferro não-heme (LYNCH, 1997). Os estudos também têm demonstrado que o cálcio interfere tanto na absorção do ferro não-heme como do ferro heme; contudo, o mecanismo pelo qual ele atua ainda não está definido (YBARRA et al., 2001; LYNCH, 2000).

Como também constatado por COOK et al. (1991), o cálcio presente atua como inibidor da absorção de ferro não-heme da dieta ou de medicamentos à base de sulfato ferroso, quando ingerido em quantidades maiores do que 500 mg. Outros minerais que possuem ações inibitórias sobre a absorção de ferro não-heme, devido a propriedades físico-químicas semelhantes, são: o manganês, quando presente em proporção 300 vezes maior que o ferro; e o zinco, quando seu conteúdo é 5 vezes maior que o conteúdo de ferro (ROSSANDER-HULTEN et al., 1991).

Alguns autores (HALLBERG et al., 1992b; HALLBERG et al., 1992a; HALLBERG et al., 1991; BARTON et al., 1983) sugerem que a interação possa se dar por duas vias, quais sejam: a competição entre os minerais pelo mesmo transportador no processo de absorção, entrada do enterócito, para o ferro não-heme, e, ou, a competição pelo transportador na saída do ferro para a circulação

sanguínea através da membrana basolateral. Isso justificaria a influência do cálcio na absorção do ferro heme, uma vez que o mesmo, após entrar no enterócito, é liberado do anel de porfirina e forma um “pool” comum com o ferro não-heme, seguindo as mesmas vias de transporte e metabolismo.

Aditivos e quelantes sintéticos como o alginato de sódio (em sorvetes, marmelada e maionese), a tetraciclina, o EDTA (ácido etileno diaminotetracético) entre outros, podem diminuir a biodisponibilidade do ferro (LATUNDE-DADA e NEALE, 1986).

Fosfoproteínas contidas na gema e na clara do ovo formam complexos de elevada estabilidade efetiva com o ferro não-heme bloqueando, significativamente, a absorção deste mineral. Interações semelhantes são verificadas entre fosfoproteínas do leite de vaca e seus derivados, como queijos e iogurtes, e o ferro dietético, com as mesmas conseqüências (STEKEL, et al., 1983).

Dois fatores nutricionais têm mostrado aumentar a biodisponibilidade do ferro: o ácido ascórbico e a carne. O ácido ascórbico é o promotor mais conhecido da absorção de ferro não-heme. O ácido ascórbico pode promover condições ácidas dentro do estômago, facilitando a solubilização do ferro da dieta. O ferro no estado férrico pode ser reduzido para o estado ferroso, tornando-o solúvel. O ácido ascórbico também pode formar quelatos com o íon férrico solubilizado dentro do estômago, conseqüentemente mantendo a solubilidade deste quando o alimento entra no pH alcalino do intestino delgado (MARTÍNEZ et al., 1999; CARPENTER e MAHONEY, 1992).

Indivíduos com baixas reservas de ferro e ingestão diária de ácido ascórbico inferior a 25 mg, e de carne, aves e peixe inferior a 30 g, apresentam baixa biodisponibilidade de ferro, em torno de 5%. No entanto, se mais de 75 mg de ácido ascórbico ou mais de 90 g de carne, ave ou peixe estão presentes na alimentação, a biodisponibilidade torna-se alta, em torno de 20% (BIANCHI et al., 1992).

Outros fatores, como alguns açúcares (frutose), formam complexos com o ferro não-heme, tornando-o solúvel no pH do lúmen intestinal, favorecendo sua absorção (GARCÍA-CASAL e LAYRISSE, 1998). Também, os ácidos orgânicos,

tais como, cítrico, málico, láctico, succínico e tartárico, promovem a absorção do ferro; entretanto, nenhum se mostra tão eficaz como o ácido ascórbico (CLYDESDALE, et al., 1991; LATUNDE-DADA e NEALE, 1986).

Segundo alguns estudos, a vitamina A e o β -caroteno aumentam a absorção do ferro não-heme por formar complexos solúveis e prevenir o efeito inibidor dos fitatos e polifenóis durante a absorção do ferro (GARCÍA-CASAL et al., 1998).

Roedores têm sido muito usados para avaliar a biodisponibilidade de ferro, principalmente ratos em crescimento. Entretanto, quando fatores que afetam a absorção dietética do ferro são avaliados, há disparidades entre estudos em ratos e humanos. Há uma relativa insensibilidade dos ratos aos fatores que influenciam na absorção de ferro não-heme em humanos (REDDY e COOK, 1991).

2.6.2. Ferro e carne

A carne vermelha é uma excelente fonte de ferro, com 50 a 60% do ferro na forma heme (HIGGS, 2000). Segundo Van DOKKUM (1992), a carne é a mais importante fonte de ferro heme, mas sua percentagem varia entre os diferentes animais. Em carnes bovina, suína e frango cerca de 70, 48 e 30% do ferro, respectivamente, encontram-se na forma heme. O mesmo autor relata que a percentagem de ferro absorvida parece estar ligada à quantidade de ferro heme presente na carne, e embora a biodisponibilidade do Fe heme seja alta, a absorção verdadeira (referindo-se à quantidade de ferro de origem heme que entra na circulação sanguínea) está longe dos 100%.

O ferro heme, proveniente da hemoglobina e mioglobina, é altamente biodisponível e absorvido por um mecanismo diferente, e mais eficiente, do que o ferro não-heme, presente em alimentos vegetais, envolvendo receptores específicos (HIGGS, 2000; GARCIA et al., 1996).

De acordo com DE ANGELIS e CTENAS (1993), a maior absorção de ferro heme é observada para as carnes vermelhas. Peixes e aves possuem absorção de 23 e 40% em relação à carne bovina, respectivamente.

Os principais tipos de carnes cruas contêm ambas as formas de ferro, embora em diferentes proporções. O Quadro 4 apresenta o conteúdo médio de ferro heme (% de ferro total) em carnes cruas.

As carnes não somente contribuem com o ferro heme, altamente biodisponível, mas também aumentam a biodisponibilidade de ferro não-heme, proveniente de outros constituintes da dieta ou da própria carne. Este efeito é comumente chamado de "fator carne" (MARTÍNEZ et al., 1999; MULVIHILL et al., 1998; GARCIA et al., 1996). COOK e MONSEN (1976) demonstraram que carne bovina, suína, de cordeiro, fígado, peixe e frango aumentaram a absorção de ferro em duas ou quatro vezes, enquanto leite, queijo e ovos inibiram ou não tiveram efeito na absorção de Fe não-heme de vegetais.

Além disso, um estudo feito por HURRELL et al. (1988) concluiu que a mesma fonte protéica pode ter um efeito diferencial na absorção do ferro: carne bovina aumentou a absorção de Fe não-heme em farinha de milho, mas não teve efeito na absorção de Fe em farinha de pão.

Quadro 4 - Conteúdo de ferro heme em relação a % de ferro total, em diferentes tipos de carnes

Fonte	Conteúdo de Fe heme (%)	Forma do Fe heme
Carne bovina	60	Mioglobina (90%)
		Hemoglobina (10%)
Carne suína	45	Mioglobina (90%)
		Hemoglobina (10%)
Carne de carneiro	55	Mioglobina (90%)
		Hemoglobina (10%)
Fígado	40	Hemoglobina (100%)
Sangue	99	Hemoglobina (100%)

Fonte: ROGOV et al. (1989).

A carne contribui com cerca de 14% da ingestão total de ferro. A deficiência de ferro é menos freqüente em países onde a carne é parte significativa

da dieta (HIGGS, 2000; UZEL e CONRAD, 1998). Alguns autores têm sugerido que a diminuição da ingestão de carnes vermelhas aumenta o risco de deficiências de ferro, problemas freqüentemente observados em adolescentes do sexo feminino. Além disso, vários estudos têm mostrado que as mulheres consomem menos quantidades desse mineral do que os homens, o que coincide com o fato de que o consumo de carnes pelos homens também tende a ser maior (ORTEGA et al., 1998).

A população indiana (predominantemente vegetariana) que habita a Inglaterra e América do Norte tem mostrado uma alta prevalência de deficiência de ferro, sobretudo em mulheres e crianças, quando comparado com a população onívora. Também se descobriu uma alta prevalência de anemia por deficiência em ferro nos novos adeptos da dieta vegetariana e naqueles que seguem dietas macrobióticas (MARTÍNEZ et al., 1999).

Segundo LAWRIE (1981), carnes vermelhas fornecem uma média de 4,7 mg de ferro/dia, enquanto carne de aves e peixes fornece, respectivamente, 0,86 e 0,24 mg de ferro/dia. Isso dá um total de 5,8 mg/dia ou 58% das recomendações nutricionais (RDA) para um homem adulto (considerando a RDA de 10 mg/dia de ferro), ou de 32% da RDA para mulheres (RDA de 18,6 mg/dia). Tais dados indicam que o estado nutricional de ferro de muitas mulheres pode ser bastante melhorado pelo uso de carnes vermelhas, carnes de aves e peixes nas dietas.

ERBERSDOBLER (1995) discutiu a importância da carne do ponto de vista nutricional e fisiológico e relatou que a mesma, embora possua excelente valor nutricional, tem perdido o seu espaço para os cereais, leite e vegetais. Entretanto, esse autor sugere que para certos grupos da população, especialmente adolescentes do sexo feminino, a carne não deve ser excluída da dieta, além de ser preferencial em relação aos suplementos de ferro.

2.6.2.1. O "fator carne" e a biodisponibilidade de ferro

Diversos estudos têm mostrado que certos tecidos animais como as carnes bovina, suína, de frango, peixe e fígado aumentam a biodisponibilidade de ferro

não-heme, proveniente de outros constituintes da dieta ou da própria carne (MARTÍNEZ et al., 1999; MULVIHILL et al., 1998; GARCIA et al., 1996). Este efeito é comumente chamado de "fator carne".

Segundo COOK e MONSEN (1976), a ingestão de carne de vitela induziu a um aumento de dez vezes na absorção de ferro de um alimento à base de milho. ZHANG et al. (1991) verificaram que a substituição de albumina de ovo em uma refeição por carne bovina, de carneiro, suína, fígado, frango ou peixe, elevou em duas a quatro vezes a absorção de ferro. Segundo KAPSOKEFALOU e MILLER (1991), a magnitude do aumento na absorção do Fe, provocada pelo "fator carne", é variada e situa-se entre 2 a 3 vezes.

Desde que se descobriu seu efeito promotor na absorção do ferro, várias pesquisas têm sido conduzidas com o intuito de se encontrar o mecanismo exato do "fator carne" dos tecidos animais (MULVIHILL e MORRISSEY, 1998b; MULVIHILL et al., 1998; KAPSOKEFALOU e MILLER, 1991). Várias hipóteses têm sido sugeridas. Uma delas sugere que produtos formados a partir da digestão de proteínas cárneas, como aminoácidos e peptídeos, promovem a formação de quelatos solúveis com o ferro não-heme, facilitando, assim, a absorção (KAPSOKEFALOU e MILLER, 1995; 1993). Van DOKKUM (1992) chama a atenção para o fato de que o peso molecular de proteínas é importante para a formação de espécies metálicas solúveis e insolúveis, sendo o estágio da digestão protéica decisivo para a formação de complexos solúveis de ferro ou precipitados de ferro não biodisponíveis.

Outra hipótese que pode estar relacionada ao "fator carne" envolve a redução do Fe^{+3} para Fe^{+2} durante a digestão. O Fe^{+2} é mais solúvel e, portanto, menos provável de sofrer hidrólise nas condições presentes no lúmen gastrintestinal (MULVIHILL e MORRISSEY, 1998b; KAPSOKEFALOU e MILLER, 1991). O aminoácido cisteína e a glutatona (um peptídeo contendo cisteína) podem ser os agentes provenientes da carne capazes de reduzir o Fe^{+3} para Fe^{+2} (KAPSOKEFALOU e MILLER, 1993).

Assim, o grupo sulfidril (-SH), proveniente da digestão de proteínas da carne, parece desempenhar um papel importante no aumento da biodisponibilidade de ferro não-heme. TAYLOR et al. (1986) encontraram que peptídeos contendo cisteína, liberados durante a digestão da carne, aumentaram a absorção de ferro não-heme em estudo com humanos. Em contraste, quando o sistema estava oxidado, a absorção de ferro diminuiu em 63%.

KAPSOKEFALOU e MILLER (1991) verificaram o efeito exercido pela carne, durante a digestão *in vitro*, na redução do Fe^{+3} para a forma Fe^{+2} . O mesmo efeito não foi observado pelos pesquisadores para albumina bovina, albumina do ovo e caseína.

Alguns trabalhos têm estabelecido uma relação linear entre o conteúdo de grupos -SH de proteínas cárneas e sua habilidade em aumentar a biodisponibilidade do ferro.

MULVIHILL e MORRISSEY (1998a) examinaram, *in vitro*, o efeito de vários tipos de carne na biodisponibilidade do ferro não-heme. Eles concluíram que o "fator carne" parece ser uma combinação de vários fatores, incluindo compostos de baixo peso molecular, resultantes da degradação da proteína, e a presença de grupos -SH.

MULVIHILL et al. (1998) avaliaram o efeito das proteínas miofibrilares, miosina e actina, na biodisponibilidade do ferro não-heme, numa tentativa de identificar o "fator carne". Os resultados mostraram que a miosina, com conteúdo de -SH maior do que a actina, teve maior efeito na biodisponibilidade *in vitro* do ferro não-heme, indicando uma provável influência redutora dos resíduos de cisteína como constituinte do "fator carne".

Literaturas científicas indicam que a cisteína é o único aminoácido conhecido com a propriedade de melhorar a absorção de ferro não-heme em humanos (MULVIHILL et al., 1998).

Numa tentativa de entender o "fator carne", KAPSOKEFALOU e MILLER (1993) propuseram duas hipóteses: os produtos da digestão das proteínas cárneas promoveriam a redução do Fe^{+3} para Fe^{+2} e os ácidos graxos livres, formados a

partir da digestão da gordura, complexariam com o Fe^{+2} no lúmen para formar compostos que atravessariam a membrana. Os resultados obtidos confirmaram a possibilidade dessas hipóteses. Entretanto, em estudo mais recente, os mesmos pesquisadores rejeitaram a hipótese da interação de ácidos graxos com o ferro (KAPSOKEFALOU e MILLER, 1995).

Outros pesquisadores também têm afirmado que a carne auxilia a absorção do ferro por neutralização de certos fatores, no lúmen intestinal, que poderiam interferir na liberação do ferro do alimento ou no seu transporte para a superfície da mucosa da célula (BIANCHI et al., 1992).

2.7. Sangue animal como fonte potencial de ferro

A deficiência de ferro e a anemia por deficiência de ferro (anemia ferropriva) estão incluídas entre os maiores problemas de saúde pública no mundo, ocorrendo tanto nos países em desenvolvimento como nos desenvolvidos (WHO/UNU/UNICEF, 2001; STOLTZFUS e DREYFUSS, 1998), sendo decorrentes, principalmente, da ingestão de dietas não balanceadas ou da baixa biodisponibilidade do ferro ingerido (FINCH e COOK, 1984).

Estimativas da Organização Mundial da Saúde (INACG, 2000) situam em 2 bilhões, ou seja, 1/3 da população mundial, o número de pessoas que apresentam carência de ferro ou níveis baixos de hemoglobina, sendo que em países em desenvolvimento verifica-se uma proporção entre 30 e 70% da população, e em países industrializados da Europa e da América do Norte uma proporção menor que 20% (LOOKER et al., 1997; HALLBERG, 1995). Porém, a anemia causada por deficiência de ferro, denominada anemia ferropriva, é muito mais comum que as demais (estima-se que 90% das anemias sejam causadas por carência de ferro) e afeta grande parcela da população mundial de praticamente todos os estratos sociais, dos mais privilegiados aos mais carentes, especialmente o grupo materno-infantil: lactentes, pré-escolares, escolares, gestantes e nutrizes, embora homens -

adolescentes e adultos - e os idosos também possam ser afetados por ela (BRASIL, 2002).

O maior problema dos países do terceiro mundo é a alta incidência de anemia por deficiência de ferro. As dietas são pobres em proteína animal e tendem a ter mais produtos vegetais e cereais. Fatores inibindo a biodisponibilidade do ferro inerentes a dietas ricas em vegetais, contendo uma baixa porção do ferro heme, aumentam significativamente a incidência de anemia ferropriva nestes países (OLOGUNDE et al., 1994).

Apesar da ausência de um levantamento nacional, existe consenso na comunidade científica de que a anemia ferropriva tem altas prevalências em todo o território nacional, atingindo todas as classes de renda. Estudos recentes indicam prevalências em pré-escolares, variando ao redor de 50%, em adolescentes de cerca de 20% e em gestantes variando entre 15% e 30%, com uma grande homogeneidade nas diferentes regiões do país (BRASIL, 2002).

No Brasil, alguns estudos demonstram prevalência de anemia em aproximadamente 50% de crianças em idade pré-escolar de nível sócio-econômico mais baixo nas cidades de Porto Alegre/RS (SILVA et al., 2001) e em São Paulo/SP (MONTEIRO et al., 2000). No entanto, a prevalência real em crianças e lactentes é muito difícil de ser determinada devido a problemas no delineamento da pesquisa, na coleta de dados e tamanho da amostra (SZARFACS e DE SOUZA, 1997).

A desnutrição energético-protéica, a deficiência de iodo, a hipovitaminose A e as anemias nutricionais são consideradas como problema de importância epidemiológica relevante (BATISTA-FILHO e FERREIRA, 1996).

Esta situação tem levado ao desenvolvimento de suplementos nutricionais para o tratamento da anemia ferropriva. No Brasil, o sulfato ferroso é a fonte de ferro mais utilizada para a suplementação (3 mg/kg de peso corporal); entretanto, por ser uma fonte de ferro inorgânico, não-heme, sua absorção pode ser comprometida por inúmeros fatores, além da presença de efeitos colaterais, como pirose, náuseas, vômitos, diarreia, constipação intestinal e cólicas (SIMÕES et al., 1999; SIMMONS et al., 1993), ocorrendo em 15% a 20% dos pacientes em

tratamento diário com ferro oral (CARDOSO e PENTEADO, 1994). No entanto, é preciso relatar a eficácia do ponto de vista de melhoria dos níveis de hemoglobina após este tipo de intervenção.

Vários fatores limitam a efetividade das medidas propostas para o tratamento da anemia, tais como a pobreza do quadro sintomático das anemias, de forma que os pacientes se sentem pouco motivados a tratar de um problema do qual raramente se queixam; aparecimento de efeitos colaterais derivados da administração de sais de ferro, produzindo sintomas mais notáveis que os relatados para a própria anemia, especialmente quando se administram altas doses de sais de ferro; a longa duração do tratamento e, por conseguinte, das queixas resultantes da própria terapia (BATISTA-FLHO e FERREIRA, 1996).

A fortificação de alimentos tem sido recomendada, como um dos melhores métodos de prevenção e combate à deficiência de ferro em uma população. A partir de junho de 2004, toda a farinha de trigo e milho vendida no País tem de ser enriquecida com ferro (4,2 mg/100 g de farinha), segundo resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2002).

Devido à frequência, à gravidade da anemia ferropriva e aos efeitos colaterais observados após a administração de doses terapêuticas de sulfato ferroso (FeSO_4), recomenda-se que sejam desenvolvidas novas estratégias (HURRELL, 1997; GIBSON, 1997; FREIRE, 1997), sistemas de liberação (BATRA et al., 1994; COOK et al., 1990) ou novos compostos (IOST et al., 1998), que possam minimizar ou eliminar os efeitos colaterais, da administração de ferro.

Como conseqüências, essas alternativas poderão resultar em aumento da aderência ao tratamento e da eficácia dos programas de combate à anemia (SINGH et al., 1998; SIMMONS et al., 1993).

Nesta linha de raciocínio, o ferro heme, proveniente da hemoglobina e da mioglobina (presentes no sangue e no músculo, respectivamente), apresenta uma taxa de absorção muito maior que o ferro não-heme, constituindo-se, assim, em uma excelente fonte de ferro para a utilização como suplemento nutricional (WALKER, 1998).

O sangue contém 0,30 mg/g de ferro, comparados a 0,026; 0,03 e 0,016 mg/g existentes nas carnes bovina, ovina e suína, respectivamente (GORBATOV, 1988; OELLINGRATH e SLINDE, 1985). O elevado teor de ferro heme presente no sangue, associado à sua excelente biodisponibilidade, quando comparado com o de ferro não-heme (MIELNIK e SLINDE, 1983; WISMER-PEDERSEN, 1979), pode prevenir e ajudar no tratamento de anemias, como alternativa para a melhoria deste problema de saúde pública.

O sangue animal tem sido objeto de numerosos estudos nos últimos anos (COLLI et al., 1994; DA SILVA e MELLADO, 1994; DOMENE, 1988; NOGUEIRA et al., 1992; ANSEJO et al., 1985; WISMER-PEDERSEN, 1979) por ser uma fonte não tradicional de nutrientes, assim como uma excelente fonte de ferro heme, de relativo baixo custo, com propriedades organolépticas e funcionais adequadas ao consumo humano.

DA SILVA e MELLADO (1994) caracterizaram nutricionalmente um biscoito de chocolate enriquecido com sangue bovino. O produto obtido apresentou seis vezes mais ferro que um biscoito semelhante, sem sangue.

RADMILI et al. (1995) avaliaram o uso de hemoglobina em pó como um suplemento de ferro em produtos cárneos. A adição de 0,5% desse pigmento aumentou, quando comparado a amostras controles não suplementadas de hemoglobina, o conteúdo de ferro em 77%.

Outros estudos foram conduzidos por KOCOVSKI et al. (1994), e comprovaram que a adição de 15% de sangue bovino ou de 2,5% de hemoglobina em pó a produtos cárneos provocou um aumento no conteúdo total de ferro de 3,08 a 3,3 vezes em comparação aos produtos convencionais. Além disso, a proporção de Fe^{+2} teve um acréscimo de 1,74 a 2,19, conferindo ao sangue e à hemoglobina em pó, um enorme potencial como fontes de ferro na nutrição dos consumidores.

SIMÕES et al. (1999) determinaram o impacto de um produto, proveniente da fração celular sangüínea desidratada de bovinos, rica em ferro heme, nos níveis hematimétricos de seres humanos. O grupo suplementado com o ferro, apesar de apresentar níveis normais de estoque de ferro no início do estudo, obteve melhores

resultados em comparação ao não suplementado. Observou-se, ainda, aumento significativo ($P < 0,05$) nos níveis de ferro sérico no grupo suplementado com a fração celular, indicando que o ferro desta fração foi absorvido e utilizado pela população do estudo no período de dois meses. Este estudo indica a possibilidade de uso deste produto no tratamento da anemia ferropriva.

ANSEJO et al. (1985) fortificaram biscoitos com 4, 6 e 8% de concentrado de ferro heme, obtido de sangue bovino. O conteúdo protéico e o teor de ferro foram 1,6 e 8 vezes, respectivamente, maiores do que o controle não fortificado. Esses resultados, segundo estes autores, conferem ao concentrado de ferro um uso promissor na fortificação de biscoitos para a prevenção de deficiência de ferro, uma vez que a absorção de ferro heme, por humanos, é 2 a 6 vezes maior do que a do ferro inorgânico, normalmente usado para esse fim.

2.8. Utilização do monóxido de carbono em carnes e produtos cárneos

2.8.1. Efeito sobre a cor

A carboxiemoglobina (COHb) é um pigmento de cor-vermelho claro brilhante, originado pela reação entre a hemoglobina (Hb) e o monóxido de carbono (CO), que poderia, potencialmente, resolver o problema da cor escura dos produtos formulados com sangue.

ANTONINI e BRUNORI (1971) asseguraram que a estabilidade do pigmento COHb é devida à alta afinidade da Hb (200 vezes superior à afinidade do oxigênio “in vivo”) pelo CO e à baixa constante de dissociação, especialmente na ausência de O_2 , o que poderia garantir uma ligação forte durante a formação do pigmento.

Segundo LIVINGSTON e BROWN (1981) e GIDDINGS (1977), o CO se dissocia da Hb mais devagar que o O_2 (cerca de 1.000 vezes) e confere estabilidade para o ferro se manter no estado de oxidação Fe^{+2} , sendo o complexo diamagnético resultante completamente inerte às reações com moléculas paramagnéticas.

De acordo com WOLFE (1980), o pigmento carboximioglobina (COMb) é mais resistente à oxidação do que a oximioglobina (O₂Mb), devido à forte ligação do CO ao núcleo porfirínico da molécula mioglobina. Concentrações de 1-5% de CO aumentam a redução da metamioglobina, em presença de ar (LANIER et al., 1978).

Baseado nesses princípios, FONTES (1999) e FONTES et al. (2004) testaram a estabilização da hemoglobina pela saturação do sangue com monóxido de carbono, verificando que o sangue líquido, desidratado ou não, apresenta coloração mais agradável e estável que o sangue não-tratado. Dando continuidade a esta pesquisa, PEREIRA (2000) avaliou a estabilidade física (coloração) de um embutido cárneo emulsionado (mortadelas) formulado pela substituição de carne por diferentes concentrações de sangue fresco ou tratado com monóxido de carbono. Os resultados mostraram que as alterações de cor, ainda que inferiores às provocadas pela adição de sangue fresco (não-tratado), poderiam causar restrição do consumidor ao produto, se este for apresentado com denominação semelhante à dos existentes no mercado. Assim, seria interessante utilizar outra denominação para o produto formulado com sangue tratado com CO.

Alguns autores (WOLFE, 1980; KARMAS, 1975; EL-BADAWI et al., 1964) propuseram o uso de CO como atmosfera modificada para a embalagem de carnes, a fim de evitar alterações de cor indesejáveis e aumentar a vida-de-prateleira. Entretanto, tal fato tem ganhado mais notoriedade com o surgimento de novas pesquisas (VIANA et al., 2005; JOHN et al., 2005; KRAUSE et al., 2003; JAYASINGH et al., 2001; LUÑO et al., 2000; SØRHEIM et al., 1999; 1997).

De acordo com SØRHEIM et al. (1997), o desafio do uso de atmosfera modificada em carnes é a estabilização da sua cor vermelha. O efeito positivo do CO na cor da carne foi conhecido e patenteado a mais de 100 anos atrás. Apesar deste conhecimento, o CO atualmente tem sido aplicado comercialmente de forma muito tímida, sendo a indústria de carnes da Noruega pioneira no uso do CO para embalagem de carnes frescas. De acordo com este autor, essa indústria de carnes

tem usado uma mistura de gás contendo 0,3-0,4% de CO, sendo que de 50 a 60% da carne vendida no comércio é embalada nesta atmosfera modificada.

Alguns autores também estudaram a exposição de carnes a 100% de CO, antes de serem embaladas a vácuo, com o objetivo de determinar a estabilidade da cor vermelha (VIANA et al., 2005; JAYASINGH et al., 2001; BREWER et al., 1994; CLARK et al., 1976).

BREWER et al. (1994) obtiveram uma estabilidade da cor vermelha de 6 semanas, quando trataram bifés de carne bovina, com 100% de CO, por 1 hora, antes de embalá-los a vácuo. Estes resultados também foram confirmados por JAYASINGH et al. (2001). Já VIANA et al. (2005), conseguiram uma estabilidade da cor vermelha de 20 dias, para bifés de carne suína expostos às mesmas condições.

Segundo SØRHEIM, et al. (1997), concentrações de 0,5 a 2,0% de CO aumentam a estabilidade da cor vermelha em carnes frescas. No entanto, SØRHEIM et al. (1999) relatam que a adição de 0,4%-1% de CO nas atmosferas modificadas utilizadas para embalar carnes é suficiente para estabilizar sua cor vermelha.

LUÑO et al. (2000) examinaram o efeito de baixas concentrações de CO na vida-de-prateleira de carne vermelha fresca. Estes autores encontraram que o uso de 0,5 a 0,75% de CO é necessário para estabilizar a cor.

Experimento conduzido por SØRHEIM et al. (1999) mostrou que a estabilidade da cor de carnes armazenadas em atmosfera modificada com CO foi melhor do que a das carnes estocadas sem CO. Segundo Aasgaard (1993), citado por SØRHEIM et al. (1997), produtos cárneos podem, também, ter os benefícios da atmosfera modificada com CO. Por exemplo, embalagem com 1% de CO e 99% de N₂, estabiliza a cor de mortadela fatiada, indicando que há ligação entre CO e mioglobina desnaturada.

Fatias de carne bovina armazenadas em atmosfera contendo 0,5% de CO mantiveram uma cor vermelha desejável por até 28 dias quando estocadas a 2°C (JAYASINGH et al., 2001). Embalagens contendo baixa percentagem de CO e alta

concentração de CO₂ também mostraram ser eficientes na melhoria da cor e aumento da vida-de-prateleira de carne de porco (KRAUSE et al., 2003).

2.8.2. Aspectos toxicológicos

O monóxido de carbono é um gás inodoro, insípido, incolor, mais leve que o ar (densidade igual a 0,967), produzido por combustão incompleta da matéria orgânica e fontes naturais (WHITE MARTINS, 1989).

Os níveis naturais de CO no ar são 0,01-0,09 mg/m³ (WHO, 1979), podendo chegar a 20 mg/m³ em áreas urbanas. De longe, a causa mais comum de elevadas concentrações de CO no sangue é a inalação da fumaça do tabaco, que variam de 3 a 6%.

O monóxido de carbono é produzido, endogenamente, no catabolismo normal da Hb e de outros compostos heme (mioglobina e citocromos) (WHITE, 1976). Estima-se que a concentração de carboxiemoglobina (COHb) formada pelo CO endógeno, em adulto sadio, varia de 0,1 a 1,0% (NAS, 1977).

O CO é o exemplo mais conhecido de agente que interfere na capacidade de transporte de oxigênio do sangue. Ele se liga, reversivelmente, à hemoglobina, com uma afinidade 250 vezes maior que o oxigênio, formando a carboxiemoglobina (STRYER, 1996; NAS, 1977; WEISSBLUTH, 1974; ANTONINI e BRUNORI, 1971).

A concentração de COHb no sangue é função da concentração de CO no ar, do tempo de exposição, do nível de atividade física do indivíduo e da suscetibilidade do indivíduo (COBURN et al., 1965). Em concentrações de aproximadamente 2,5%, indivíduos sensíveis (que sofrem de doenças cardíacas) apresentam alterações na função cardíaca e dor no tórax. Entretanto, em adultos saudáveis, nenhum efeito adverso na saúde foi descrito para níveis de COHb de até 5%. Dessa forma, níveis de COHb maiores que 2% devem ser evitados a fim de proteger os indivíduos mais vulneráveis da população (Aunan et al., 1992, citados por SØRHEIM et al., 2001).

O uso de CO em carnes ainda levanta muitas questões em relação à sua segurança toxicológica. Estudos sobre a toxicidade do CO evidenciaram que somente a sua inalação ambiental, ou de seus compostos, seriam responsáveis por envenenamentos (NAS, 1977). Na literatura, há poucas informações a respeito da toxicidade da ingestão de carnes tratadas com CO, embora cálculos estequiométricos indiquem a baixa probabilidade de problemas para a saúde (SØRHEIM et al., 1999; 1997; EL-BADAWI et al., 1964).

Baseado nestes cálculos, preconiza-se que a inalação por um período prolongado de tempo de ar contendo CO a um nível de 57 mg/m^3 (nível aceitável nos ambientes de trabalho nos Estados Unidos) fornece um nível de COHb de pelo menos 14 vezes o valor encontrado temporariamente quando se consome 225g de carne tratada com CO. Nesta estimativa, foi assumido que a saturação da mioglobina e hemoglobina da carne foi máxima e que todo o CO presente nessa carne seria absorvido pelo intestino e acumulado na corrente sangüínea (EL-BADAWI et al., 1964). Conseqüentemente, até mesmo na pior das hipóteses, o tratamento da carne com CO parece contribuir muito pouco com os níveis de COHb, em relação aos níveis que são considerados seguros no ambiente de trabalho (SØRHEIM et al., 1997).

SØRHEIM et al. (1997) afirmam que, em concentrações de 1%, o uso de CO não apresenta qualquer risco ao consumidor, porque o consumo de carne embalada em tais concentrações de CO resultará em níveis desprezíveis de COHb no sangue. Além disso, a absorção de CO no trato gastrintestinal, e seu acúmulo no sangue, serão, com toda probabilidade, menos efetivos que a absorção de CO pelos pulmões, que são compostos de tecidos especializados em facilitar a troca gasosa entre os alvéolos e o sangue.

De acordo com SØRHEIM et al. (2001), cerca de 60% da carne fresca vendida pela indústria de carnes da Noruega são embaladas em atmosfera modificada contendo CO. Apesar do conhecimento e benefícios do uso do CO em embalagens de carnes, atualmente ele não é permitido com este propósito na União Européia. A União Européia considera como aditivos os gases utilizados em

embalagens e o CO não faz parte desta lista. Esta proibição conseqüentemente será estendida à Noruega, uma vez que o país pertence à comunidade Européia e, portanto, está sujeita ao regulamento para alimentos em vigor desde 1 de julho de 2004.

Este impedimento está na contramão de seu tempo, pois configura uma posição contrária ao que foi estabelecido nos EUA, em fevereiro de 2002, quando juntamente, o USDA e o FDA aprovaram o uso de 0,4% de monóxido de carbono, em embalagens com atmosfera modificada sem oxigênio, contendo 30% de CO₂ e N₂ como gás de preenchimento (JOHN et al., 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido nos laboratórios dos Departamentos de Tecnologia de Alimentos (DTA) e de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG.

3.1. Obtenção e tratamento do sangue

Os suínos, com peso vivo entre 90 e 100 kg, foram abatidos segundo os procedimentos usuais do matadouro “Novo Suíno”, em Viçosa, MG. Após repouso, jejum e dieta hídrica de 12 horas, os animais foram submetidos a uma lavagem com água clorada, visando à redução da carga microbiana da pele dos animais. Os animais foram insensibilizados mediante choque elétrico (110V por 5 segundos), de forma a garantir que a corrente elétrica circulasse, através do cérebro, efetuando a eletronarcore. Os animais foram, então, suspensos pelas patas traseiras para início da etapa de sangria.

Uma faca côncava (faca vampiro), esterilizada, foi introduzida diretamente no sistema arterial (*Arcus aortae*) do animal. O sangue fluiu, por gravidade, através de uma mangueira plástica atóxica (Alfa Laval Agri), de grau alimentício, acoplada à faca vampiro e conectada a um latão de aço inoxidável (Alfa Laval Agri para ordenhadeira mecânica, capacidade para 20 litros), devidamente higienizado

(WISMER-PEDERSEN, 1979), ao qual se adaptou um sistema de agitação. Esse sistema fechado garantiu uma coleta asséptica do sangue, evitando-se possível contaminação por vômitos, contato com secreções de narinas e trato intestinal, contato com a pele e água de lavagem (KNIPE, 1988; OCKERMAN e HANSEN, 1994). Ao mesmo tempo, uma solução de anticoagulante, citrato de sódio tribásico (50%), foi misturada com o sangue diretamente na extremidade superior da faca (GORBATOV, 1988), para produzir uma concentração final de 5 g/L de sangue.

O tempo médio do fluxo de sangue foi de 40 segundos para cada animal (WISMER-PEDERSEN, 1979; GORBATOV, 1988), obtendo-se um volume de cerca de 2,3 litros de sangue por animal.

O latão contendo sangue foi colocado em uma caixa de isopor de 100 litros contendo gelo, por um período de uma hora, para o seu transporte e a sua utilização na fase seguinte, conduzida nos laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

O sangue, recolhido por ocasião do abate, foi filtrado por meio de um dessorador de queijos para remover coágulos de sangue ainda remanescentes, que porventura tivessem se formado.

O monóxido de carbono (grau de pureza de 99,0%, da White Martins) foi borbulhado (16 minutos, a um fluxo de 1L CO/min, para 4L de sangue) diretamente no sangue, com ajuda de um sistema provido de agitação mecânica, até que o gás saturasse totalmente a hemoglobina (100% de carboxiemoglobina), tomando-se os cuidados necessários a fim de evitar possíveis problemas pela sua inalação, conforme estabelecido por FONTES et al. (2004).

O sangue assim tratado foi mantido sob refrigeração (3°C) por cerca de 2 horas até sua utilização posterior (elaboração das formulações de mortadela).

3.2. Formulação e processamento das mortadelas

Foram formuladas mortadelas com níveis crescentes (0, 5, 10, 15 e 20%) de substituição de carne por sangue líquido tratado com monóxido de carbono (SLT).

A técnica de elaboração dos embutidos foi aquela sugerida pelo boletim técnico da ADICON (199_), tomando-se cuidados (adição de gelo, uso de matéria-prima a - 3°C) para não se exceder a temperatura crítica (16°C) no preparo da massa de emulsão. As mortadelas foram formuladas considerando carne bovina de 2ª (dianteiro - paleta e, ou músculo), toucinho e sangue como 100% da formulação; os demais ingredientes foram adicionados em relação ao peso destes, nas mesmas proporções para o controle (sem adição de sangue) e os tratamentos, conforme segue:

- T₁ – Controle: 90% de carne do dianteiro bovino, sem adição de sangue;
- T₂ – 85% de carne do dianteiro bovino, mais 5% de SLT;
- T₃ – 80% de carne do dianteiro bovino, mais 10% de SLT;
- T₄ – 75% de carne do dianteiro bovino, mais 15% de SLT;
- T₅ – 70% de carne do dianteiro bovino, mais 20% de SLT;
- Toucinho na massa - 10%.

Em relação aos ingredientes cárneos:

- Sal refinado: 2,3%;
- Proteína texturizada de soja (PTS): 4,0%;
- Amido de milho: 5,0%;
- Água/gelo: 20%;
- Temperex (MDAL 4-200 - Adicon): 0,3%;
- Sal de cura (Curatec 007 - Adtec): 0,35%;
- Fixador de cor (Fixatec A001 - Adtec): 0,25%;
- Emulsificante de gorduras (Rendfos F02 - Adtec): 0,25%.

No preparo das mortadelas, a adição dos ingredientes no *cutter* obedeceu à seguinte seqüência: a) colocaram-se carne picada resfriada (2°C), gelo e sangue (exceto controle) no *cutter* (Mainca, MD-40 BL); b) iniciou-se a cuterização, adicionando, o mais rápido possível, o emulsificante de gorduras, batendo por cerca de 30 segundos, para a sua incorporação; c) adicionou-se, então, o sal e cuterizou-se

por outros 30 segundos; em seguida, acrescentaram-se, na ordem, sal de cura, Temperex, amido de milho e proteína texturizada de soja (previamente triturada em liquidificador) e coterizou-se até que a temperatura da massa atingisse de 7 a 10°C, quando, então, foram adicionados o toucinho (triturado e resfriado) e o fixador de cor; e d) coterizou-se até que a temperatura da massa atingisse 16°C. Após o preparo das massas de mortadela, esta foi embutida em tripa de 63 mm de diâmetro (Nalobar APM 63 vermelho, marca Kalle Nalo), utilizando uma embutideira hidráulica (Mainca EM – 25) acoplada com um funil de calibre de 28 mm, de forma a obter mortadelas de 500-600 g. As mortadelas foram, então, cozidas em tacho com água aquecida, segundo a seguinte programação, determinada em ensaios preliminares: 55°C/30 minutos, 65°C/30 minutos, 75°C/30 minutos e 85°C/30 minutos, até que a temperatura da massa atingisse 74°C (medida pela inserção de um termopar no centro da massa embutida de mortadela). Em seguida, aplicou-se o choque térmico, pela imersão das mortadelas em água e gelo (0°C) por 10 minutos, acondicionando-as, sob refrigeração (4°C), para posterior análise.

3. 3. Procedimentos analíticos

Os teores de proteínas, lipídios, cinzas, umidade, carboidratos e ferro foram determinados em triplicata nas mortadelas e nas dietas experimentais utilizadas nos ensaios biológicos. O perfil de aminoácidos e o escore químico foram determinados somente para as mortadelas usando as técnicas descritas para esse tipo de análise.

3.3.1. Proteínas totais

O teor de proteína foi determinado pela quantificação do nitrogênio total da amostra, utilizando-se o destilador semimicro Kjeldhal, de acordo com o método da AOAC (1996). O teor de N foi convertido em teor de proteína multiplicando-se o valor encontrado pelo fator 6,25.

3.3.2. Lipídios totais

O teor de lipídios foi determinado pelo método intermitente de Soxhlet modificado, de acordo com a AOAC (1996), utilizando-se éter de petróleo como solvente orgânico. Após a extração, foi feita a remoção do solvente e determinou-se gravimetricamente a quantidade de lipídios presente na amostra.

3.3.3. Umidade

O teor de umidade foi determinado pelo método de secagem em estufa até peso constante, em estufa (Fanem modelo 315 SE) com circulação de ar a 105°C, conforme AOAC (1996).

3.3.4. Cinzas

A determinação do teor de cinzas das amostras de mortadela foi feita após carbonização em bico de Busen e incineração em mufla à temperatura de 550°C, até a obtenção de cinzas claras, de acordo com procedimentos da AOAC (1996).

3.3.5. Carboidratos

O teor de carboidratos foi obtido pela diferença entre o total da amostra (100%) e os teores de proteína, lipídio, umidade e cinzas.

3.3.6. Determinação de ferro

Para análise de ferro, as mortadelas e as dietas foram preparadas pela técnica de cinzas úmidas. Primeiramente, as vidrarias e utensílios utilizados na determinação do teor de ferro foram desmineralizados, utilizando-se uma solução de HCl 20%, na qual permaneceram por 24 horas, sendo, posteriormente, enxaguados, por três vezes, com água deionizada. Pesou-se 1 g de amostra, à qual se adicionaram

15 mL da mistura digestora de ácido nítrico e ácido perclórico (3:1 v/v). Este conjunto foi aquecido por 12 horas em bloco digestor Kjeldhaltherm-Gerhart, modelo KB 40S, à temperatura de 150°C, até a obtenção de uma solução cristalina e transparente. Após a digestão, a solução obtida foi transferida para balões volumétricos de 25 mL e o volume completado com água deionizada. Nas soluções minerais foram, então, analisados os teores de ferro por meio de espectrofotômetro de absorção atômica com aspiração direta em chama de ar/acetileno, modelo GBC 908-AA, no comprimento de onda de 248,3 nm (AOAC, 1996).

3.3.7. Composição em aminoácidos

Para obter o perfil aminoacídico, as mortadelas foram submetidas à hidrólise ácida com HCl 6 N a 110°C por 22 horas para determinação dos aminoácidos, exceto triptofano e aminoácidos sulfurados, segundo metodologia descrita por AOAC (1996). Para recuperação dos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) as amostras de mortadela foram oxidadas com ácido perfórmico e depois hidrolisadas com HCl 6N. Após a incubação, o ácido clorídrico foi evaporado a vácuo e os aminoácidos dissolvidos em tampão citrato de sódio 0,2N, pH 2,2. Posteriormente, os aminoácidos dissolvidos foram injetados na coluna de troca iônica, em aparelho previamente calibrado com padrão externo (Pickering catalog. 012506H), onde ocorreu a separação. O princípio da detecção dos aminoácidos foi por derivatização dos aminoácidos pós-coluna com ninidrina (2,2-dihidroxi-1,3-dionaidantina), formando um complexo colorido que foi quantificado espectrofotometricamente a 440 nm (leitura da prolina) e 580 nm (para leitura dos demais aminoácidos). O aparelho utilizado foi o Amino Acid Analyzer, modelo Hitachi L-8500 A, do laboratório da Mogiana Alimentos, em Campinas, SP, exclusivo para análises de aminoácidos. Para determinação do triptofano utilizou-se hidrólise das mortadelas com LiOH 4 N durante 24 horas a 110°C, seguido de quantificação pelo mesmo método.

3.3.8. Escore Químico (EQ)

O escore químico foi calculado pela relação entre cada um dos aminoácidos essenciais das mortadelas em estudo com os aminoácidos do padrão de referência da FAO/WHO/UNU (1985) para crianças de 2 a 5 anos, de acordo com HENLEY e KUSTER (1994). Os quocientes obtidos indicaram a ordem dos aminoácidos limitantes. O escore químico indica o menor quociente encontrado entre todos os aminoácidos essenciais; que é denominado aminoácido limitante da proteína.

$$EQ = \frac{\text{mg do aminoácido essencial por g da proteína teste}}{\text{mg do mesmo aminoácido essencial por g da proteína de referência}}$$

3.4. Avaliação da qualidade protéica da mortadela

3.4.1. Preparo das dietas

As mortadelas obtidas, conforme descrito no item 3.2, foram moídas em moedor de carne elétrico, marca PASIANI e, posteriormente, submetidas à secagem em estufa de ar circulante (FANEM 320-SE) com circulação de ar mecânica, à temperatura de $60 \pm 2^\circ\text{C}$, por período de 12 horas. As mortadelas receberam processo de secagem a fim de se obter um produto que facilitasse a incorporação das mesmas nas dietas e alcançasse maior teor de proteína, o que resultaria em dietas experimentais isoprotéicas e isocalóricas.

As mortadelas desidratadas foram trituradas em multiprocessador doméstico, marca ARNO, para obtenção de uma farinha. Estas foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos rotulados e mantidas sob refrigeração (4°C), até o preparo das dietas experimentais.

As dietas experimentais (Tabela 1) foram preparadas de modo a fornecerem entre 9 e 10% de proteína e modificadas a partir da dieta-padrão da AIN-93G (REEVES et al., 1993).

Todos os ingredientes foram pesados em balança semi-analítica e previamente misturados manualmente em vasilhames plásticos e, a seguir, em bateadeira semi-industrial, marca LIEME, por cerca de 15 minutos. Após o preparo, as dietas foram identificadas e armazenadas sob refrigeração (4°C) até o momento do consumo. As dietas foram oferecidas na forma de pó aos animais.

Após o preparo, também se determinou o teor de proteína de cada dieta, utilizando a mesma técnica citada anteriormente no item 3.3.1, para confirmação de seu teor. As dietas de mortadelas não foram acrescidas de óleo de soja, pois seus teores de lipídios forneceram 7% de lipídios na dieta. As misturas de vitaminas e de minerais foram adquiridas da empresa Rhoster - Indústria e Comércio Ltda, formuladas segundo REEVES et al. (1993).

Tabela 1 - Composição e teor de proteína das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico de avaliação da qualidade protéica das mortadelas (g/100g de mistura)

Ingredientes	Dietas						
	Aprotéica	Caseína ¹	D1	D2	D3	D4	D5
Fonte protéica	--	11,56	20,24	21,90	20,59	20,95	20,40
Maltodextrina ²	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2
Sacarose ³	10	10	10	10	10	10	10
Óleo de soja ⁴	7	7	--	--	--	--	--
Fibra ⁵	5	5	5	5	5	5	5
Mistura mineral ⁶	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura vitamínica ⁷	1	1	1	1	1	1	1
L-cistina ⁸	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de colina ⁹	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho ¹⁰	59,75	48,19	46,51	44,85	46,16	45,8	46,35
Proteína (%)	--	9,55	9,65	9,50	9,98	9,42	9,37

Adaptação da AIN-93G (REEVES et al., 1993).

D1 - dieta de mortadela, sem adição de sangue;

D2 - dieta de mortadela, com 5% de adição de sangue líquido tratado;

D3 - dieta de mortadela, com 10% de adição de sangue líquido tratado;

D4 - dieta de mortadela, com 15% de adição de sangue líquido tratado;

D5 - dieta de mortadela, com 20% de adição de sangue líquido tratado.

¹ Wenda Company Ltda/Agroquímica SP Comercial Ltda; ² Amidex 182/Corn Products Brasil; ³ Açúcar União/Comércio de Viçosa; ⁴ Óleo de soja Soya/Comércio de Viçosa; ⁵ Comprecel/ Minjtai Chemical Company Ltda, Taiwan; ^{6, 7, 8 e 9} Rhoster/Rhoster - Indústria e Comércio Ltda; ¹⁰ Maizena/Comércio de Viçosa.

3.4.2. Ensaio biológico

A avaliação da qualidade protéica das dietas experimentais foi conduzida por meio de ensaios biológicos com quarenta e dois ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe Rodentia), da linhagem Wistar, recém-desmamados com 23 dias de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e de Saúde da UFV, com peso inicial variando entre 48 e 60 g.

Para manter uma homogeneidade ponderal nos grupos, o delineamento usado no experimento foi o de blocos casualizados, descrito por BENDER et al. (1982), formando-se sete grupos de seis animais. As médias de peso obtidas para cada grupo não diferiram significativamente ($P>0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias de peso dos animais distribuídos em blocos casualizados

Animais	Dietas						
	Aprotéica	Caseína	D1	D2	D3	D4	D5
1	60	59	59	57	55	54	53
2	49	51	51	51	52	53	53
3	50	50	50	50	50	50	51
4	51	51	52	52	53	55	56
5	51	50	50	50	50	50	50
6	48	49	49	49	49	49	49
Média	51,50	51,67	51,83	51,50	51,50	51,83	52,00
Desvio-padrão	4,324	3,670	3,656	2,881	2,258	2,483	2,530

Os grupos foram compostos de dieta padrão de caseína; dieta contendo mortadela, sem adição de sangue; dieta contendo mortadela, com adição de 5% de sangue líquido tratado; dieta contendo mortadela, com adição de 10% de sangue líquido tratado; dieta contendo mortadela, com adição de 15% de sangue líquido tratado; dieta contendo mortadela, com adição de 20% de sangue líquido tratado. Um grupo recebeu dieta isenta de caseína (aprotéica) para estimativa do nitrogênio fecal endógeno.

Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente de temperatura controlada a $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ e ciclo de claro e escuro de 12 horas

controlado automaticamente, por 28 dias, durante os quais receberam água deionizada e suas respectivas dietas experimentais *ad libitum*.

O peso dos animais e seu consumo alimentar foram monitorados semanalmente, durante o período experimental. Determinou-se o coeficiente de eficiência alimentar pela expressão que relaciona o ganho de peso total dos animais (g) pelo consumo total de dieta (g).

Ao final de 14 dias, foram determinados os seguintes índices nutricionais: digestibilidade verdadeira (DV), coeficiente de eficácia protéica (PER), razão protéica líquida (NPR).

O PER foi determinado no 14^o dia do experimento com os animais, considerando-se o ganho de peso do grupo teste em relação à proteína ingerida por este. Para o cálculo do PER, foi utilizada a seguinte fórmula (HEGSTED, 1977):

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

Calculou-se o PER relativo (PERR) ao valor da caseína, dividindo-se o valor individual de cada animal pelo valor médio de PER do grupo com a dieta de caseína.

O NPR foi determinado no 14^o dia do experimento com os ratos, levando-se em consideração o ganho de peso do grupo-teste mais a perda de peso do grupo de dieta aprotéica, em relação ao consumo de proteína do grupo-teste, de acordo com a fórmula (BENDER e DOELL, 1957; FRIEDMAN, 1975; HEGSTED, 1977):

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

Calculou-se o NPR relativo (NPRR) ao valor da caseína, dividindo-se o valor individual de cada animal pelo valor médio de NPR do grupo com a dieta de caseína.

Para determinação da digestibilidade, as dietas foram marcadas com carmin (0,1g/100g) e oferecidas aos animais no 7^o e 13^o dias do experimento.

A totalidade das fezes foi coletada do 8º ao 14º dia do experimento, em recipiente individual para cada animal, e mantida sob refrigeração, sendo, posteriormente secas em estufa a 105°C, por 24h. Foram resfriadas, pesadas e trituradas em multiprocessador doméstico marca Arno, para determinação do teor de nitrogênio, semelhantemente ao relatado no item 3.3.1.

A digestibilidade verdadeira (DV) foi calculada medindo-se a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta, a quantidade excretada nas fezes e a perda metabólica nas fezes. Esta última foi estimada pela quantidade de nitrogênio excretada pelos ratos alimentados com a dieta livre de nitrogênio (aprotéica). O cálculo da digestibilidade verdadeira foi feito de acordo com a seguinte fórmula (NATIONAL..., 1963):

$$DV = \frac{I - (F - FK)}{I} \times 100$$

em que

DV = digestibilidade verdadeira;

I = nitrogênio ingerido pelo grupo com dieta teste;

F = nitrogênio fecal do grupo com dieta teste; e

FK = nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

Calculou-se a digestibilidade verdadeira relativa (DVR) ao valor da caseína, dividindo-se o valor individual de cada animal pelo valor médio de digestibilidade verdadeira do grupo com a dieta de caseína.

3.4.3. Escore químico corrigido pela digestibilidade *in vivo* (PDCAAS)

A avaliação da qualidade protéica pelo método do escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS) foi determinada por meio do procedimento proposto por HENLEY e KUSTER (1994). Para o cálculo do PDCAAS, das mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue, procedeu-se da seguinte forma:

- Determinou-se o teor de nitrogênio das amostras de mortadela;
- Calculou-se o conteúdo protéico (N x 6,25);

- Determinou-se o perfil de aminoácidos essenciais, conforme descrito no item 3.3.7;
- Determinou-se o escore químico, conforme descrito no item 3.3.8;
- Determinou-se a digestibilidade *in vivo*, conforme descrito anteriormente; e
- Calculou-se o PDCAAS multiplicando-se o escore químico mais baixo de aminoácido essencial pela digestibilidade da proteína.

3.5. Avaliação dos animais

Os animais foram avaliados por observações com relação ao comportamento (atividade/inatividade, agressividade, sedação) e condições de saúde e sintomas (diarréia, salivação, tremores, alteração de pêlos, pele e mucosas). O ganho de peso e o consumo alimentar dos animais foram registrados semanalmente.

3.5.1. Dosagem dos parâmetros bioquímicos

Finalizada a etapa experimental de 28 dias, os animais foram sacrificados, após jejum de 12 horas e insensibilização pela inalação de éter etílico (não foi utilizado CO₂ para se evitar qualquer possível alteração nos níveis sanguíneos de CO), para coleta de sangue e análise anatomopatológica. Foi realizada a incisão das cavidades abdominal e torácica, e a punção cardíaca, para coleta de sangue, utilizando-se seringas descartáveis de 10 mL para cada animal. Em seguida, o sangue foi acondicionado em tubos de coleta marca BD, tipo vacutainer, sem anticoagulante, e estocado a 4°C, até posterior centrifugação a 3.500 rpm durante 10 minutos, em centrífuga marca Beckman, para separação do soro a ser analisado. As dosagens sorológicas de albumina, creatinina, bilirrubina direta, colesterol, triacilgliceróis, glicose, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram feitas em equipamento analisador bioquímico automatizado LabQuest 0540 (Bioplus), utilizando kits da marca ANALISA DIAGNÓSTICA (ANALISA DIAGNÓSTICA, 1999).

3.5.2. Determinação dos níveis de hemoglobina

A determinação dos níveis de hemoglobina sanguínea dos animais foi feita pelo método da cianometahemoglobina (AOAC, 1996), utilizando-se o kit para diagnóstico colorimétrico *in vitro* da marca Doles (Belo Horizonte). O sangue coletado por punção cardíaca foi acondicionado em tubos de coleta marca BD tipo vacutainer, com anticoagulante heparina-Na (sal sódico da heparina), e estocado a 4°C até posterior análise. Nesse método, 20 µL de sangue foram coletados com micropipetas e, então, misturados a 5 mL de solução de cianeto e ferricianeto de potássio (solução de Drabkin), que oxida o ferro da hemoglobina (Fe^{+2}), transformando-a em metahemoglobina (Fe^{+3}) e, posteriormente, em cianometahemoglobina, cuja absorvância foi medida, a 540 nm, em espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601. A cor resultante nesta reação é de intensidade proporcional ao teor de hemoglobina no sangue.

Para o cálculo da concentração de hemoglobina nas amostras de sangue foi utilizado como referência, o valor de leitura da absorvância de uma solução padrão de hemoglobina (Doles, Belo Horizonte) de concentração correspondente a 14,3 g/dL.

3.5.3. Análise anatomopatológica

Ao final do período de 28 dias do ensaio biológico, todos os animais sacrificados com éter etílico foram necropsiados e os rins, fígado, pulmões, coração e intestino foram retirados e avaliados quanto à presença de anormalidades macroscópicas. Estes foram lavados em solução salina a 0,9% e colocados em solução tamponada de formalina a 10% (v/v).

Como não foram evidenciadas lesões macroscópicas nos órgãos citados anteriormente, nos grupos experimentais, somente o fígado e o rim direito foram pesados e processados para análise histopatológica. Os pesos de tais órgãos foram expressos em termos de percentagem do peso corporal dos respectivos animais.

O processamento para exame microscópico consistiu na desidratação em série crescente de álcoois (70, 80, 95%, absoluto I e II, absoluto/xilol), na diafanização em xilol I e II e inclusão em parafina, conforme técnicas de rotina do Laboratório de Morfofisiologia Animal do Departamento de Biologia Animal da UFV.

Durante a inclusão em parafina, os fragmentos dos tecidos foram orientados para cortes longitudinais. Três cortes semi-seriados de 4 µm de espessura, de cada amostra coletada, foram obtidos em micrótomo rotativo Olympus (CUT 4055), distendidos em banho-maria histológico OMA MJ72 e fixados em lâminas histológicas. As lâminas seguiram as etapas de desparafinização em xilol I e II, hidratação em série de álcoois, absoluto I e II, 95, 80 e 70%, coloração em hematoxilina-eosina e montagem com lamínulas e bálsamo-do-canadá..

As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópico de luz binocular Carl-Zeiss Axiolab, com aumentos de 100X, 200X e 400X.

3.6. Determinação da carboxiemoglobina

Para determinação da carboxiemoglobina, empregou-se um segundo ensaio biológico desenhado nos mesmos moldes daquele utilizado para avaliação da qualidade protéica, conforme descrito no item 3.4. Para tal, utilizaram-se 40 animais, formando-se cinco grupos com 8 animais, com peso inicial variando entre 59 e 70 gramas. Os grupos foram compostos das mesmas dietas experimentais, com exceção das dietas padrão de caseína e isenta de caseína (aprotéica). Os animais foram mantidos com as dietas experimentais, em condições adequadas, descritas no item 3.4.2, por 14 dias. Determinou-se o consumo alimentar e a evolução ponderal dos ratos com pesagem no início, semanalmente e ao final do experimento. Ao final desse período, todos os animais foram sacrificados com éter etílico e o sangue foi retirado por punção cardíaca e acondicionado em tubos de coleta marca BD tipo vacutainer, com anticoagulante heparina-Na, e estocado a 4°C, até posterior análise.

3.6.1. Quantificação da carboxiemoglobina

A determinação das concentrações de carboxiemoglobina (COHb) no sangue dos animais foi feita por espectrofotometria, em espectrofotômetro Pharmacia, modelo Novaspec II, utilizando o método de BEUTLER e WEST (1984).

Foram adicionados 100 µL de sangue a 12,0 mL de solução hemolisante (tampão-fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M, pH 6,85, diluído de 1:10 com água deionizada), em tubo de ensaio (110 x 13 mm). O tubo foi tampado e homogeneizado por duas a três inversões e deixado em repouso por 10 minutos. Pipetaram-se 200 µL desta solução para um tubo de ensaio (77 x 10 mm) contendo 2,3 mL de solução redutora (25 mg de ditonito de sódio adicionado a 20 mL de tampão fosfato, pH = 6,85), preparada imediatamente antes do uso. Novamente, o tubo foi tampado e homogeneizado por duas a três inversões e deixado em repouso por 10 minutos, após o que as absorvâncias foram lidas em 420 e 432 nm, usando-se a solução redutora como referência.

A concentração de COHb foi obtida pela equação

$$\% \text{COHb} = \frac{1 - (\text{AR} \times F_1)}{\text{AR} (F_2 - F_1) - F_3 + 1} \times 100$$

em que

AR é a razão entre as absorvâncias da solução a 420 e 432 nm;

$F_1 = 1,301$, $F_2 = 0,491$ e $F_3 = 1,977$ representam a razão das absorvâncias das soluções com 100% de hemoglobina reduzida (HbR) e 100% de COHb, em 420 e 432 nm. Esses fatores foram calculados para o espectrofotômetro utilizado, conforme descrito por FONTES (1999).

3.7. Biodisponibilidade de ferro em mortadelas

A metodologia, empregada para a determinação da biodisponibilidade de ferro, foi baseada no modelo de recuperação dos níveis de hemoglobina em ratos

anêmicos (AOAC, 1996). Este procedimento experimental foi dividido em duas fases distintas. A primeira, com duração de 21 dias, visou obter ratos anêmicos e denominou-se fase de depleção. A segunda, desenvolvida durante 14 dias, teve por objetivo a recuperação dos níveis de hemoglobina dos ratos anêmicos, utilizando-se as dietas experimentais (fase de repleção).

3.7.1. Preparo das dietas

As dietas-teste foram preparadas de acordo com a dieta padrão para roedores AIN-93G, segundo REEVES et al. (1993). A composição percentual dos ingredientes, utilizados na preparação da dieta basal, oferecida aos animais na fase de depleção, está apresentada na Tabela 3. A composição da mistura vitamínica foi baseada na dieta AIN-93G-VX (REEVES et al., 1993), adquirida da empresa Rhoster - Indústria e Comércio Ltda. A composição da mistura mineral foi baseada também na dieta AIN-93G-MX (REEVES et al., 1993), porém sem a fonte de ferro.

Tabela 3 - Composição percentual da dieta basal oferecida aos ratos na fase de depleção

Ingredientes	g/100g de mistura
Caseína ¹	20,0
Maltodextrina ²	13,2
Sacarose ³	10,0
Óleo de soja ⁴	7,0
Fibra (celulose microfina) ⁵	5,0
Mistura de minerais sem a fonte de ferro ⁶	3,5
Mistura de vitaminas ⁷	1,0
L-cistina ⁸	0,3
Bitartarato de colina ⁹	0,25
Amido de milho ¹⁰	39,75

Fonte: REEVES et al. (1993).

¹ Wenda Company Ltda/Agroquímica SP Comercial Ltda; ² Amidex 182/Corn Products Brasil; ³ Açúcar União/Comércio de Viçosa; ⁴ Óleo de soja Soya/Comércio de Viçosa; ⁵ Comprecel/ Minjtai Chemical Company Ltda, Taiwan; ⁶ Laboratório de Nutrição Experimental – UFV; ^{7, 8 e 9} Rhoster/Rhoster - Indústria e Comércio Ltda; ¹⁰ Maizena/Comércio de Viçosa.

As dietas experimentais, utilizadas na fase de repleção, foram preparadas, variando a fonte (sulfato ferroso e mortadelas adicionadas de níveis crescentes de

sangue) e a concentração de ferro (6, 12 e 24 mg de ferro/kg de dieta). Foram preparadas 18 dietas (Tabela 4) isoprotéicas e isocalóricas, que constituíram os tratamentos avaliados.

Tabela 4 - Composição das dietas experimentais oferecidas aos ratos na fase de repleção (g/kg de mistura)

Ingredientes	Dietas																	
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18
Caseína ¹	216,42	216,42	216,42	144,15	72,54	---	174,23	132,03	47,65	183,39	150,35	84,28	194,96	173,49	130,57	198,71	181,00	145,59
0% sangue	---	---	---	120,00	240,00	480,00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
5% sangue	---	---	---	---	---	---	71,43	142,86	285,71	---	---	---	---	---	---	---	---	---
10% sangue	---	---	---	---	---	---	---	---	---	54,89	109,79	219,58	---	---	---	---	---	---
15% sangue	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	38,66	77,32	154,64	---	---	---
20% sangue	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	31,83	63,63	127,25
FeSO ₄ .7H ₂ O ²	0,0232	0,0464	0,0954	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Maltodextrina ³	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132
Sacarose ⁴	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Óleo de soja ⁵	70	70	70	42,65	15,3	---	52,58	35,16	---	56,18	42,37	14,73	61,68	53,35	36,71	62,6	55,2	40,4
Fibra ⁶	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Mist. mineral ⁷	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Mist. vitaminas ⁸	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
L-cistina ⁹	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Bit. Colina ¹⁰	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Amido milho ¹¹	381,06	381,04	380,99	360,7	339,66	187,5	369,26	357,45	334,14	373,04	364,99	348,91	372,20	363,34	345,58	374,38	367,66	354,26

* Mistura de minerais AIN-93G-MX isenta de ferro (REEVES et al., 1993).

0% sangue - mortadela sem adição de sangue; **5% sangue** - mortadela com 5% de adição de sangue; **10% sangue** - mortadela com 10% de adição de sangue; **15% sangue** - mortadela com 15% de adição de sangue; e **20% sangue** - mortadela com 20% de adição de sangue.

D1- Dieta de sulfato ferroso, contendo 6 ppm de Fe; **D2** - Dieta de sulfato ferroso, contendo 12 ppm de Fe; **D3** - Dieta de sulfato ferroso, contendo 24 ppm de Fe; **D4** - Dieta de mortadela, sem adição de sangue, contendo 6 ppm de ferro; **D5** - Dieta de mortadela, sem adição de sangue, contendo 12 ppm de ferro; **D6** - Dieta de mortadela, sem adição de sangue, contendo 24 ppm de ferro; **D7** - Dieta de mortadela, com 5% de adição de sangue, contendo 6 ppm de ferro; **D8** - Dieta de mortadela, com 5% de adição de sangue, contendo 12 ppm de ferro; **D9** - Dieta de mortadela, com 5% de adição de sangue, contendo 24 ppm de ferro; **D10** - Dieta de mortadela, com 10% de adição de sangue, contendo 6 ppm de ferro; **D11**- Dieta de mortadela, com 10% de adição de sangue, contendo 12 ppm de ferro; **D12** - Dieta de mortadela, com 10% de adição de sangue, contendo 24 ppm de ferro; **D13** - Dieta de mortadela, com 15% de adição de sangue, contendo 6 ppm de ferro; **D14** - Dieta de mortadela, com 15% de adição de sangue, contendo 12 ppm de ferro; **D15** - Dieta de mortadela, com 15% de adição de sangue, contendo 24 ppm de ferro; **D16** - Dieta de mortadela, com 20% de adição de sangue, contendo 6 ppm de ferro; **D17** - Dieta de mortadela, com 20% de adição de sangue, contendo 12 ppm de ferro; e **D18** - Dieta de mortadela, com 20% de adição de sangue, contendo 24 ppm de ferro.

¹ Wenda Company Ltda/Agroquímica SP Comercial Ltda; ² Vetec/Vetec; ³ Amidex 182/Corn Products Brasil; ⁴ Açúcar União/Comércio de Viçosa; ⁵ Óleo de soja Soya/Comércio de Viçosa; ⁶ Compregel/ Minjtai Chemical Company Ltda, Taiwan; ⁷ Laboratório de Nutrição Experimental – UFV; ^{8, 9 e 10} Rhoster/Rhoster - Indústria e Comércio Ltda; ¹¹ Maizena/Comércio de Viçosa.

A concentração de ferro das mortadelas, da caseína e das dietas experimentais foi determinada conforme descrito no item 3.3.6.

As dietas experimentais utilizadas para este ensaio foram preparadas com as mortadelas elaboradas, desidratadas e trituradas de acordo com os procedimentos dos itens 3.2 e 3.4.1.

Todos os ingredientes foram pesados em balança semi-analítica e previamente misturados manualmente em vasilhames plásticos enxaguados com água deionizada, e a seguir em batedeira semi-industrial, marca LIEME, por cerca de 15 minutos. Após o preparo, as dietas foram identificadas e armazenadas sob refrigeração até o momento do consumo. As dietas foram oferecidas na forma de pó aos animais.

3.7.2. Ensaio biológico

Foram utilizados 180 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe Rodentia), da linhagem Wistar, recém-desmamados com 23 dias de idade, provenientes do biotério central do Centro de Ciências Biológicas e de Saúde da UFV, com peso inicial variando entre 48 e 60 g.

Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente de temperatura controlada a $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ e ciclo de claro e escuro de 12 horas controlado automaticamente.

O ensaio biológico foi realizado em duas fases (depleção e repleção), totalizando-se 35 dias de experimentação.

3.7.2.1. Fase de depleção

Durante 21 dias, todos os animais receberam dieta adaptada da AIN-93G (Tabela 3), isenta em ferro e água deionizada *ad libitum*, com o objetivo de induzir anemia ferropriva. Ao término do período de depleção, coletou-se o sangue por gotejamento, em vidro de relógio, após incisão da porção terminal da cauda dos animais. O nível de hemoglobina foi determinado pelo método da

cianometaemoglobina (item 3.5.2). Foi também determinado o valor do hematócrito por centrifugação, utilizando-se o micrométodo (NELSON e MORRIS, 1995). O sangue foi coletado diretamente do extremo terminal da cauda por capilaridade. Após centrifugação, por 5 minutos a 8.000 rpm, o comprimento da coluna de sangue, incluindo o plasma e da coluna de eritrócitos isolada foi comparado a um gabarito com escala graduada, obtendo-se, assim, o valor de hematócrito, conforme as instruções do fabricante do aparelho utilizado (Centrífuga de bancada – Microhematócrito, SIGMA 1-15). No primeiro dia dessa fase também foi retirado sangue de oito animais escolhidos aleatoriamente para estimar o nível basal de hemoglobina.

O peso dos animais e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente.

3.7.2.2. Fase de repleção

Nessa fase, 144 animais anêmicos (cujo nível médio de hemoglobina estava em $6,42 \pm 0,620$ g/dL de sangue) foram selecionados, dentre os 180 iniciais, e divididos em 18 grupos experimentais, de acordo com a concentração de hemoglobina, com oito animais cada um, de maneira que as médias dos grupos nesses parâmetros fossem as mais próximas possíveis. Na fase de recuperação da anemia, foram fornecidas 18 dietas, conforme descritas no item 3.7.1. A fonte de ferro da mistura de minerais foi retirada para que este mineral fosse devidamente monitorado.

O estudo de repleção teve duração de 14 dias, medindo-se, ao final deste período, o nível de hemoglobina e de hematócrito. O ganho de hemoglobina dos animais foi calculado pela diferença entre os valores obtidos nas fases inicial e final do período de repleção.

Durante esta fase, as dietas-teste foram pesadas diariamente e administradas aos animais de forma controlada (18 g/dia), e a água deionizada oferecida *ad libitum*. O ganho de peso e o consumo alimentar foram registrados semanalmente, de forma a se obter o coeficiente de eficiência alimentar (CEA).

3.7.2.3. Eficiência na recuperação de hemoglobina (HRE)

A utilização biológica do ferro, para os níveis de ferro determinados na dieta, foi obtida de acordo com o método de eficiência na recuperação de hemoglobina (HRE%), proposta por MAHONEY et al. (1974), usando a seguinte expressão:

$$\text{HRE} = \frac{\text{mg HbFe (Final)} - \text{mg HbFe (Inicial)}}{\text{mg Fe Consumido}} \times 100,$$

em que

mg HbFe = peso corporal (g) x 0,067 mL de sangue/g de peso corporal x g Hb/mL sangue x 3,35 mg Fe/g Hb.

3.8. Biodisponibilidade de ferro em mortadela com e sem nitrito

A biodisponibilidade de ferro dessas mortadelas com e sem nitrito foi avaliada para se verificar a possível influência desse composto na absorção de ferro pelos animais. Em face dessa hipótese, foi conduzido um novo ensaio biológico, segundo a mesma metodologia descrita no item 3.7. Optou-se por usar somente a mortadela adicionada de 20% de sangue tratado com CO, uma vez que esse tratamento é o que permite a maior adição de sangue.

Para este ensaio, as dietas experimentais, utilizadas na fase de repleção, foram preparadas, variando a fonte (sulfato ferroso e mortadelas com e sem nitrito, adicionadas de 20% de sangue) e a concentração de ferro (6, 12 e 24 mg de Ferro/kg de dieta). Foram preparadas 9 dietas (Tabela 5) isoprotéicas e isocalóricas, que constituiriam os tratamentos avaliados.

Para a fase de depleção foram utilizados 96 ratos machos, com peso inicial variando entre 50 e 64 gramas. Na fase de repleção, 72 animais (cujo nível médio de hemoglobina estava em $8,41 \pm 1,241$ g/dL de sangue) foram selecionados, dentre os 96 iniciais, e divididos em 9 grupos experimentais, de acordo com a concentração

de hemoglobina, com oito animais cada um, de maneira que as médias dos grupos nesses parâmetros fossem as mais próximas possíveis. Na fase de recuperação da anemia, foram fornecidas 9 dietas com diferentes níveis (6, 12 e 24 mg ferro/kg de dieta) e fontes de ferro (sulfato ferroso - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e mortadelas com e sem nitrito, adicionadas de 20% de sangue tratado com monóxido de carbono), conforme mencionadas anteriormente.

O estudo de repleção teve duração de 14 dias, medindo-se, ao final deste período, o nível de hemoglobina e de hematócrito, conforme indicado no item 3.7.2.1.

Tabela 5 - Composição das dietas experimentais oferecidas aos ratos na fase de repleção (g/kg de mistura) do segundo ensaio de biodisponibilidade

Ingredientes	Dietas								
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Caseína	216,42	216,42	216,42	189,47	162,52	108,6	190,27	164,12	111,81
Sem nitrito	---	---	---	46,18	92,36	184,82	---	---	---
Com nitrito	---	---	---	---	---	---	44,22	88,44	176,89
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,050	0,100	---	---	---	---	---	---
Amido dextrin.	132	132	132	132	132	132	132	132	132
Sacarose	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Óleo de soja	70	70	70	59,09	48,18	26,36	59,54	49,09	28,18
Fibra	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Mist. mineral *	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Mist. vitaminas	10	10	10	10	10	10	10	10	10
L-cistina	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Bit. Colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Amido milho	381,06	381,03	380,98	372,76	364,43	347,93	373,46	365,85	350,62

* Mistura de minerais AIN-93G-MX isenta de ferro.

Sem nitrito - mortadela sem nitrito, com 20% de adição de sangue.

Com nitrito - mortadela com nitrito, com 20% de adição de sangue.

D1- Dieta de sulfato ferroso, contendo 6 ppm de Fe; **D2** - Dieta de sulfato ferroso, contendo 12 ppm de Fe; **D3** - Dieta de sulfato ferroso, contendo 24 ppm de Fe; **D4** - Dieta de mortadela sem nitrito, contendo 6 ppm de ferro; **D5** - Dieta de mortadela sem nitrito, contendo 12 ppm de ferro; **D6** - Dieta de mortadela sem nitrito, contendo 24 ppm de ferro; **D7** - Dieta de mortadela com nitrito, contendo 6 ppm de ferro; **D8** - Dieta de mortadela com nitrito, contendo 12 ppm de ferro; **D9** - Dieta de mortadela com nitrito, contendo 24 ppm de ferro.

3.9. Análise estatística

Para as análises de teor de ferro e composição centesimal, os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os

dados foram interpretados por meio de análise de variância e regressão utilizando o teste F ao nível de 5% de probabilidade.

Os ensaios experimentais para qualidade protéica, índice bioquímico e análise de peso dos órgãos foram instalados no delineamento em blocos casualizados, tendo como fonte de variação: blocos (ratos) e dietas formuladas com caseína e mortadelas com níveis crescentes de adição de sangue (0, 5, 10, 15 e 20%). Os dados obtidos foram interpretados por meio de análise de variância e as médias dos grupos experimentais foram comparadas com a dieta-padrão (caseína) pelo teste de Dunnett, adotando-se 5% de probabilidade.

Os resultados foram interpretados por análise de variância e regressão, utilizando o teste F ao nível de 5% de probabilidade, para os fatores quantitativos, sem a presença da caseína, no delineamento em blocos casualizados, tendo como fonte de variação: blocos (ratos) e dietas de mortadela contendo níveis crescentes de adição de sangue.

A análise de carboxiemoglobina procedeu-se no delineamento em blocos casualizados, tendo como fonte de variação: blocos (rato) e dietas de mortadela contendo níveis crescentes de adição de sangue. Os dados foram interpretados por meio de análise de variância e regressão utilizando o teste F ao nível de 5% de probabilidade.

O ensaio biológico da disponibilidade de ferro foi montado segundo um esquema fatorial (3x6) sendo 3 níveis de ferro (6, 12 e 24 ppm) e 6 dietas formuladas com sulfato e mortadelas com diferentes níveis de sangue. Os 18 tratamentos foram dispostos no delineamento em blocos casualizados, com 8 repetições, tendo com fonte de variação: blocos (ratos), ferro, dietas e ferro*dieta. Os resultados foram interpretados por meio de análise de variância e regressão utilizando o teste F ao nível de 5% de probabilidade. Para um mesmo nível de ferro, as médias foram comparadas utilizando teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SAS (Statistical Analysis System - SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), versão 8.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teores de proteínas, lipídios e ferro nas mortadelas

Os teores médios (\pm desvio-padrão) de proteína e lipídio das mortadelas adicionadas de sangue foram 16,45 ($\pm 0,655$) e 7,97 ($\pm 0,263$) g/100g, respectivamente. A composição protéica e lipídica das mortadelas não alterou significativamente ($P > 0,05$), com os diferentes níveis de adição de sangue, devido ao fato de o sangue animal apresentar composição semelhante à da carne (GORBATOV, 1988), sendo inclusive conhecido como “a carne líquida”, com teor de proteína (18,5%) semelhante ao da carne bovina (ABERLE et al., 2001).

A exemplo do verificado por PEREIRA (2000), a concentração de sangue adicionada influenciou ($P < 0,05$) o teor de ferro das mortadelas (Figura 3).

O aumento no teor de ferro total com aumento nos níveis de adição de sangue é óbvio, já que o sangue contém, em média, 300 mg de ferro/kg, comparado com 26 mg de ferro/kg da carne bovina (GORBATOV, 1988; OELLINGRATH e SLINDE, 1985). Assim, 1% de substituição de carne por sangue na formulação das mortadelas causaria aumento na concentração de ferro na mortadela de 23,4 para 26,14 mg/kg.

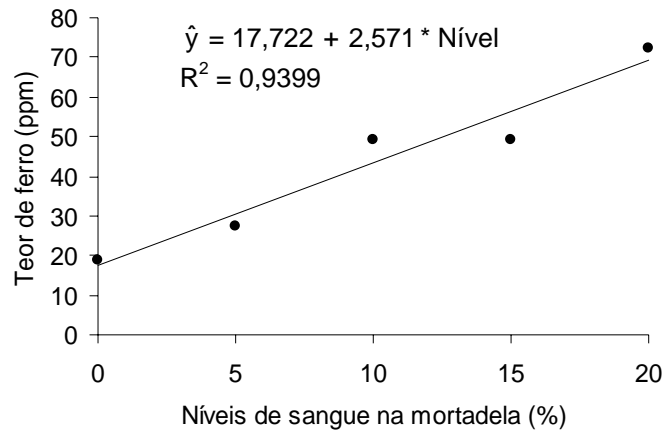


Figura 3 - Variação das médias do teor de ferro da mortadela adicionada de sangue.

Observa-se que cada 1% de sangue adicionado à mortadela eleva a concentração de ferro em 2,57 mg/kg. Ao efetuar os cálculos para os diferentes níveis de adição, conforme anteriormente executado, nota-se coerência no comportamento dos dados, uma vez que, com base nestes cálculos e nos valores médios de ferro na carne e no sangue, esperava-se encontrar as seguintes concentrações de ferro nas mortadelas: 37,10; 50,80; 64,50; e 78,20 mg/kg, para os níveis de substituição de carne por sangue de 5, 10, 15 e 20%, respectivamente.

Esses resultados mostram que a elaboração de mortadelas com sangue representa um potencial para a redução de anemia ferropriva, em especial das populações mais carentes, principalmente tendo em vista a presença de ferro heme no sangue (HIGGS, 2000; GARCIA et al., 1996).

Segundo SLINDE e MARTENS (1982), o sangue contém altos teores de ferro, e a utilização de 1% de sangue em produtos cárneos aumenta o conteúdo de pigmento (hemoglobina) em aproximadamente 1.500 mg/kg, aumentando a disponibilidade de ferro.

4.2. Composição de aminoácidos das mortadelas formuladas e PDCAAS

Uma proteína balanceada é aquela que, quando oferecida em quantidades usuais, é capaz de fornecer os aminoácidos essenciais nas quantidades necessárias. O balanço aminoacídico de uma proteína tem importância fundamental visto que os

aminoácidos ingeridos na dieta irão, na sua maioria, para a síntese de outras proteínas (BÓS et al., 2000).

Os valores encontrados para a composição aminoacídica das mortadelas formuladas com diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição de aminoácidos (mg/g de proteína)^a das mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue e escore químico (%)

Aminoácidos	0% sangue	5% sangue	10% sangue	15% sangue	20% sangue	Padrão FAO ^b	Carnes curadas e processadas ^d
Essenciais							
Fenilalanina + tirosina	82,28	76,1	83,7	84,9	89,3	63	69
Histidina	36,7	35,61	37,59	40,37	43,82	19	28
Isoleucina	53,28	49,59	49,41	50,68	50,57	28	49
Leucina	71,77	66,84	77,49	82,23	87,25	66	74
Lisina	84,2	76,53	83,53	86,34	87,09	58	74
Metionina + cistina	38,53	31,88	34,99	40,51	26,07	25	37
Treonina	45,87	41,78	43,7	39,36	40,3	34	39
Triptofano	11,51	11,2	11,23	11,57	12,38	11	10
Valina	57,99	59,84	64,26	68,04	70,46	35	52
Não-essenciais							
Alanina	46,15	44,86	47,85	45,81	52,97		
Arginina	61,55	53,14	57,71	57,05	59,79		
Ácido aspártico	98,28	96,52	102,25	89,79	96,81		
Ácido glutâmico	134,9	123,86	122,73	109,31	117,36		
Glicina	74,42	74,27	70,96	66,36	75,58		
Prolina	40,99	43,99	43,18	36,38	45,77		
Serina	39,55	35,39	39,74	35,18	36,25		
Escore Químico (%)	104,64	101,27	102,09	105,18	104,28		
Aminoácido limitante ^c	Trp	Leu	Trp	Trp	Met+Cys		

^a Valores são médias de duas determinações.

^b Padrão de referência protéica FAO/WHO/UNU (1985) (necessidade de aminoácidos essenciais para crianças de 2 a 5 anos de idade).

^c Trp (triptofano); Leu (leucina); e Met+Cys (metionina+cistina).

^d PRICE e SCHWEIGERT (1994).

Pode-se notar que o perfil de aminoácidos essenciais das mortadelas supera, em todos os aminoácidos, as quantidades recomendadas pela FAO/WHO/UNU para crianças na faixa etária de 2 a 5 anos. A quantidade de aminoácidos essenciais das diferentes mortadelas variou de 48,8 a 53,4% do conteúdo total de aminoácidos. De modo geral, os teores de aminoácidos das cinco mortadelas estudadas neste trabalho mostraram-se semelhantes entre si, ou seja, a composição de aminoácidos essenciais e não-essenciais das mortadelas é praticamente a mesma. As mortadelas são excelentes fontes de lisina, leucina e histidina. Apresentam, ainda, elevados níveis de ácido aspártico e glutâmico que, segundo PRICE e SCHWEIGERT (1994), é uma característica comum aos produtos cárneos processados e curados.

O escore químico possibilita verificar qual dos aminoácidos essenciais se encontra em teor mais deficiente, em relação ao valor recomendado. Esse aminoácido recebe o nome de limitante, ou primeiro limitante. Definem-se também o segundo e o terceiro limitante, uma vez presentes em quantidades deficitárias, em relação ao padrão-referência. O escore é definido para aquele que apresentar maior deficiência (PELLET e YOUNG, 1980).

Verifica-se que as mortadelas, apesar de formuladas com adição de sangue, não apresentaram aminoácidos limitantes, visto que o escore químico é superior a 100%. Nota-se, também, que a adição de níveis crescentes de sangue praticamente não provocou aumento ou diminuição no valor do escore.

Embora o sangue possa apresentar deficiência em metionina e, especialmente, em isoleucina (OCKERMAN e HANSEN, 1994; KNIPE, 1988; SATTERLEE, 1975), a substituição de carne por sangue líquido tratado com CO não afetou o perfil de aminoácidos das mortadelas formuladas, principalmente no que diz respeito a esses dois aminoácidos. Isso indica que a combinação das proteínas da carne com as proteínas do sangue manteve as quantidades adequadas dos aminoácidos essenciais e não-essenciais. Nesse sentido, mesmo com 20% de adição de sangue, o elevado teor desses dois aminoácidos na carne permitiu que o padrão da FAO ainda fosse atingido apesar das deficiências de metionina e isoleucina no sangue.

De acordo com NEELAKANTAN (1975), o sangue quando usado como única fonte de proteína pode não promover o crescimento, o desenvolvimento e outras funções biológicas no rato. Segundo PRICE e SCHWEIGERT (1994), a carne e a maioria dos produtos cárneos contêm porcentagens relativamente altas destes componentes essenciais, além de suas proporções na carne atenderem facilmente as exigências nutricionais. Assim, a adição de sangue às mortadelas possibilitou a obtenção de produtos com o mesmo perfil de aminoácidos (qualidade), sem redução do teor protéico (quantidade).

Quando comparadas com a composição de aminoácidos de carnes curadas e processadas (PRICE e SCHWEIGERT, 1994), as diversas mortadelas elaboradas com sangue mostraram resultados semelhantes (Tabela 6).

Em muitos casos encontram-se correlações positivas e significativas entre o escore químico e os índices de valor protéico determinados por ensaios biológicos, porém, em outros não. Aparentemente, as discrepâncias que surgem são devidas a diferenças na composição dos alimentos e nas transformações que as proteínas podem sofrer durante o preparo do alimento para o consumo e no próprio organismo, principalmente na digestão e absorção dos aminoácidos. Em outras palavras, a determinação da concentração de aminoácidos na proteína ou no alimento, por métodos químicos, não garante que tais aminoácidos estejam disponíveis biologicamente (SGARBIERI, 1987).

A FAO/WHO (1990) considera o escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS) um índice mais apropriado para avaliar a qualidade protéica em alimentos e fórmulas infantis. Esse índice utiliza as necessidades dos aminoácidos essenciais para humanos, sendo mais apropriado quando comparado com os ensaios em animais utilizados para avaliar a qualidade da proteína em alimentos.

Na Figura 4 estão apresentados o escore químico do aminoácido limitante primário (EALP) e o escore químico corrigido pela digestibilidade *in vivo* (PDCAAS), conforme Tabela 6, das proteínas das mortadelas adicionadas dos diferentes níveis de sangue. Os PDCAAS encontrados foram de 0,965 (0% de sangue), 0,917 (5% de sangue), 0,913 (10% de sangue), 0,954 (15% de sangue), e

0,936 (20% de sangue). Para todos os níveis de adição de sangue, os índices encontrados foram semelhantes ou superiores ao da carne (0,92) (HENLEY e KUSTER, 1994; FAO/WHO, 1990). Isso quer dizer que as mortadelas formuladas fornecem proteína de boa qualidade com aminoácidos essenciais na quantidade necessária. Embora não tenham sido encontradas referências acerca do PDCAAS do sangue animal, DUARTE et al. (1999) encontraram um PDCAAS de 0,96 e 0,046 para concentrado protéico de plasma e isolado protéico de globina, respectivamente.

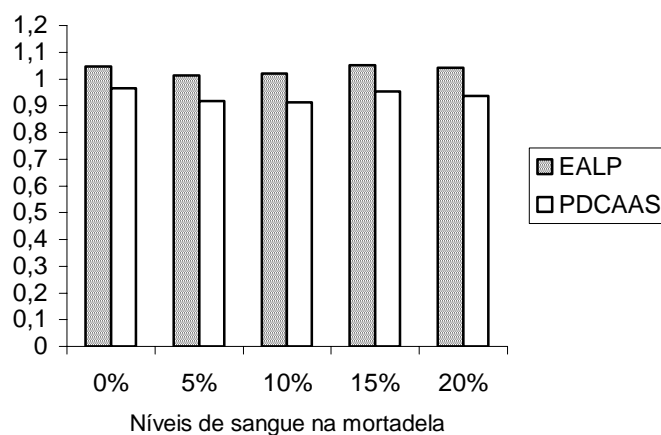


Figura 4 - Escore do aminoácido limitante primário (EALP) e escore de aminoácido corrigido pela digestibilidade *in vivo* (PDCAAS) das mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue.

4.3. Avaliação da qualidade protéica

4.3.1. Consumo de dieta e ganho de peso dos animais experimentais

Na Tabela 7 estão apresentados os valores médios das variáveis ganho de peso, consumo alimentar, proteína consumida e coeficiente de eficiência alimentar dos animais alimentados com dietas à base de caseína e de mortadelas formuladas com níveis crescentes de sangue, após 14 dias de experimento.

Tabela 7 - Valores médios (e desvios-padrão) das variáveis ganho de peso (GP), consumo alimentar (CA), proteína consumida (PC) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais alimentados com dietas à base de mortadelas formuladas com sangue e sua comparação com os valores da dieta à base de caseína, após 14 dias de experimento

Tratamento	GP (g)	CA (g)	PC (g)	CEA
Caseína	74,17 ± 5,53	191,76 ± 6,55	18,31 ± 0,63	0,39 ± 0,02
0% de sangue	73,83 ^{ns} ± 4,54	196,51 ^{ns} ± 15,57	18,96 ^{ns} ± 1,50	0,38 ^{ns} ± 0,02
5% de sangue	73,67 ^{ns} ± 3,98	202,45 ^{ns} ± 9,51	19,23 ^{ns} ± 0,90	0,37 ^{ns} ± 0,01
10% de sangue	72,17 ^{ns} ± 8,30	187,49 ^{ns} ± 17,39	18,72 ^{ns} ± 1,74	0,39 ^{ns} ± 0,02
15% de sangue	79,5 ^{ns} ± 5,10	202,59 ^{ns} ± 10,09	19,09 ^{ns} ± 0,95	0,39 ^{ns} ± 0,01
20% de sangue	69,83 ^{ns} ± 4,45	185,96 ^{ns} ± 15,72	17,42 ^{ns} ± 1,47	0,38 ^{ns} ± 0,01
dms	8,5688	20,1440	1,9445	0,0228

^{ns} Não-significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

dms - Diferença mínima significativa.

Confrontando-se os resultados das dietas formuladas com níveis crescentes de sangue e com caseína (Tabela 7), verifica-se que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) nos parâmetros avaliados. Isso comprova a eficiência que as proteínas dos 5 tratamentos possuem, para promover o crescimento e o ganho de peso dos animais. Em outras palavras, não houve perda de eficiência das dietas elaboradas com mortadela como fonte de proteína, ou seja, os tratamentos comportaram-se como a dieta-padrão de caseína, considerada uma dieta nutricionalmente completa e indicada para ratos em crescimento. Todos os tratamentos testados levaram a incrementos no ganho de peso, resultado esperado pela boa qualidade da proteína e pelo fato de as dietas experimentais terem sido elaboradas para serem isocalóricas e isoprotéicas em relação à dieta-padrão. Esse fato sugere uma adaptação dos animais ao consumo dessas dietas de mortadelas, cuja palatabilidade não influenciou na aceitabilidade das mesmas e uma boa utilização das proteínas das diferentes mortadelas. Os mesmos valores de CEA para os tratamentos ao final do período de experimento demonstraram que a proteína das mortadelas foi tão bem aproveitada biologicamente quanto a proteína padrão de caseína.

Segundo NAS-NRC (1978), o equilíbrio entre aminoácidos essenciais e não-essenciais deve ser levado em conta na dieta, já que o rato tem apetite seletivo. Assim, dietas que contêm tanto aminoácidos essenciais quanto não-essenciais, conforme observado nas diversas mortadelas formuladas, dão melhor resultado em termos de crescimento de ratos do que dietas que contêm somente aminoácidos essenciais ou excesso de aminoácidos não-essenciais. TACKMAN et al (1990) afirma que esse desbalanço resulta em alterações nas concentrações de aminoácidos do plasma e cérebro, o que conduz a ajustes na ingestão, onde o cérebro parece exercer função primordial, pois mudanças nas concentrações cerebrais de aminoácidos causadas por alterações nas concentrações plasmáticas estão relacionadas com o controle da ingestão de alimentos.

Quando se compara as mortadelas entre si, não houve efeito dos níveis ($P>0,05$) de sangue adicionados nas mesmas, para os parâmetros ganho de peso, consumo alimentar, proteína consumida e coeficiente de eficiência alimentar, cujos valores médios (\pm desvio-padrão) foram, respectivamente, de $73,80\pm 5,522$ g, $194,99\pm 12,982$ g, $18,687\pm 1,253$ g e $0,379\pm 0,015$, após o período experimental de 14 dias.

O ganho de peso, isoladamente, não é considerado um indicador da qualidade de uma proteína, embora seus resultados sejam refletidos no PER e CEA, do mesmo modo que o consumo de dieta e de proteína. Sabe-se, entretanto, que o ganho de peso pode estar relacionado à retenção de água e produção de lipídio no organismo, devido a composição do alimento recebido.

TORRES et al. (1999) avaliaram a qualidade protéica de mortadelas sem adição de sangue e adicionadas de 10% de sangue suíno em pó tratado com CO. O consumo de dieta do grupo de animais que recebeu a mortadela de sangue foi superior ao dos dois outros grupos (caseína e 10% de sangue), sendo que o menor consumo foi dos animais que receberam a dieta de caseína, após o período experimental de 14 dias. Para o parâmetro consumo de dieta, as mortadelas padrão e adicionada de sangue não diferiram entre si e apresentaram um ganho de peso ligeiramente superior ao do grupo alimentado com a dieta de caseína.

4.3.2. Valores de PER e NPR

Ao se observar os resultados apresentados na Tabela 8, verifica-se que nenhuma das mortadelas apresentou valores de PER e PERR diferentes ($P>0,05$) quando comparados com a caseína. Esse fato confirma que a alta qualidade das proteínas das mortadelas adicionadas de sangue é similar à caseína na promoção do crescimento dos animais. Além disso, a adição dos níveis crescentes de sangue, testados nesse trabalho, não provocou alteração nesses índices de qualidade protéica das mortadelas, evidenciando que a combinação de sangue mais carne parece ser tão boa quanto a carne isoladamente, do ponto de vista protéico.

Tabela 8 - Valores médios (e desvios-padrão) referentes ao PER, PERR, NPR e NPRR das dietas à base de mortadelas formuladas com sangue tratado com monóxido de carbono e sua comparação com a dieta à base de caseína

Tratamento	PER	PERR ^a (%)	NPR	NPRR ^b (%)
Caseína	4,05 ± 0,23	100 ± 0,00	4,63 ± 0,22	100 ± 0,00
0% de sangue	3,90 ^{ns} ± 0,21	96,35 ^{ns} ± 5,12	4,47 ^{ns} ± 0,24	96,50 ^{ns} ± 5,29
5% de sangue	3,83 ^{ns} ± 0,15	94,61 ^{ns} ± 3,78	4,39 ^{ns} ± 0,16	94,76 ^{ns} ± 3,47
10% de sangue	3,85 ^{ns} ± 0,19	95,13 ^{ns} ± 4,69	4,43 ^{ns} ± 0,20	95,62 ^{ns} ± 4,16
15% de sangue	4,16 ^{ns} ± 0,12	102,78 ^{ns} ± 2,96	4,87 ^{ns} ± 0,00	102,00 ^{ns} ± 2,53
20% de sangue	4,02 ^{ns} ± 0,11	99,13 ^{ns} ± 2,83	4,63 ^{ns} ± 0,16	100,02 ^{ns} ± 3,49
Dms	0,245	5,559	0,244	5,386

^{ns} Não-significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

^a PER relativo.

^b NPR relativo

dms - Diferença mínima significativa.

Segundo FRIEDMAN (1996), qualquer proteína com valor de PER igual ou superior a 2, quando adicionada na quantidade de 10% na dieta, é considerada de boa qualidade. Os valores de PER encontrados indicam que as mortadelas contêm proteínas de alto valor biológico.

Na Tabela 8 observa-se que os valores médios de PER relativo (PERR) para as dietas, tendo como fonte de proteína mortadelas com níveis crescentes de sangue,

variaram de $94,61 \pm 3,78$ a $102,78 \pm 2,96$, sendo que o valor médio de PER para a dieta a base de caseína foi de $4,05 \pm 0,23$. Esses valores são superiores aos encontrados por TORRES et al. (1999), que foi de 90,05 e 80,89% para as dietas à base de mortadela-padrão (sem adição de sangue) e adicionada de 10% de sangue tratado com CO, respectivamente, em experimento com ratos.

Não há na literatura científica dados sobre avaliação da qualidade protéica de mortadelas adicionadas de sangue integral. O que se encontra são resultados da análise das frações do sangue, como da globina e das proteínas do plasma, ou da carne.

Hendrick et al. (1977), citados por CARPENTER (1984), relataram que os valores de PER de carne bovina crua foram de 3,9 (134,5% em relação à caseína) e a mesma peça cozida, de 3,6 (124,1%).

HACKLER et al. (1984) encontraram um valor de PER de 3,18 (127,2%) para a carne bovina, enquanto JEWELL et al. (1980) obtiveram valores de PER de 2,8 (112%), 2,3 (92%) e 2,5 (100%) para as carnes bovina, bovina moída e bovina magra, respectivamente. SCHAASFSMA (2000) cita PER de 2,9 para a carne bovina.

Algumas diferenças quanto aos índices obtidos por ensaio biológico devem ser atribuídas a variações interlaboratoriais (CARPENTER, 1984), contudo os valores de PER para a carne bovina são sempre semelhantes ou superiores ao da caseína.

BELKOT (2001) avaliou o valor nutricional do sangue bovino. Os resultados indicaram que o PER do plasma (2,54) foi significativamente maior que o das células vermelhas (0,96) e foi equivalente ao da caseína (2,50). YOUNG et al. (1973) encontraram um PER para o plasma de 2,83, enquanto o da globina foi de 1,05.

A Figura 5 mostra a variação das médias do PER entre as mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue. Entre os níveis de 0, 5 e 10% de adição de sangue, os valores encontrados de PER praticamente não apresentaram variação. Quando se utilizou o nível de 15% de sangue, o valor do PER ($4,16 \pm 0,12$) foi superior aos demais níveis testados.

Entre os diversos níveis testados neste experimento, o valor máximo e mínimo estimados pelas equações (Figura 5) para o PER corresponderam aos níveis de adição de sangue nas mortadelas de 16,58 e 4,13%, respectivamente.

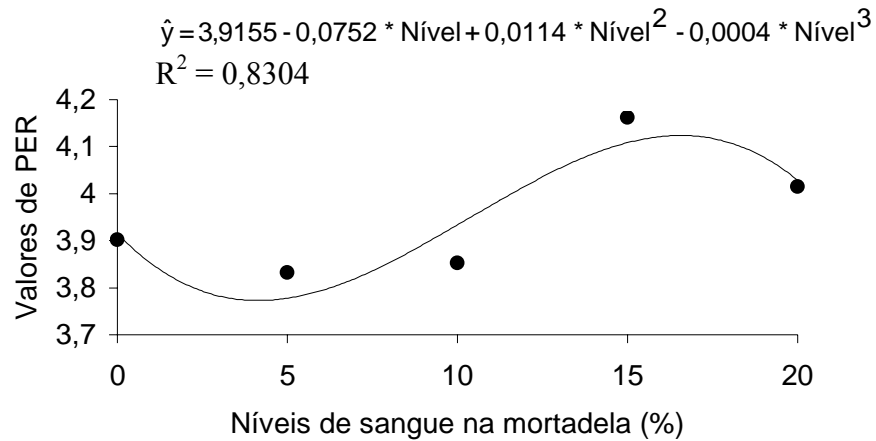


Figura 5 - Variação das médias do coeficiente de eficiência protéica (PER) das mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue tratado com monóxido de carbono.

Ao avaliar a qualidade protéica pelos índices NPR e NPRR, observa-se que diferenças significativas não foram detectadas ($P > 0,05$) entre as dietas à base de mortadela em relação à dieta de caseína (Tabela 8), não havendo influência, portanto, da adição de sangue na qualidade da proteína, no que se refere a utilização dessa proteína para manutenção e crescimento. Isto demonstra que a qualidade da proteína das mortadelas é igual à caseína na promoção do crescimento e manutenção de peso de ratos.

Na Tabela 8 observa-se que os valores médios de NPR relativo (NPRR) para as dietas, tendo como fonte de proteína mortadelas com níveis crescentes de sangue, variaram de $94,76 \pm 3,47$ a $102,00 \pm 2,53$, sendo que o valor médio de NPR para a dieta a base de caseína foi de $4,63 \pm 0,22$. Esses valores, da mesma forma que o PERR, são superiores aos encontrados por TORRES et al. (1999), que foi de 89,25 e 80,26%, em relação ao da caseína, para as dietas à base de mortadela-padrão (sem adição de sangue) e adicionada de 10% de sangue, respectivamente,

fato este explicado pelo maior teor de gordura (30%) utilizado por estes autores na formulação das mortadelas.

A Figura 6 mostra a variação das médias do NPR entre as mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue. Novamente, entre os níveis de 0, 5 e 10% de adição de sangue, os valores encontrados de NPR praticamente não apresentaram variação. Quando se utilizou o nível de 15% de sangue, o valor do NPR ($4,87 \pm 0,00$) foi superior aos demais níveis testados.

Entre os diversos níveis testados neste experimento, os valores máximo e mínimo estimados pelas equações (Figura 6) para o NPR corresponderam aos níveis de adição de sangue nas mortadelas de 16,33 e 3,95%, respectivamente.

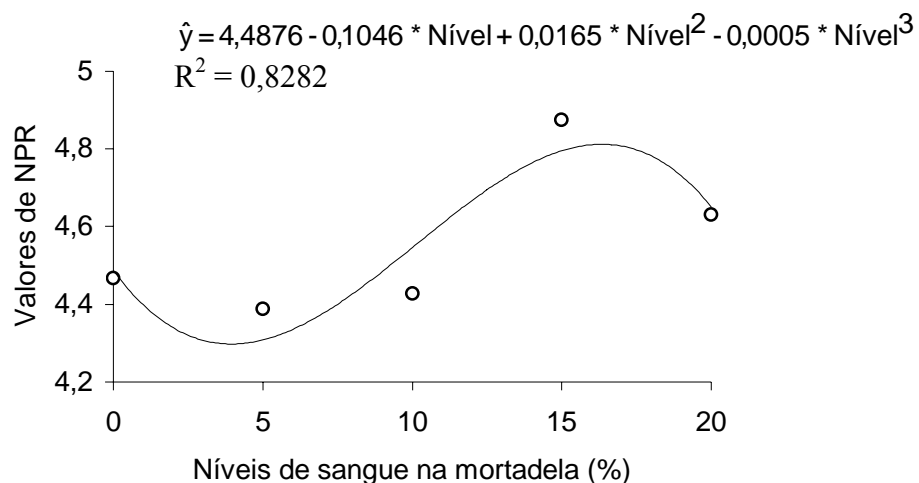


Figura 6 - Variação das médias da razão protéica líquida (NPR) das mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue tratado com monóxido de carbono.

4.3.3. Digestibilidade *in vivo*

Os valores da digestibilidade verdadeira *in vivo* para as dietas à base de caseína e das mortadelas adicionadas de sangue encontrados, no presente trabalho, estão expressos na Tabela 9.

A digestibilidade da proteína dietética tem um papel fundamental na qualidade protéica, sendo definida como a quantidade de nitrogênio do alimento que

é absorvido pelo organismo, após a hidrólise das proteínas pelas enzimas digestivas (BRESSANI e ELIAS, 1983). Mesmo que o conteúdo de aminoácidos indispensáveis seja o indicador básico da qualidade da proteína, somente se os mesmos estiverem disponíveis para a utilização pelo corpo, o perfil de aminoácidos corresponderá à qualidade da proteína, fato este dependente da digestibilidade. Portanto, a digestibilidade dos aminoácidos pode afetar a qualidade das proteínas alimentares (DAMODARAN, 1996).

A Tabela 9 mostra que a digestibilidade da dieta padrão de caseína foi superior ($P < 0,05$) à das demais dietas de mortadelas. Apesar desses resultados, os valores em torno de 90% para a digestibilidade das mortadelas contendo sangue são relativamente altos, o que, aliado ao perfil balanceado de aminoácidos, garante a alta qualidade das proteínas desses produtos. Segundo MACNURLAN e GARLICK (2000), a digestibilidade das proteínas pode ser afetada por diversos fatores, tais como a presença de fatores antinutricionais, para as proteínas de origem vegetal, conformação da proteína, processamento e interações com outros nutrientes. De forma geral, as proteínas de origem animal são mais facilmente digeríveis, apresentando valores de digestibilidade entre 90 e 99%.

Tabela 9 - Valores médios (e desvios-padrão) referentes à digestibilidade e digestibilidade relativa das dietas à base de mortadelas formuladas com sangue tratado com monóxido de carbono e sua comparação com a dieta à base de caseína

Tratamento	Digestibilidade (%)	Digestibilidade Relativa (%)
Caseína	93,99± 0,51	100 ± 0,00
0% de sangue	91,59*± 1,01	97,45* ± 1,07
5% de sangue	90,79* ± 1,10	96,59* ± 1,17
10% de sangue	89,49* ± 0,87	95,22* ± 0,92
15% de sangue	90,90* ± 1,26	96,71* ± 1,34
20% de sangue	90,03*± 0,89	95,78* ± 0,95
dms	1,477	1,564

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.
dms - Diferença mínima significativa.

TORRES et al. (1999) encontraram valores de digestibilidade de 92,3% e 92,4% para mortadelas sem adição e adicionadas de 10% de sangue, respectivamente, que não diferiram estatisticamente ($P>0,01$) do valor da dieta padrão de caseína (95,8%).

Segundo a FAO/WHO/UNU (1985), a digestibilidade verdadeira, no homem, é de $97\pm 3\%$ para a proteína do ovo, $95\pm 3\%$ para as proteínas do leite e, ou, queijo e de $94\pm 3\%$ para as proteínas de carne e, ou, peixe.

De acordo com JEWELL et al. (1980), a carne bovina magra apresenta digestibilidade de 92%, enquanto que a com médio teor de gordura apresenta 91%. Valores próximos foram encontrados por Happick et al. (1975), citados por PELLET e YOUNG (1984), os quais relataram que a carne bovina magra apresenta digestibilidade de 93%. Hendrick et al. (1977), citados por CARPENTER (1984), relataram que os valores de digestibilidade *in vivo* de carne bovina crua era de 75% (91,46%, em relação à caseína) e a mesma peça cozida, de 76% (92,68%). SARWAR et al. (1989) classificaram a carne no grupo dos alimentos que possuem entre 89 e 92% de digestibilidade. Trabalhos recentes confirmam valores de digestibilidade de 88 a 89% (HERNANDEZ et al., 1996), 90,3% (ABDEL-AZIZ et al., 1997) e 98% (SCHAASFMSMA, 2000) para a carne bovina magra.

Nota-se que os valores encontrados para a digestibilidade das mortadelas adicionadas de sangue, quando comparados aos estudos mencionados, são semelhantes.

Na Tabela 9 observa-se que os valores médios de digestibilidade relativa para as dietas, tendo como fonte de proteína mortadelas com níveis crescentes de sangue, variaram de $95,22\pm 0,92$ a $97,45\pm 1,07$, sendo que o valor médio de digestibilidade para a dieta a base de caseína foi de $93,99\pm 0,51$. Esses valores são semelhantes aos encontrados por TORRES et al. (1999), que foi de 96,35 e 96,45%, em relação ao da caseína, para as dietas à base de mortadela-padrão (sem adição de sangue) e adicionada de 10% de sangue, respectivamente.

A Figura 7 mostra a variação das médias da digestibilidade verdadeira entre as mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue. Observa-se um ligeiro decréscimo da digestibilidade com a adição crescente de sangue. Apesar de essa

diferença ter sido significativa ($P < 0,05$), os valores de digestibilidade para todos os níveis mantiveram-se altos, acima de 90%. Isso indica que as proteínas das mortadelas, com os níveis empregados neste estudo, podem ser consideradas de alta digestibilidade e de alta qualidade, visto que os aminoácidos absorvidos garantiram a síntese protéica para o crescimento (PER) e manutenção (NPR). Analisando os resultados e considerando que as proteínas do plasma sanguíneo e do isolado protéico de globina, possuem digestibilidade de 94,85% e 91,83%, respectivamente, portanto, muito semelhante às proteínas da carne bovina (DUARTE et al., 1999), era esperado que não houvesse alteração na digestibilidade com o aumento dos níveis de sangue.

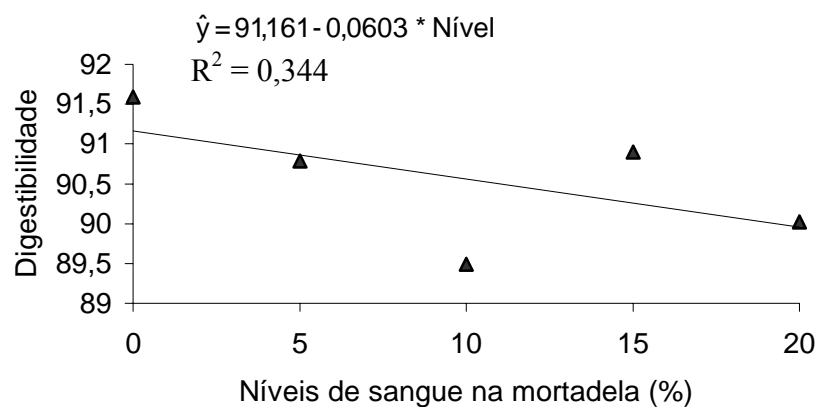


Figura 7 - Variação das médias da digestibilidade das mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue tratado com monóxido de carbono.

4.4. Avaliação dos animais

4.4.1. Avaliação comportamental

O ensaio biológico concluiu-se com 100% de sobrevivência dos animais, demonstrando a boa tolerância das mortadelas durante o período experimental. Por meio da observação dos animais durante os 28 dias experimentais, pode-se constatar que eles não apresentaram desvio de comportamento quanto à agressividade, atividade/inatividade, sedação, diarreia e alteração de pêlos e pele. Não foi

verificada reação com a ação da substância estudada (CO), mediante o consumo de dietas de mortadela com diferentes níveis de adição de sangue tratado com CO.

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

Na Tabela 10 estão apresentados os valores médios dos parâmetros ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar dos animais alimentados com dietas à base de mortadelas com níveis crescentes de sangue e caseína, após 28 dias de experimento.

Tabela 10 - Valores médios (e desvios-padrão) das variáveis ganho de peso (GP), consumo alimentar (CA) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais alimentados com dietas à base de mortadelas formuladas com sangue e sua comparação com os valores da dieta à base de caseína, após 28 dias de experimento

Tratamento	GP (g)	CA (g)	CEA
Caseína	151,00 ± 14,06	435,59 ± 23,35	0,35 ± 0,015
0% de sangue	141,83 ^{ns} ± 5,42	447,11 ^{ns} ± 25,95	0,32* ± 0,014
5% de sangue	144,83 ^{ns} ± 4,62	467,49 ^{ns} ± 7,35	0,31* ± 0,013
10% de sangue	137,67 ^{ns} ± 13,82	425,45 ^{ns} ± 29,25	0,32* ± 0,016
15% de sangue	140,50 ^{ns} ± 6,28	444,31 ^{ns} ± 14,02	0,32* ± 0,0086
20% de sangue	129,33* ± 9,24	424,46 ^{ns} ± 30,49	0,30* ± 0,011
dms	16,284	38,781	0,0209

^{ns} Não-significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

dms - Diferença mínima significativa.

A Tabela 10 mostra que o ganho de peso da dieta de caseína foi superior ($P < 0,05$) apenas ao da dieta de mortadela com 20% de adição de sangue, enquanto as demais dietas obtiveram mesmo ganho de peso do que os animais com dieta de caseína. Cabe ressaltar que, embora tenham tido um ganho de peso inferior, os ratos alimentados com dieta de 20% de sangue apresentaram a mesma tendência dos outros tratamentos, ou seja, de aumento crescente do peso corporal e do consumo

alimentar durante o estudo. Para o consumo alimentar, não houve diferença significativa ($P>0,05$), ou seja, os ratos que receberam as dietas de mortadelas ingeriram a mesma quantidade de dieta quando comparados com os animais alimentados com caseína.

O CEA da dieta de caseína foi superior ($P<0,05$), ao das demais dietas de mortadelas, evidenciando que a dieta de caseína foi capaz de promover um maior ganho de peso por grama de dieta consumida durante o período de experimentação de 28 dias.

Quando se compara entre as mortadelas, verifica-se um ligeiro decréscimo tanto no ganho de peso (Figura 8) quanto no consumo alimentar (Figura 9) com o aumento dos níveis crescentes de sangue. No entanto, o ganho de peso dos ratos foi próximo em todos os grupos e normal para ratos Wistar (GUERRA e PETERS, 1995). Todos os valores foram considerados normais para os animais, devido à média diária de ingestão alimentar de ratos, nesta idade, ser de 15 g/dia (RITSKES-HOITINGA e CHWALIBOG, 2003). Embora essa diferença significativa tenha sido notada, ela não era esperada, pois as dietas foram planejadas de forma a serem isocalóricas e isoprotéicas (REEVES, et al., 1993). Entretanto, não existe razão biológica para esta variação ser claramente atribuída à presença de sangue com CO nas mortadelas.

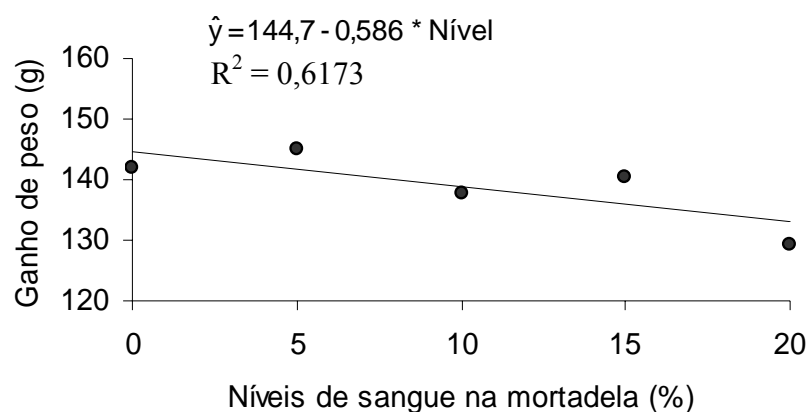


Figura 8 - Variação das médias de ganho de peso de ratos alimentados com mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.

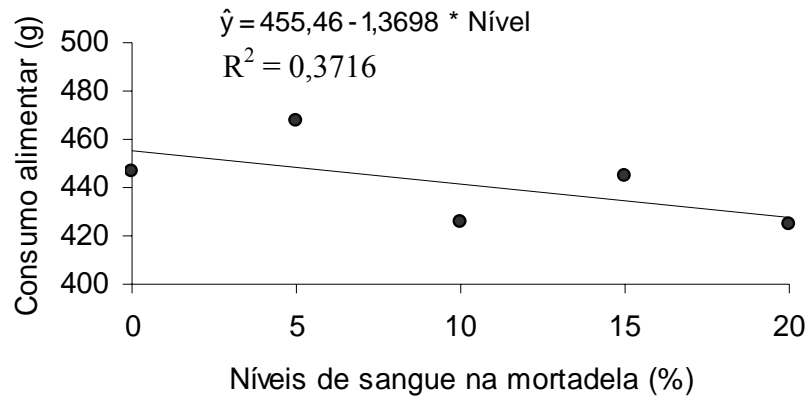


Figura 9 - Variação das médias de consumo alimentar de ratos alimentados de mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.

No que se refere ao CEA, não houve efeito dos níveis ($P > 0,05$) de sangue adicionados nas mortadelas, sendo que o valor médio foi de $0,314 \pm 0,014$, após o período experimental de 28 dias.

4.4.3. Dosagens bioquímicas

Na Tabela 11 estão apresentados os valores médios dos níveis sanguíneos de colesterol, triacilglicerol, glicose, creatinina, bilirrubina, albumina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) dos animais alimentados com dietas à base de mortadelas com níveis crescentes de sangue e caseína, após 28 dias de experimento.

Em relação ao colesterol total, os resultados mostraram que a dieta preparada com caseína alcançou média inferior ($P < 0,05$) quando comparada com os grupos que receberam dietas de mortadelas adicionadas com 10 e 20% de sangue tratado com monóxido de carbono. O grupo que recebeu dieta com 10% de sangue foi o que mais variou e teve um aumento de 31,12%, enquanto o grupo da dieta com 20% teve um aumento de 20,07% em relação à dieta de caseína. Os demais grupos não diferiram da caseína ($P > 0,05$).

Se for tomada como referência a faixa de variação de 10 a 54 mg/dL, descrita para rato normal (MITRUKA e RAWNSLEY, 1981), conclui-se que os valores encontrados são superiores e estão fora da faixa de variação normal. Apesar

dos testes estatísticos terem evidenciado diferenças, os dados significativos de aumento do colesterol total nos dois grupos de ratos (128,50 e 117,67 mg/dL) encontram-se dentro da esperada faixa de normalidade para roedores menores que 1 ano, cujos valores situam-se na faixa de $124 \pm 33,7$ mg/dL (WOLFORD et al., 1986). Entretanto, com esses resultados é possível afirmar que não houve efeito do CO sobre os níveis de colesterol, pois os dois controles (caseína e mortadela com 0% de sangue) além de não diferirem entre si, mostraram valores acima ou dentro dos considerados normais para esse índice bioquímico.

Ao se comparar os níveis séricos de glicose e de ALT, verifica-se que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre o grupo em dieta de caseína e os grupos em dieta de mortadela. Esses resultados estão dentro da faixa de valores mencionados na literatura para esses índices bioquímicos para ratos normais (MELBY Jr. e ALTMAN, 1977; MITRUKA e RAWNSLEY, 1981).

Entretanto, segundo CRISPENS Jr. (1975), o valor considerado normal para glicose é 70 mg/dL. Isso indica que a concentração sérica de glicose dos animais, inclusive os dos controles, encontra-se elevada. Uma provável explicação para este fato é que esses animais foram anestesiados com éter e nesta situação a glicemia pode tornar-se alta (LIMA et al., 1985; ALCÂNTARA, 1985). O estresse do animal durante o sacrifício provoca liberação de adrenalina, que estimula a glicogenólise e conseqüente aumento da disponibilidade de glicose para a corrente sanguínea.

Já para o AST, a dieta de caseína apresentou um nível superior ($P < 0,05$) das dietas de mortadela com 0, 15 e 20% de adição de sangue, enquanto as outras duas não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) dos animais que receberam a formulação de caseína. O grupo que recebeu a dieta de mortadela com 20% de adição de sangue foi o que mais variou em relação ao controle (caseína) e teve uma redução de 26,47%. Com isso, pode-se afirmar que tais diferenças não estão relacionadas à substância testada (CO), pois o outro controle (mortadela sem adição de sangue) apresentou resultado inferior ao valor obtido com a dieta de caseína, além do fato de não ser dose-dependente.

Tabela 11 - Valores médios (e desvios-padrão) dos níveis sanguíneos de colesterol, triacilglicerol, glicose, creatinina, bilirrubina, albumina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em ratos alimentados com dietas à base de mortadelas formuladas com sangue e sua comparação com os valores da dieta à base de caseína, após 28 dias de experimento

Tratamento	Colesterol (mg/dL)	Triacilglicerol (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Bilirrubina (mg/dL)	Albumina (g/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)
Caseína	98,00 ± 8,34	87,33 ± 26,93	143,17 ± 28,11	0,38 ± 0,04	0,10 ± 0,00	2,84 ± 0,26	27,31 ± 3,94	23,30 ± 5,63
0% de sangue	111,67 ^{ns} ± 10,29	106,50 ^{ns} ± 16,39	146,33 ^{ns} ± 18,14	0,38 ^{ns} ± 0,04	0,13 ^{ns} ± 0,08	2,94 ^{ns} ± 0,22	20,89* ± 2,49	22,49 ^{ns} ± 3,94
5% de sangue	111,83 ^{ns} ± 22,03	111,83 ^{ns} ± 24,09	166,17 ^{ns} ± 13,76	0,42 ^{ns} ± 0,04	0,10 ^{ns} ± 0,00	3,10 ^{ns} ± 0,26	24,10 ^{ns} ± 3,05	28,12 ^{ns} ± 3,63
10% de sangue	128,50* ± 8,87	143,33 ^{ns} ± 43,83	141,00 ^{ns} ± 12,30	0,48 ^{ns} ± 0,10	0,12 ^{ns} ± 0,04	2,94 ^{ns} ± 0,29	25,71 ^{ns} ± 4,98	23,30 ^{ns} ± 1,97
15% de sangue	111,67 ^{ns} ± 10,29	115,17 ^{ns} ± 44,10	147,00 ^{ns} ± 11,56	0,45 ^{ns} ± 0,08	0,18 ^{ns} ± 0,10	3,09 ^{ns} ± 0,23	20,89* ± 2,49	23,30 ^{ns} ± 5,63
20% de sangue	117,67* ± 8,24	108,83 ^{ns} ± 25,29	158,50 ^{ns} ± 20,59	0,37 ^{ns} ± 0,05	0,15 ^{ns} ± 0,08	3,12 ^{ns} ± 0,20	20,08* ± 1,97	24,10 ^{ns} ± 4,31
dms	19,018	50,169	24,68	0,099	0,102	0,412	5,188	6,405

^{ns} Não-significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

dms - Diferença mínima significativa.

Os valores de AST, para todos os tratamentos, foram inferiores à faixa de normalidade (45,7 a 80,8) para esse índice em ratos (MITRUKA e RAWNSLEY, 1981).

De acordo com LIMA et al. (1985) e ROBBINS et al. (1995), a ALT ocorre nos hepatócitos em concentrações mais elevadas que a AST. Portanto, a atividade de ALT no soro sanguíneo poderá ter maior significado clínico que a AST, como diagnóstico de lesão hepática.

Como os valores de atividade sérica para AST e ALT em todos os tratamentos que receberam mortadelas adicionadas de sangue, não ultrapassaram o valor encontrado para as dietas controles de caseína e sem adição de sangue, conclui-se não ter havido injúria do tecido hepático, nos animais que receberam dietas formuladas com mortadelas com níveis crescentes de sangue tratado com CO.

Os resultados da Tabela 11 indicam ainda que os níveis séricos de albumina, bilirrubina, creatinina e triacilglicerol dos grupos alimentados com mortadelas adicionadas de sangue tratado com CO não diferiram ($P > 0,05$) daqueles que receberam a dieta de caseína. A adição de sangue com CO não alterou os valores desses índices bioquímicos.

A concentração de albumina sérica só se encontra elevada nos casos de hemoconcentração ou desidratação. Segundo ALCÂNTARA (1985), quando se anestesia os animais utilizando éter pode ocorrer hemoconcentração. No entanto tal fato não foi observado nos resultados desse estudo, pois os valores de albumina mostram-se dentro da faixa (2,9 a 5,9 g/dL) de normalidade (SHARP e La REGINA, 1998). Em contrapartida, níveis séricos reduzidos de albumina refletem a diminuição da síntese hepática devido à falta de substrato (CAREGARO et al., 1996).

Em relação à bilirrubina, creatinina e triacilglicerol, os valores obtidos também se mostram dentro da faixa normal reportados pela literatura especializada que são de 0,0 a 0,64 mg/dL (SHARP e La REGINA, 1998), 0,2 a 0,8 mg/dL (MITRUKA e RAWNSLEY, 1981) e 26 a 145 mg/dL (MELBY Jr. e ALTMAN, 1977), respectivamente.

Quando se compara entre as mortadelas, observa-se que para os índices de colesterol, triacilglicerol, albumina e bilirrubina, não houve efeito dos níveis ($P>0,05$) de sangue tratado com CO adicionados nas mortadelas, sendo que os valores médios foram de $116,267\pm 12,857$ mg/dL, $117,133\pm 33,362$ mg/dL, $3,038\pm 0,258$ g/dL e $0,137\pm 0,072$ g/dL, respectivamente, após o período experimental de 28 dias.

Na Figura 10 pode-se observar o efeito dos níveis de sangue tratado com CO sobre o índice de glicose. Embora haja variação ($P<0,05$) entre os níveis, pode-se observar que ela foi pequena, e inconsistente, entre os valores encontrados.

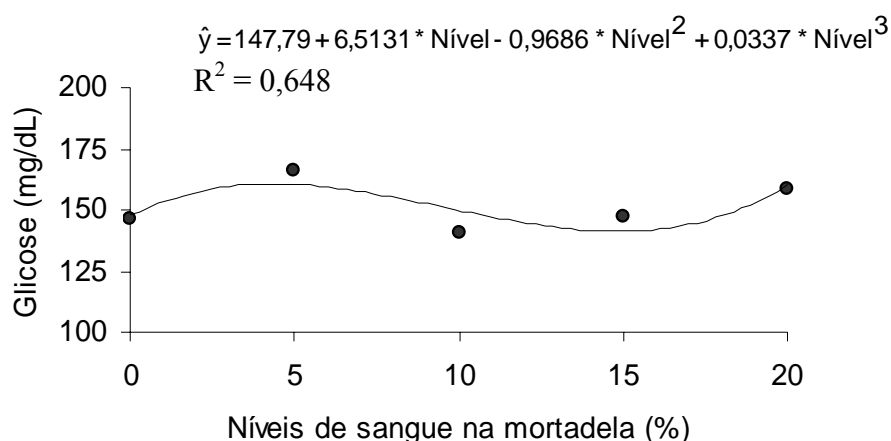


Figura 10 - Variação das médias de glicose de ratos alimentados com mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.

Para a AST (Figura 11) e creatinina (Figura 12), as maiores concentrações desses índices foram observadas para o nível de adição de 10% de sangue. Houve um ligeiro aumento nesses índices até o nível de 10% de sangue adicionado e posterior redução com a elevação dos níveis de adição de sangue.

Pela Figura 13, observa-se a tendência das estimativas da ALT em função dos níveis de sangue adicionados. O nível de 5% de adição de sangue promoveu o valor mais alto do índice sérico de ALT.

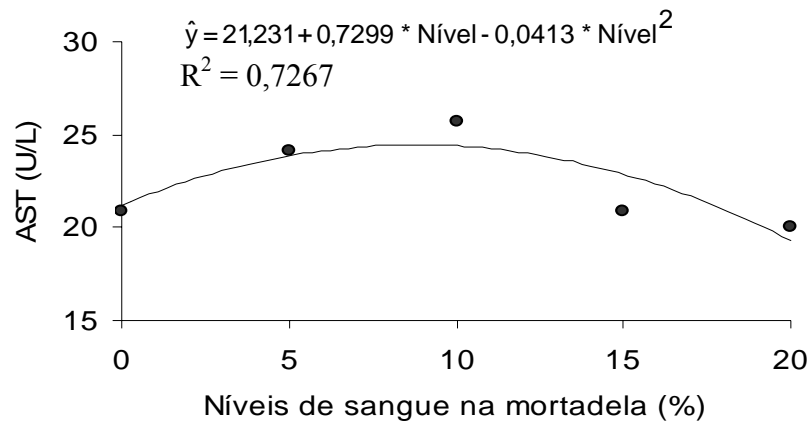


Figura 11 - Variação das médias de aspartato aminotransferase (AST) de ratos alimentados com mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.

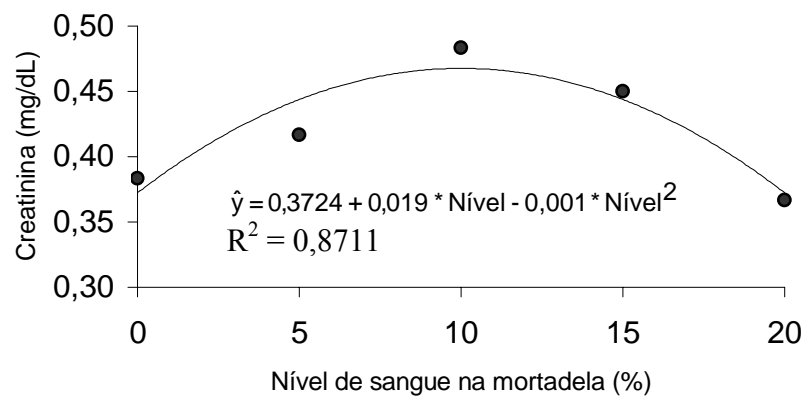


Figura 12 - Variação das médias de creatinina de ratos alimentados com mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.

No que se refere aos exames laboratoriais, o conjunto de resultados com significância em termos estatísticos muito pouco parece relacionar-se com significância fisiológica. Essa avaliação decorre da falta de resultados nível-dependentes e principalmente da contradição entre parâmetros bioquímicos relacionados à mesma função avaliada. Em outro aspecto, muitos dos valores destacados pela avaliação estatística encontram-se dentro de faixas de normalidade estabelecidas a animais (SHARP e La REGINA, 1998; WOLFORD et al., 1986; MITRUKA e RAWNSLEY, 1981; MELBY Jr. e ALTMAN, 1977).

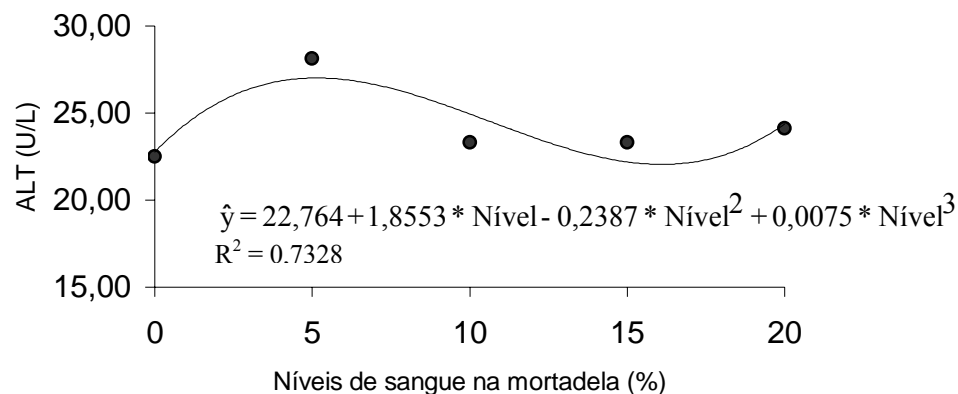


Figura 13 - Variação das médias de alanina aminotransferase (ALT) de ratos alimentados com mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.

Quanto aos entre parâmetros voltados à mesma função fisiológica hepática, avaliada pelas transaminases (AST e ALP) e bilirrubina, também se encontram variações contraditórias. A AST diminuiu na dieta de mortadela sem adição de sangue e a ALT não se alterou, em relação à caseína. Entre as mortadelas, o nível de 5% apresentou o maior valor de ALT e o de 10% o maior valor de AST. A bilirrubina não variou em relação à caseína, nem entre os níveis de sangue. Também em termos de função hepática, os valores de albumina não tiveram alterações significativas em relação à caseína, nem entre os níveis de sangue avaliados.

Apesar dos testes estatísticos terem evidenciado diferenças, os dados significativos de colesterol total entre os grupos da caseína e das mortadelas, e as alterações nos valores obtidos com os índices de glicose, creatinina, AST e ALT, entre os níveis testados, encontram-se dentro da esperada faixa de normalidade. Dessa forma, as variações encontradas parecem relacionar-se mais à variabilidade biológica dos animais de laboratório do que a manifestações toxicológicas do monóxido de carbono.

Estes indicadores não revelaram alteração de um órgão específico, o que é corroborado pelos resultados obtidos do estudo histológico. Isso permite afirmar que não existe razão biológica para essas variações serem atribuídas ao CO presente no sangue utilizado para elaboração das mortadelas-testes.

4.4.4. Determinação da hemoglobina

Na Tabela 12 estão apresentados os valores médios dos níveis sanguíneos de hemoglobina (Hb) dos animais alimentados com dietas à base de mortadelas com níveis crescentes de sangue e caseína, após 28 dias de experimento.

Quanto à avaliação dos dados de hemoglobina (Tabela 12), os grupos que consumiram dietas à base de mortadela com diferentes níveis de sangue não apresentaram diferença estatística ($P>0,05$) em relação à dieta de caseína. O mesmo foi observado entre os níveis, sendo que o valor médio foi de $13,56\pm 0,769$ g/dL. Isso confirma que a substância monóxido de carbono, testada por meio de mortadelas adicionadas de sangue, não apresentou efeito nem foi dose-dependente quanto a esse índice hematológico.

Tabela 12 - Valores médios (e desvios-padrão) dos níveis sanguíneos de hemoglobina em ratos alimentados com dietas à base de mortadelas formuladas com sangue e sua comparação com os valores da dieta à base de caseína, após 28 dias de experimento

Tratamento	Hemoglobina (g/dL)
Caseína	12,97±0,80
0% de sangue	13,58 ^{ns} ± 0,40
5% de sangue	13,68 ^{ns} ± 0,71
10% de sangue	13,30 ^{ns} ± 0,55
15% de sangue	13,40 ^{ns} ± 1,24
20% de sangue	13,83 ^{ns} ± 0,44
Dms	1,238

^{ns} Não-significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.
dms - Diferença mínima significativa.

Para SHARP e La REGINA (1998), os valores médios de Hb para ratos variam de 11 a 19 g/dL. Considerando esta referência, todos os grupos apresentaram valor de Hb dentro desse intervalo, evidenciando que não houve estado anêmico dos animais submetidos às dietas de mortadelas contendo sangue tratado com CO.

4.4.5. Exame anatomopatológico

O exame macroscópico do fígado, rins, pulmões, coração e intestino dos animais durante a necropsia, não evidenciou qualquer alteração nos grupos experimentais. Ao exame macroscópico detalhado das superfícies externas e internas do tubo gastrintestinal, após sua retirada pela secção da porção inferior do esôfago e porção inferior do canal retal, não foram identificadas alterações.

Os órgãos submetidos ao exame histopatológico (fígado e rim direito) apresentaram aspecto geral dentro dos padrões de normalidade, sem diferenças detectáveis entre os grupos controle (caseína e mortadela sem adição de sangue tratado com monóxido de carbono) e experimentais. O fígado apresentou arquitetura lobular preservada, com veia centrolobular e espaços porta sem alterações. Os hepatócitos apresentaram forma e coloração normais, sem evidências de degeneração, necrose, coléstase, inflamação, cicatrização, formação de cistos ou abscessos, o que concorda com a ausência de alterações bioquímicas das enzimas AST e ALT, ao final do experimento. No rim direito observou-se arquitetura cortical e medular inalteradas, sem evidências de lesões tubulares, glomerulares ou do estroma renal.

Os efeitos da ingestão de CO sobre órgãos não são conhecidos. Os efeitos nocivos aparecem como consequência da inalação desse gás e de sua combinação com a hemoglobina. Sob esse aspecto, os órgãos críticos quanto a ação de CO são o cérebro e o coração, com lesões predominantemente hemorrágicas, que dependem de suprimento contínuo e ininterrupto de oxigênio. O coração é afetado por dois mecanismos: trabalho aumentado para prover a demanda periférica de oxigênio e redução no seu próprio suprimento (TAKANO et al., 1981; THOM e KEIM, 1989).

Estudos histopatológicos, em casos fatais, mostram a predominância de lesões na substância branca do sistema nervoso central, ao contrário das lesões em nível neuronal encontradas em pessoas após intoxicações não fatais (THOM e KEIM, 1989).

Os resultados apresentados na Tabela 13 evidenciam que os ratos alimentados com caseína durante 28 dias apresentaram um fígado de maior peso

($P < 0,05$) comparado aos animais que receberam a dieta de mortadela com 20% de sangue tratado com CO. Esse menor peso pode ser explicado possivelmente porque este tratamento também apresentou um menor ganho de peso corporal. Para os demais tratamentos não houve diferença significativa ($P > 0,05$) em relação à dieta de caseína.

Tabela 13 - Valores médios (e desvios-padrão) referentes aos pesos de fígado e de rim direito, porcentagens de fígado e de rim direito, em relação ao peso corporal de ratos, que receberam dietas à base de mortadelas formuladas com sangue tratado com CO e sua comparação com os valores da dieta à base de caseína, após 28 dias de experimento

Tratamento	Peso de fígado (g)	Fígado (%)	Peso de rim direito (g)	Rim direito (%)
Caseína	9,40 ± 1,72	4,62 ± 0,57	0,85 ± 0,071	0,42 ± 0,04
0% de sangue	8,35 ^{ns} ± 0,48	4,31 ^{ns} ± 0,26	0,84 ^{ns} ± 0,11	0,45 ^{ns} ± 0,04
5% de sangue	9,03 ^{ns} ± 1,01	4,59 ^{ns} ± 0,44	0,94 ^{ns} ± 0,10	0,48 ^{ns} ± 0,05
10% de sangue	8,51 ^{ns} ± 1,44	4,48 ^{ns} ± 0,44	0,84 ^{ns} ± 0,11	0,44 ^{ns} ± 0,05
15% de sangue	7,97 ^{ns} ± 0,62	4,14 ^{ns} ± 0,28	0,82 ^{ns} ± 0,08	0,43 ^{ns} ± 0,03
20% de sangue	7,37* ± 0,98	4,05 ^{ns} ± 0,32	0,94 ^{ns} ± 0,10	0,45 ^{ns} ± 0,03
dms	1,8222	0,6371	0,1410	0,0621

^{ns} Não-significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

dms - Diferença mínima significativa.

Os pesos de fígado e de rim direito, expressos como porcentagem do peso corporal (% de fígado e de rim direito), para os ratos sacrificados aos 28 dias de experimento mostraram que as formulações preparadas com as mortadelas não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) da dieta de caseína. O mesmo comportamento foi verificado para o peso de rim direito.

Quando se compara entre as mortadelas, verifica-se um ligeiro decréscimo ($P < 0,05$) tanto no peso de fígado (Figura 14) quanto na porcentagem de fígado (Figura 15) com o aumento dos níveis crescentes de sangue tratado com CO. As variações encontradas no peso absoluto e relativo de fígado, apesar de serem estatisticamente significativas, não estão relacionadas com a alteração de um

marcador bioquímico específico, e é praticamente inexpressiva, visto que não apresentaram relação dose-resposta e ocorreram nos grupos que receberam dietas com 0 e 20% de sangue. Dessa forma, as variações encontradas parecem relacionar-se mais à variabilidade biológica dos animais de laboratório do que a manifestações toxicológicas das mortadelas contendo CO testadas.

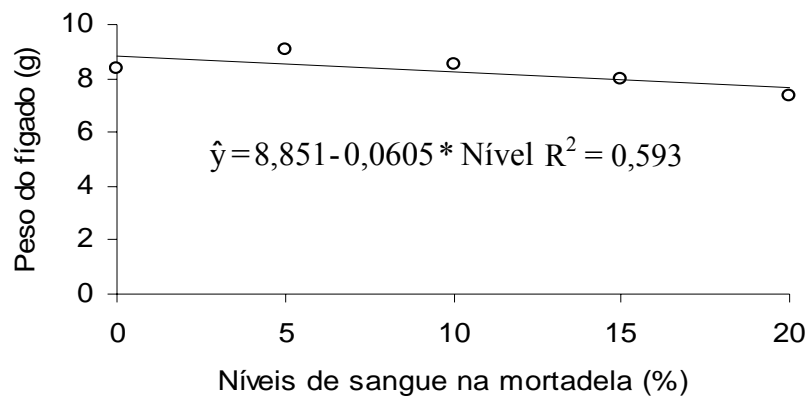


Figura 14 - Variação das médias de peso do fígado de ratos alimentados com mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.

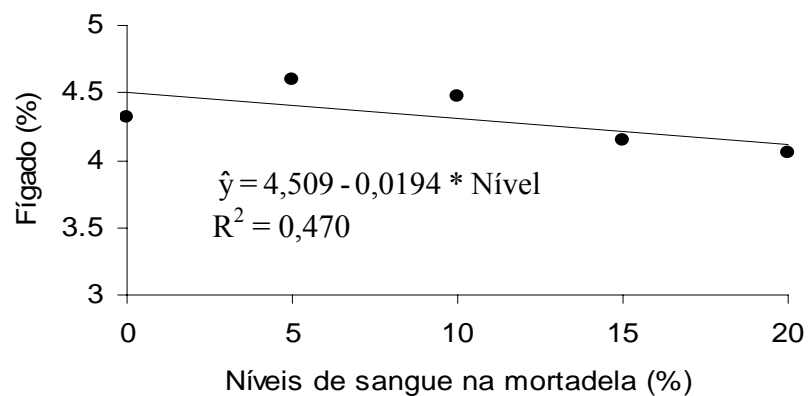


Figura 15 - Variação das médias de porcentagem de fígado de ratos alimentados com mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.

Em relação ao peso de rim e porcentagem de rim direito, não houve efeito dos níveis ($P > 0,05$) de sangue adicionados nas mortadelas, cujos valores médios

foram de $0,856 \pm 0,096$ g e $0,449 \pm 0,042\%$, respectivamente, após o período experimental de 28 dias.

4.5. Determinação da Carboxiemoglobina

Da mesma forma que o ocorrido com o ensaio para avaliação dos parâmetros bioquímicos, o ensaio para o estudo do efeito do monóxido de carbono concluiu-se com 100% de sobrevivência dos animais. Por meio da observação dos animais durante os 14 dias experimentais, pode-se constatar que eles não apresentaram desvio de comportamento. As observações clínicas não mostraram evidências de reação com a ação da substância estudada (CO), mediante o consumo de dietas de mortadela com diferentes níveis de adição de sangue tratado com CO.

Na Figura 16 estão representados o ganho de peso e o consumo alimentar dos ratos durante o período experimental. Em nenhum grupo houve perda de peso. A tendência de aumento crescente do peso corporal e do consumo alimentar foi uma constante durante o estudo. Todos os valores foram considerados normais para os animais, devido à média diária de ingestão de ratos, nesta idade, ser de 15 g/dia (NAS-NRC, 1978). Uma vez que as proteínas do sangue (DUARTE et al., 1999) possuem digestibilidade semelhante às proteínas da carne bovina (SAMMÁN e FARIAS, 1993), as mortadelas administradas aos animais supriram as necessidades nutricionais requeridas durante a fase mais ativa do crescimento (ROGERS, 1979), o que se refletiu no ganho de peso e no aumento do consumo alimentar dos animais.

Ao se comparar o ganho de peso dos animais em função das mortadelas formuladas com níveis crescentes de sangue, observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Pela Figura 17, verifica-se ligeira redução no ganho de peso dos ratos dependente do nível de sangue adicionado na mortadela. O mesmo não foi verificado para o consumo das dietas, que não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$), sendo que a média foi de $197,82 \pm 13,554$ g.

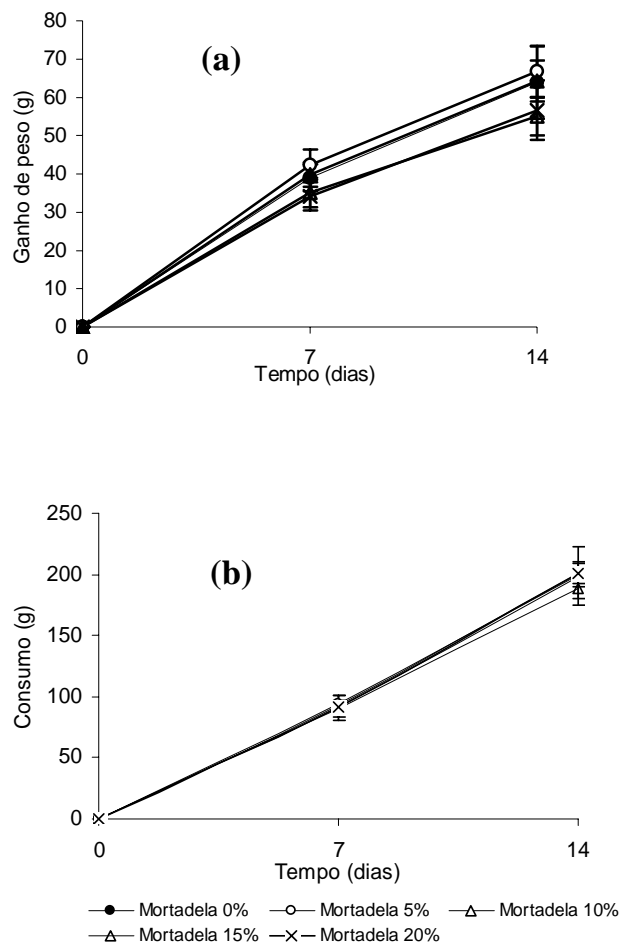


Figura 16 - Ganho de peso (a) e consumo alimentar (b) dos ratos durante o experimento.

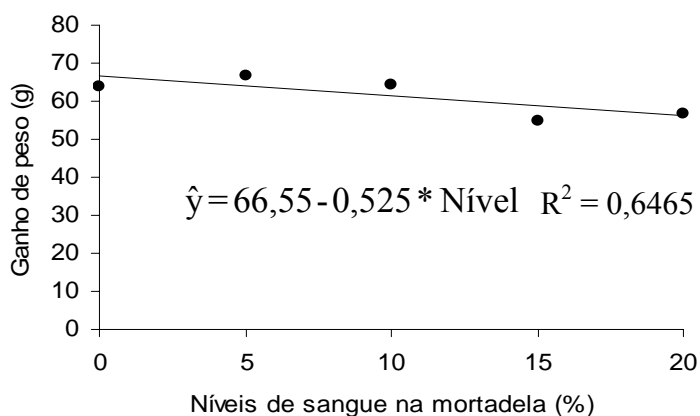


Figura 17 - Variação das médias de ganho de peso de ratos alimentados com mortadela adicionada de sangue tratado com monóxido de carbono.

Embora essa diferença significativa tenha sido notada para o ganho de peso, ela não era esperada, pois as dietas foram planejadas de forma a serem isocalóricas e isoprotéicas (REEVES, et al., 1993). O peso corporal é um indicador de grande importância, pois está envolvido em uma série de alterações orgânicas em diferentes etapas da vida e é por isso que uma variação em seu comportamento sugere que algo não funciona corretamente. Este parâmetro neste estudo teve um comportamento semelhante ao publicado para esta espécie, o que demonstra que não existe razão biológica para esta variação ser claramente atribuída à presença de sangue com CO nas mortadelas.

Resultados semelhantes foram obtidos em ratos Wistar alimentados com dieta de mortadela com adição de 0 e 10% de sangue em pó tratado com CO (TORRES et al., 1999). Quanto ao consumo de dieta, ela foi superior para o grupo de animais alimentados com mortadela adicionada de 10% de sangue.

Não houve diferença ($P>0,05$) entre as dietas para a dosagem sanguínea de COHb (%), sendo que a média, após 14 dias de estudo, foi de $1,67\pm 0,277\%$. As concentrações sanguíneas de COHb dos animais experimentais foram similares às aquelas reportadas em diferentes populações: de 1,2%, 1,0%, 1,8%, 1,34%, $1,0\pm 0,75$, apesar de variarem os métodos de determinação de carboxiemoglobina (SIQUEIRA et al., 1997). Recentemente, MARSHALL et al. (1995) relataram grande variabilidade de intervalos de referência de COHb preconizados em 21 laboratórios de Boston, EUA, com valores variando entre 0,4 e 6,0%, em não-fumantes. Tais variações podem ser atribuídas ao uso de métodos não devidamente validados nas condições do laboratório.

CENDON et al. (1997) avaliaram modelos de indução de enfisema pulmonar provocada por fumaça de cigarros em ratos Wistar machos. O valor de COHb obtido para o grupo de animais controle foi de $2,26\pm 1,30$, superior ao alcançado nesse presente trabalho.

A carboxiemoglobina é um indicador biológico que avalia a absorção bem como reflete a intensidade do efeito nocivo do CO no organismo (KIMMEL et al., 1999).

De acordo com COBURN et al. (1965), a velocidade de absorção e o correspondente aumento na concentração de COHb dependem, principalmente, do tempo de exposição e da concentração de CO no ar. O tipo de atividade física altera o ritmo respiratório e, conseqüentemente, a ventilação alveolar, fator importante na absorção pulmonar do CO. No estado de repouso físico é absorvida apenas metade da quantidade inalada. Em concentrações de aproximadamente 2,5% de COHb, indivíduos sensíveis (que sofrem de doenças cardíacas) apresentam alterações na função cardíaca e dor no tórax. Entretanto, em adultos sadios, nenhum efeito adverso na saúde foi descrito para níveis de COHb abaixo de 5% (Aunan et al., 1992, citados por SØRHEIM et al., 2001).

Cerca de 80% do CO formado na queima do cigarro, que corresponde aproximadamente a 7mL de CO por cigarro, é absorvido. A concentração de COHb em indivíduos fumantes varia em média de 3,8 a 6,8%. Em fumantes de vida sedentária, o nível pode ser ainda mais elevado, tendo sido detectados teores de até 15% (OMS, 1980).

Estima-se que concentração de carboxiemoglobina formada pelo CO endógeno, proveniente do catabolismo normal da Hb e de outros compostos heme, em adulto sadio, varia de 0,1 a 1,0% (NAS, 1977).

De acordo com Aunan et al., (1992), citados por SØRHEIM et al. (1997), níveis sanguíneos de COHb maiores que 2% devem ser evitados a fim de proteger os indivíduos mais vulneráveis da população.

Desde há algum tempo, o emprego de CO em embalagens de produtos cárneos e pescados tem aumentado consideravelmente (VIANA et al., 2005; JOHN et al., 2005; KRISTINSSON et al., 2003; KRAUSE et al., 2003; JAYASINGH et al., 2001; LUÑO et al, 2000; SØRHEIM et al., 1999; 1997), o que se deve aos possíveis benefícios desse composto na estabilização da cor desses produtos. No entanto, nenhuma investigação prévia sobre a introdução desse gás, no que diz respeito à segurança alimentar, foi testada em animais de laboratório.

Embora os estudos realizados não estejam dentro dos protocolos para testes toxicológicos (ZBINDEN, 1991), os resultados sugerem que a ingestão de carnes tratadas com CO não apresenta riscos ao consumidor, uma vez que os valores

encontrados estão de acordo com os níveis normais tolerados pelo organismo, conforme mencionado. Além disso, a absorção de CO no trato gastrointestinal, e seu acúmulo no sangue, provavelmente serão inferiores àqueles da absorção de CO pelos pulmões, os quais apresentam tecidos especializados em facilitar trocas gasosas entre os alvéolos e o sangue (SØRHEIM et al., 1997).

Os resultados obtidos neste experimento *in vivo*, nos níveis testados, comprovam as expectativas sustentadas e embasadas por cálculos estequiométricos, presentes na literatura pertinente (SØRHEIM et al., 2001; SØRHEIM et al., 1997; EL-BADAWI et al., 1964), sobre a provável inocuidade da ingestão de carnes tratadas com CO. Até mesmo na pior das hipóteses, o tratamento da carne com CO parece contribuir pouco ou até mesmo resultar em aumentos desprezíveis dos níveis de COHb sangüínea, em relação aos níveis que são considerados seguros no ambiente de trabalho.

4.6. Ensaio de biodisponibilidade de ferro

Os teores de umidade, proteína, lipídios, cinzas e ferro das mortadelas, após a secagem, encontram-se na Tabela 14. Estes resultados serviram de base para o cálculo das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico de biodisponibilidade de ferro.

Tabela 14 - Composição centesimal e teor de ferro das mortadelas após secagem

Mortadela	Umidade (%)	Proteína (%)	Lipídios (%)	Cinzas (%)	Fe (mg/100g)
0% sangue	12,09	47,09	22,79	8,61	49,99
5% sangue	12,88	46,40	24,39	8,34	83,96
10% sangue	8,80	47,27	25,17	8,72	109,33
15% sangue	13,98	43,61	21,53	8,38	155,22
20% sangue	9,75	43,72	23,26	8,87	188,60

O valor basal de hemoglobina dos animais foi de 12,59 g/dL. A condição de anemia dos animais, ao final da fase de depleção, foi confirmada pela queda desse valor basal para níveis de hemoglobina de $6,42 \pm 0,620$ g/dL. Estes valores obtidos confirmam a eficiência da fase de depleção obtida com 21 dias de ensaio, embora pela AOAC (1996), os ratos são considerados satisfatoriamente anêmicos quando a concentração sanguínea de hemoglobina é inferior a 6 g/dL, após um período de depleção de 28 dias. Porém, essa anemia provoca aumento excessivo na absorção de ferro, superestimando sua biodisponibilidade e debilitando em muito os animais.

Avaliando-se o ganho de peso e o CEA das 18 combinações de dietas testadas (mortadela e sulfato ferroso com os respectivos níveis de ferro), verifica-se que não houve diferença significativa ($P > 0,05$), sendo que os valores médios foram de $83 \pm 7,742$ g e $0,34 \pm 0,031$, respectivamente.

A Figura 18 apresenta o incremento no ganho de hemoglobina pelos animais submetidos às dietas controle e à base de mortadelas, com níveis crescentes de ferro. Como esperado, no intervalo avaliado, houve incremento no ganho de hemoglobina ($P < 0,05$) com o aumento no teor de ferro em todas as dietas utilizadas (padrão - sulfato ferroso, e testes - mortadelas). Entretanto, a análise estatística dos coeficientes de inclinação das curvas de regressão (Tabela 15) relativas a cada uma das dietas testes e controle mostrou não haver ($P > 0,05$) diferença entre as dietas testadas, evidenciando que o ganho de hemoglobina não melhorou pela utilização de níveis mais elevados de sangue nas mortadelas. Isto era esperado, uma vez que, independente do nível de sangue em cada mortadela teste, todas elas foram apresentadas aos animais experimentais de forma a conferir uma mesma concentração de ferro heme.

Porém, ao se desmembrar os dados da Figura 18 para cada um dos níveis de ferro administrados (Tabela 16), verifica-se que a ausência de diferença entre as dietas de sulfato ferroso e à base de mortadelas deve-se ao fato de não haver diferença entre as diversas dietas quando nos dois níveis mais baixos administrados (6 e 12 mg de ferro/kg de dieta). Já no nível mais elevado (24 mg de ferro/kg de dieta), verificam-se ($P < 0,05$) diferenças entre dietas e níveis de sangue adicionados.

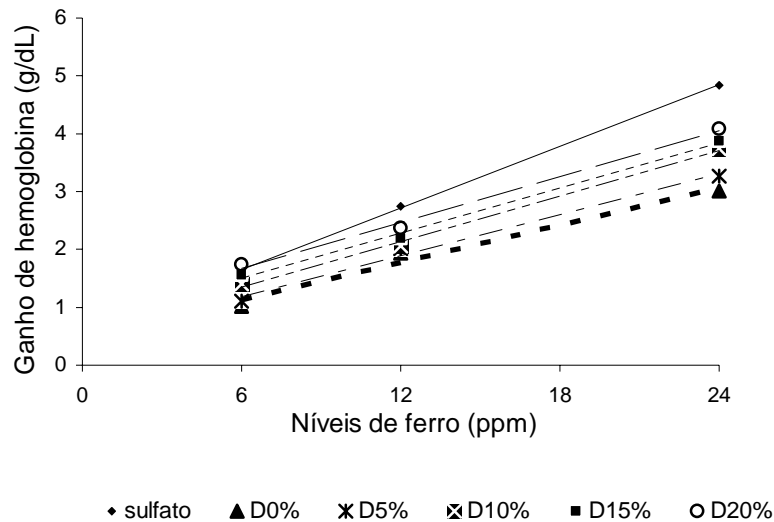


Figura 18 - Variação do ganho de hemoglobina em relação aos níveis de ferro nas dietas experimentais (mortadelas) e na dieta-padrão de sulfato ferroso.

Tabela 15 - Equações ajustadas aos dados de ganho de hemoglobina das dietas experimentais avaliadas, em função dos níveis de ferro testados

Dietas	Equação ajustada	R ² (%)
Sulfato ferroso	$\hat{y} = 0,584 + 0,177 * \text{ferro}$	99,97
0% Sangue	$\hat{y} = 0,485 + 0,108 * \text{ferro}$	97,87
5% Sangue	$\hat{y} = 0,480 + 0,118 * \text{ferro}$	99,12
10% Sangue	$\hat{y} = 0,570 + 0,131 * \text{ferro}$	99,64
15% Sangue	$\hat{y} = 0,720 + 0,130 * \text{ferro}$	99,56
20% Sangue	$\hat{y} = 0,885 + 0,138 * \text{ferro}$	99,51

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Nos níveis de ingestão mais baixos de ferro (6 e 12 mg de ferro/kg de dieta), não há oferta de ferro suficiente para fornecer a quantidade necessária para suprir o déficit de hemoglobina oriunda da anemia induzida. Isso, provavelmente, decorre dos mecanismos de adaptação do organismo para maior absorção e utilização do ferro na anemia grave, destinando maior proporção de ferro quando este é fornecido em pequena quantidade à eritropoiese (WORWOOD, 1996). Já quando se administra dietas que fornecem 24 mg de ferro/kg de dieta é possível verificar-se que o aumento no nível de sangue nas mortadelas favorece ($P < 0,05$) uma melhor recuperação nos níveis sanguíneos de hemoglobina. Outrossim,

também se verifica que apenas quando se administra dietas formuladas com 20% de sangue em substituição à carne se consegue uma recuperação de hemoglobina sanguínea similar àquela conseguida com sulfato ferroso.

Tabela 16 - Valores médios (e desvios-padrão) do ganho de hemoglobina e do valor de hematócrito dos ratos alimentados com dietas contendo sulfato ferroso (padrão) e mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue com 6, 12 e 24 mg de ferro/kg de dieta

Dietas	Ganho de Hemoglobina (g/dL)			Hematócrito (%)		
	Nível de Ferro (mg/kg de dieta)			Nível de Ferro (mg/kg de dieta)		
	6	12	24	6	12	24
Sulfato	1,63±0,67 ^a	2,75±0,40 ^a	4,84±0,93 ^a	33,29±2,14 ^{ab}	36,00±2,90 ^a	42,00±3,16 ^a
0% Sangue	1,02±0,98 ^a	1,94±0,85 ^a	3,01±0,51 ^c	29,67±1,97 ^b	34,00±2,19 ^a	37,29±1,80 ^b
5% Sangue	1,11±0,71 ^a	2,01±0,73 ^a	3,27±0,54 ^{bc}	30,83±3,31 ^b	34,75±3,78 ^a	38,50±2,17 ^{ab}
10% Sangue	1,41±0,61 ^a	2,06±1,17 ^a	3,74±0,40 ^{bc}	31,43±3,69 ^b	36,40±3,65 ^a	38,60±1,34 ^{ab}
15% Sangue	1,56±0,85 ^a	2,19±1,12 ^a	3,87±0,41 ^b	36,00±2,53 ^a	32,25±3,40 ^a	40,60±1,52 ^{ab}
20% Sangue	1,74±1,27 ^a	2,37±0,55 ^a	4,08±0,43 ^{ba}	33,00±2,45 ^{ab}	35,17±2,48 ^a	40,00±1,67 ^{ab}

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Apesar da concentração de hemoglobina sanguínea, no nível de administração de 24 ppm, só não diferir daquela alcançada com a dieta controle de sulfato ferroso ao se utilizar dietas formuladas com 20% de sangue, isto não se traduziu na produção de hematócritos (Tabela 16). Assim, a porcentagem de hematócritos no sangue dos ratos só foi inferior ($P < 0,05$) ao controle (sulfato ferroso) para a dieta à base de mortadela formulada sem adição de sangue. Neste nível de ferro (24 ppm) percebe-se uma tendência de elevação no ganho de hemoglobina ($P < 0,05$), mas não de hematócrito ($P > 0,05$), com o aumento na adição de sangue à mortadela.

Os níveis iniciais de hemoglobina, do período de repleção, não apresentaram diferença, demonstrando que não havia variação entre as médias de hemoglobina dos grupos e, portanto, que estes não tiveram influência nos resultados obtidos.

Nos primeiros estudos realizados em pintinhos sobre o método de repleção de hemoglobina foi observado que a resposta da hemoglobina frente a diferentes níveis de sulfato ferroso foi mais consistente que a resposta de hematócrito, embora as diferenças entre ambos fossem pequenas (WIENK et al., 1999). Hemoglobina e hematócrito nem sempre estão completamente inter-relacionados (KIM e ATALLAH, 1992), mas, normalmente, os resultados são semelhantes (WIENK et al., 1999). As amostras que coagularam no tubo capilar foram descartadas, o que reduziu o tamanho amostral e, provavelmente, contribuiu para a grande variabilidade de resultado e baixa correspondência com o teor de hemoglobina, bem como para um desvio-padrão mais elevado, observado no hematócrito (Tabela 16).

A Tabela 17 mostra os valores médios da eficiência na recuperação de hemoglobina (HRE) para os níveis de ferro determinados na dieta.

Tabela 17 - Valores médios (e desvios-padrão) da eficiência na recuperação de hemoglobina (HRE) e de HRE (% do controle) dos ratos anêmicos para os níveis de ferro determinados nas dietas experimentais

Dietas	HRE (%)			HRE (% do controle)		
	Nível de Ferro (mg/kg de dieta)			Nível de Ferro (mg/kg de dieta)		
	6	12	24	6	12	24
Sulfato	68,53±11,45 ^a	65,13±6,78 ^a	58,61±7,02 ^a	100,00±0,00 ^a	100,00±0,00 ^a	100,00±0,00 ^a
0% Sangue	63,98±20,00 ^a	62,88±8,95 ^a	50,19±4,25 ^{ab}	93,94±27,53 ^a	98,08±19,47 ^a	86,86±13,88 ^{ab}
5% Sangue	59,44±11,70 ^a	55,00±8,94 ^a	46,49±3,46 ^b	87,24±14,54 ^a	84,95±15,03 ^a	80,23±10,48 ^b
10% Sangue	58,00±18,50 ^a	53,89±13,24 ^a	50,12±5,73 ^{ab}	86,91±33,15 ^a	84,05±26,00 ^a	87,32±18,88 ^{ab}
15% Sangue	63,88±15,61 ^a	54,14±15,53 ^a	43,64±11,81 ^b	95,69±27,92 ^a	83,53±25,08 ^a	75,63±23,95 ^b
20% Sangue	69,08±20,85 ^a	54,57±8,29 ^a	48,48±4,99 ^b	100,99±29,11 ^a	83,92±11,87 ^a	83,26± 8,72 ^b

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

O valor de HRE reflete a habilidade dos ratos anêmicos em utilizar e reter o ferro dietético, isto é, a utilização biológica do ferro (MILLER, 1982).

De acordo com a Tabela 17, o grupo que recebeu a dieta de mortadela de 0% de sangue no nível de 24 ppm de ferro apresentou o maior valor de HRE, sendo inferior em valor absoluto, mas não diferindo ($P > 0,05$) da dieta de sulfato ferroso, no mesmo nível de ferro. Verificou-se que para os valores de HRE, as dietas de

mortadela com níveis crescentes de sangue não diferiram da dieta-padrão ($P>0,05$) para os níveis de 6 e 12 ppm, ao se comparar entre as dietas com mesmo teor de ferro.

As dietas de mortadela com 5, 15 e 20% apresentaram diferença significativa ($P<0,05$) em relação à dieta padrão somente no nível de ferro de 24 ppm, onde apresentaram menor HRE. Observou-se também que entre as dietas de mortadela não houve influência do nível de sangue adicionado no valor de HRE em nenhum dos níveis de ferro testado. Entretanto, estudo realizado por JANSUITTIVECHAKUL et al. (1986) mostrou que os valores de HRE diminuíram à medida que se aumentou a percentagem de ferro proveniente da hemoglobina. Os valores de HRE variaram de 33,4 (100% do ferro proveniente da carne) a 22,8% (100% do ferro proveniente da hemoglobina).

MAHONEY et al. (1974) sugerem que a avaliação da biodisponibilidade de fontes de ferro de acordo com a concentração de hemoglobina poderia levar a conclusões errôneas. Isso acontece porque os aumentos na concentração de hemoglobina falham por não levar em conta diferenças na quantidade de ferro consumido ou diferenças no ganho de peso resultante da diferença de consumo alimentar dos grupos de ratos no mesmo experimento. Se as dietas contendo as várias fontes de ferro possuem diferenças inerentes na palatabilidade, na qualidade da proteína ou densidade calórica, as quantidades de dieta consumida podem ser diferentes. Esses fatores podem influenciar o consumo de ferro e, assim, o ganho de peso. Variações no crescimento podem alterar significativamente o requerimento de ferro do animal. E, finalmente, alterações no peso corporal resultariam em variações no volume de sangue. Segundo ROTRUCK e LUHRSEN (1979), os cálculos de hemoglobina total e da eficiência na recuperação de hemoglobina (HRE) refletem melhor a biodisponibilidade de ferro.

SANT'ANA (2002) conseguiu um ganho de hemoglobina de 1,82, 3,45 e 4,34 g/dL em ratos que receberam dietas com 6, 12 e 24 ppm de ferro, provenientes de sulfato ferroso. Esses resultados foram próximos ao ganho de hemoglobina obtido neste experimento para a mesma dieta (Tabela 16).

Pela Tabela 16, observa-se que todos os grupos experimentais que consumiram ferro proveniente das dietas padrão e de mortadelas mostraram recuperação do quadro de anemia (Hemoglobina > 6,0 g/dL), porém não atingiram os níveis basais de hemoglobina de 12,59 g/dL, do início do experimento, conforme os valores obtidos para a hemoglobina final. O rato requer cerca de 24 mg de ferro/kg de dieta para que atinja seus níveis normais de hemoglobina. Mesmo com uma ingestão de ferro correspondente a 100% do recomendado para o animal, de fonte altamente biodisponível e considerada a melhor para ratos (MARTÍNEZ-NAVARRETE et al., 2002; HURREL e COOK, 1990; FRITZ et al., 1970), a dieta-padrão de sulfato ferroso com 24 ppm não conseguiu recuperar o nível basal. Esse comportamento pode ser possivelmente explicado pelo período experimental de 14 dias que não foi suficiente para a recuperação dos níveis basais de hemoglobina.

No presente estudo, a estimativa feita pela equação de regressão da dieta-padrão (Tabela 15) mostrou que seria necessário um teor de ferro igual a 31,56 ppm, para restabelecer o nível médio basal de hemoglobina apresentado pelos ratos no início do experimento.

Os tecidos musculares, de forma geral, são tidos como boas fontes de ferro com elevada biodisponibilidade, principalmente por apresentar o ferro na forma heme mais biodisponível, mas também, pelo efeito do “fator carne”, que chega a aumentar de 2 a 4 vezes a absorção do ferro não-heme presente em uma determinada refeição (ZIJP et al., 2000; HALLBERG e HULTHEN, 2000; COOK e MONSEN, 1976).

Apesar de fornecerem um teor de ferro superior ao necessário, os ratos das dietas à base de mortadela não conseguiram restituir seus níveis basais de hemoglobina nos níveis de ferro testado. Diante disso, os resultados obtidos para a recuperação dos níveis de hemoglobina dos animais que receberam dietas com níveis crescentes de sangue ficaram abaixo do esperado. Embora, no nível teórico, a combinação de sangue, rico em ferro heme, com carne (presenças de ferro heme e do “fator carne”) devesse ser melhor do que o sulfato ferroso, o ensaio biológico não demonstrou isso. Em alguns casos, como no nível de 24 ppm, as mortadelas

formuladas com níveis de sangue de 0 a 15% mostraram ganho de hemoglobina inferior ao sulfato ferroso.

Uma hipótese para a menor biodisponibilidade de ferro das dietas de mortadelas pode ser atribuída à evidência de que a absorção de ferro heme é um processo saturável. Partindo-se do pressuposto que as mortadelas são ricas em ferro heme, pela presença da carne (cerca de 40 a 60% de ferro heme) e também pela presença de sangue (100% de ferro heme), pode ter ocorrido diminuição da absorção de ferro heme pelo fenômeno de saturação. Estudos realizados em humanos por PIZARRO et al. (2003) sugerem que a quantidade máxima de ferro absorvida de células vermelhas sanguíneas contendo mais de 15 mg de ferro heme foi de 2 mg, caracterizando que a absorção desta forma de ferro é saturável; contudo, o mecanismo pelo qual isso acontece ainda não é conhecido. Parece que um dos fatores limitantes seria a captação do heme de fora para dentro do enterócito. Os autores afirmam que a saturação da absorção do ferro heme pode ser um fator de proteção para evitar overdose de ferro quando ele é proveniente principalmente do consumo de carnes ou sangue.

ROBERTS et al. (1993) demonstraram, indiretamente, a presença de proteína ligante de ferro heme na borda em escova do enterócito de ratos e mostrou que a captura do heme pela mucosa aumenta a quantidade dessa proteína na borda em escova. Eles especularam que esta proteína ligante de ferro heme pode ser saturável. Se o mecanismo proposto de entrada de ferro no enterócito por endocitose (através de cavidades na zona apical) é correto, ele seria uma barreira que limitaria a captação do ferro heme para dentro do enterócito. A saída do ferro do enterócito para a corrente sanguínea também é saturável, já que depende da transferrina livre para ser transportado. Quando a transferrina está saturada, o ferro fica retido no enterócito e é eventualmente excretado nas fezes com a descamação das células intestinais ou por um processo de exocitose.

SELIGMAN et al. (2000) avaliaram a biodisponibilidade em humanos de um produto de ferro heme (HIP) elaborado a partir da digestão da hemoglobina suína por enzimas proteolíticas. Os resultados mostraram que a quantidade absorvida de ferro a partir da adição de 20 mg do produto HIP foi de pelo menos 2

mg comparado a 1 mg de absorção quando testado 20 mg de fumarato ferroso. Os autores ainda encontraram que o aumento da adição para 60 mg de ferro como HIP não mostrou aumento proporcional da biodisponibilidade, até mesmo para os indivíduos com valores relativamente baixos de ferritina. Isso permitiu especular que a transferência do ferro através do revestimento do intestino pode ser um processo saturável.

Outro fator que pode ter afetado a composição do ferro presente nas diversas mortadelas utilizadas neste estudo e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade nos animais, foi o cozimento. O ferro heme da carne é parcialmente convertido em ferro não-heme pelo calor. A redução varia de 10 a 100%, sendo proporcional ao tempo e ao tipo de cozimento (GARCIA et al., 1996).

Na literatura existem inúmeros relatos sobre o efeito do calor na conversão de ferro heme para não-heme. Segundo ROGOV et al. (1989), o tratamento térmico usado na elaboração de vários produtos cárneos, como por exemplo, no cozimento de embutidos a 68-71°C, é ideal para destruir os anéis porfirínicos do grupo heme. Nesse caso, o ferro é liberado do grupo heme e torna-se sujeito à formação de complexos com os constituintes do alimento. Por isso, conversões de ferro heme para não-heme, causadas pelo calor, reduzem a biodisponibilidade do ferro da carne (SCHRICKER e MILLER, 1983), o que provavelmente ocorreu com as mortadelas que foram cozidas em temperaturas, que variaram segundo uma programação de 55 a 85°C, até que a temperatura da massa atingisse 74°C. Soma-se, ainda, ao cozimento, o efeito da etapa de secagem das mortadelas a 60°C/12 horas para a sua incorporação na dieta em pó, oferecida aos animais. Uma vez que a solubilização do ferro também desempenha um papel importante na sua absorção e o meio alcalino do intestino delgado favorece a oxidação do ferro não-heme ($Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3}$) (HURRELL, 1997; ROGOV et al., 1989), é possível especular a transformação de parte desse ferro para a forma insolúvel, que não é absorvida.

Os dados de várias pesquisas mostram que o tratamento térmico transfere cerca de 70% do ferro heme da mioglobina e 30% do ferro heme da hemoglobina para a forma não-heme (JANSUITTIVECHAKUL et al., 1985; CHEN et al., 1984; SCHRICKER et al., 1982).

WANG e LIN (1994) avaliaram o efeito do aquecimento sobre o conteúdo de ferro heme e não-heme de um produto popular consumido em Taiwan, obtido pela mistura de sangue suíno fresco mais água e coagulado pela ação do calor. Os resultados mostraram que o conteúdo de ferro não-heme aumentou significativamente ($P < 0,05$) quando o produto foi aquecido acima de 55°C e apresentou uma relação de aumento linear com o tempo de aquecimento a 80°C , enquanto o ferro heme diminuiu relativamente.

HAN et al. (1993) mediram o conteúdo de ferro heme em carne bovina e de frango, em função da temperatura de cozimento, e mostraram que não houve diferença significativa entre a carne crua controle e a cozida a 55°C . Contudo, entre 55 e 70°C foi observada grande diminuição do conteúdo de ferro heme. KRISTENSEN e PURSLOW (2001) também mostraram que o cozimento provocou um grande efeito na proporção ferro heme/não-heme, com diminuição de 62% do conteúdo de ferro heme após aquecimento a $80^{\circ}\text{C}/2$ horas. A maior parte do ferro heme presente na carne e a totalidade no sangue estão localizados na mioglobina e hemoglobina, sendo que a estabilidade térmica dessas proteínas é altamente dependente da molécula heme intacta. Portanto, a destruição da molécula heme facilmente levará à desnaturação da mioglobina e hemoglobina. Assim, a perda de ferro da molécula heme não ocorrerá em carne tratada pelo calor sem a desnaturação das moléculas dessas proteínas. LEDWARD (1978) investigou a cinética da desnaturação da mioglobina em carne e encontrou uma baixa taxa de desnaturação a 55°C , enquanto em temperaturas acima de 55°C foi observado um grande acréscimo dessa taxa.

PURCHAS et al. (2003) avaliaram a variação e as perdas de ferro durante o cozimento e estocagem de carne bovina. O cozimento levou a perdas consideráveis do ferro heme solúvel, de modo que depois de somente 30 minutos de cozimento a 60°C , a porcentagem de ferro heme solúvel diminuiu de 70 para 40% do ferro total. Um tempo adicional de 60 minutos nesta temperatura resultou em uma queda de cerca de 30%, enquanto o cozimento tanto de 30 ou 90 min a 80 ou 98°C levou a níveis menores que 5%. Eles notaram que temperaturas e tempos de cozimentos maiores estão associados inicialmente com um aumento da proporção de ferro heme

insolúvel, quando a hemoglobina é desnaturada, e depois com a formação de ferro não-heme solúvel e insolúvel, quando o ferro é liberado do anel porfirínico do grupo heme, o que provocaria uma diminuição da biodisponibilidade do ferro. Esses autores afirmam que a extensão que essas alterações podem refletir na diminuição da biodisponibilidade precisa ser determinada. As proporções relativas de ferro heme e não-heme reportadas no experimento destes autores são semelhantes às aquelas relatadas nos estudos de PURCHAS et al. (2004).

Em termos de biodisponibilidade de ferro, de acordo com PURCHAS et al. (2004), é esperada uma diminuição com o cozimento, tanto pelo decréscimo na proporção de ferro heme, em relação ao conteúdo de ferro total, como pela diminuição da solubilidade. Desses dois efeitos, é provável que a menor proporção de ferro heme seja potencialmente mais importante.

Estudos de absorção de ferro em humanos, conduzidos por GARCIA et al. (1996), comprovaram que indivíduos alimentados com uma dieta contendo carne bovina cozida (com 60% do ferro total na forma heme) mostraram 13,5% de absorção do ferro heme e 6,3% para o ferro não-heme. Os indivíduos que receberam uma dieta contendo precipitado de carne cozida (com 30% do ferro total na forma heme) apresentaram uma absorção de 7,6 e 7,5% para o ferro heme e não-heme, respectivamente. Esta diferença na absorção de ferro de quase 50% está de acordo com a redução do conteúdo de ferro heme encontrado em ambas as preparações. Os autores concluíram que a redução do conteúdo de ferro heme na carne reduz significativamente a absorção do ferro heme.

Contrariando esta hipótese mencionada, resultados obtidos por JANSUITTIVECHAKUL et al. (1985) mostraram que o cozimento da carne não afetou a biodisponibilidade de ferro quando comparada à da carne bovina crua. A diminuição do ferro heme na carne devido ao cozimento não foi associada com qualquer decréscimo na biodisponibilidade do ferro da carne quando realizado o ensaio com ratos. Neste experimento ainda, o cozimento melhorou levemente a biodisponibilidade do ferro da hemoglobina, mesmo com a diminuição do teor de ferro heme da hemoglobina com o cozimento. O nível de ferro adicionado na dieta através das fontes testadas de carne bovina e hemoglobina foi de 36 mg/kg de dieta.

Em contraste, BOGUNJOKO et al., (1983) reportaram que o cozimento diminuiu a biodisponibilidade do ferro da carne de frango.

Um fato observado nos resultados encontrados no presente ensaio é que o aumento do nível de sangue na mortadela permitiu um aumento absoluto no ganho de hemoglobina (Tabela 16), mas não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as mortadelas, em todos os níveis de ferro testados, com exceção da mortadela de 0% de sangue, no nível de 24 ppm. Além das hipóteses já levantadas, segundo THANNOUN et al. (1988) a absorção do ferro da hemoglobina pode não refletir a absorção do ferro heme da carne porque a hemoglobina forma polímeros grandes e de baixa digestibilidade em condições alcalinas do intestino e, portanto, não é facilmente absorvida como o ferro da carne (mioglobina). Assim, valores de absorção de ferro heme baseados na hemoglobina podem subestimar a contribuição do ferro heme da carne para ferro dietético disponível.

De acordo com HAZELL et al. (1978), o ferro é mais eficientemente absorvido da carne do que da hemoglobina. PARK et al. (1983) relatam que, embora quantidades apreciáveis de ferro da hemoglobina (11% em indivíduos normais e 22% em indivíduos com deficiência) foram absorvidas em humanos, o mesmo não foi observado em ratos. Estudos realizados por estes autores confirmaram a baixa biodisponibilidade do ferro da hemoglobina em ratos. O ganho de hemoglobina dos animais, após o período de 10 dias de repleção, que receberam dietas contendo 30 ppm de hemoglobina suína ou bovina (fresca ou cozida ou nitrosilada) foi inferior a 1,0 g/dL.

A explicação dada para este achado é que as condições de tratamento da hemoglobina (lavagem, cozimento, liofilização) podem ter causado perda de várias porções da proteína globina presente na molécula de hemoglobina, o que alterou as quantidades de produtos da degradação da globina no intestino dos ratos. Produtos da degradação da globina estão associados com a melhoria da absorção de ferro heme.

Alguns estudos têm mostrado que a eficiência da conversão do ferro absorvido da carne em ferro hemoglobínico foi diminuída quando ratos anêmicos receberam dietas contendo produtos cárneos formulados com nitrito de sódio. Van

Logten et al. (1972), citados por MAHONEY et al. (1979), observaram valores menores de hemoglobina, hematócrito e eritrócito em ratos alimentados com dieta contendo 40% de carne enlatada tratada com 0,5% de nitrito de sódio, em relação aos animais alimentados com a mesma dieta de carne sem adição de nitrito. Os resultados sugeriram que a biodisponibilidade de ferro em produtos cárneos pode ser afetada pelo nitrito.

PARK et al. (1983) conduziram experimento para avaliar o efeito da adição de nitrito sobre as hemoglobinas suína e bovina em ratos anêmicos. Os resultados mostraram que os tratamentos com nitrito resultaram em menor conversão do ferro dietético em hemoglobina do que os tratamentos sem nitrito. Eles obtiveram uma redução de 25 e 10% na biodisponibilidade de ferro provenientes da hemoglobina suína e bovina, respectivamente.

MAHONEY et al. (1979) avaliaram o efeito de dietas contendo embutido bologna preparado com diferentes níveis de nitrito, a fim de determinar o efeito do nitrito na biodisponibilidade de ferro da carne. Os resultados encontrados mostraram que a biodisponibilidade do ferro, em ratos anêmicos, medida pela eficiência de conversão do ferro absorvido da carne em ferro hemoglobínico, diminuiu de 58 para 39%, quando os níveis de nitrito aumentaram de 0 a 50 ppm.

A partir dos resultados obtidos neste ensaio e na hipótese de interferência do nitrito na biodisponibilidade de ferro pelos animais, conforme relatos mencionados, foi sugerido um novo ensaio biológico que verificasse o efeito, na biodisponibilidade de ferro, da presença desse composto, presente na mortadela adicionada de 20% de sangue.

Os resultados referentes ao ganho de hemoglobina e valor de hematócrito do segundo ensaio biológico estão na Tabela 18.

A condição de anemia dos animais, ao final da fase de depleção, foi de 8,41g/dL. Estabelecendo uma comparação entre as dietas com mesmo teor de ferro, verificou-se que não houve diferença ($P>0,05$) entre as dietas de mortadela com e sem nitrito, sendo o ganho de hemoglobina igual nos níveis de 6 e 24 ppm de ferro. Entretanto, no nível de 12 ppm, a mortadela com nitrito apresentou ganho de hemoglobina superior ($P<0,05$) ao do embutido sem nitrito, mostrando que o nitrito

não interferiu negativamente no ganho de hemoglobina. Os valores absolutos do ganho de hemoglobina da mortadela com nitrito (Tabela 18), entretanto, foram inferiores aos encontrados no ensaio anterior para os níveis de 6 e 24 ppm (Tabela 16). Os resultados obtidos também mostraram que a mortadela com nitrito teve o mesmo comportamento do ensaio anterior, isto é, não diferiu ($P>0,05$) da dieta-padrão, em relação ao ganho de hemoglobina, para todos os níveis de ferro testados.

Tabela 18 - Valores médios (e desvios-padrão) do ganho de hemoglobina e do valor de hematócrito dos ratos alimentados com dietas contendo sulfato ferroso (padrão) e mortadela adicionada ou não de nitrito com 6, 12 e 24 mg de ferro/kg de dieta

Dietas	Ganho de Hemoglobina (g/dL)			Hematócrito (%)		
	Nível de Ferro (mg/kg de dieta)			Nível de Ferro (mg/kg de dieta)		
	6	12	24	6	12	24
Sulfato	2,45±1,49 ^a	2,80±1,22 ^{ab}	4,48±0,96 ^a	43,00±6,08 ^a	44,00±2,00 ^b	46,75±3,66 ^a
Sem nitrito	1,76±1,45 ^a	2,04±1,06 ^b	2,85±1,07 ^b	40,57±4,43 ^a	44,0±2,74 ^b	43,87±2,55 ^a
Com nitrito	0,80±1,03 ^a	3,65±1,26 ^a	3,20±1,03 ^{ab}	39,75±2,22 ^a	49,43±6,58 ^a	46,00±6,16 ^a

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

A condição de anemia dos animais, ao final da fase de depleção, foi de 8,41g/dL. Estabelecendo uma comparação entre as dietas com mesmo teor de ferro, verificou-se que não houve diferença ($P>0,05$) entre as dietas de mortadela com e sem nitrito, sendo o ganho de hemoglobina igual nos níveis de 6 e 24 ppm de ferro. Entretanto, no nível de 12 ppm, a mortadela com nitrito apresentou ganho de hemoglobina superior ($P<0,05$) ao do embutido sem nitrito, mostrando que o nitrito não interferiu negativamente no ganho de hemoglobina. Os valores absolutos do ganho de hemoglobina da mortadela com nitrito (Tabela 18), entretanto, foram inferiores aos encontrados no ensaio anterior para os níveis de 6 e 24 ppm (Tabela 16). Os resultados obtidos também mostraram que a mortadela com nitrito teve o mesmo comportamento do ensaio anterior, isto é, não diferiu ($P>0,05$) da dieta-padrão, em relação ao ganho de hemoglobina, para todos os níveis de ferro testados.

Baseado nesses resultados pode-se concluir que o ganho de hemoglobina não foi afetado pela presença de nitrito na mortadela, contradizendo as descobertas de Van Logten et al. (1972), citados por MAHONEY et al. (1979) e PARK et al. (1983). Por outro lado, os resultados obtidos por MAHONEY et al. (1979) mostraram que níveis de adição de nitrito acima de 50 ppm tenderam a aumentar o ganho de hemoglobina de animais, embora os valores tivessem se mantido inferiores ao grupo que recebeu dieta contendo bologna sem nitrito. A aparente discrepância entre os resultados pode ser devida, principalmente, ao aumento da quantidade de nitrito residual na bologna. À medida que houve um aumento acima de 5,6 ppm, a eficiência de conversão do ferro da carne em hemoglobina dos ratos também aumentou. O nitrito residual nos alimentos pode causar metemoglobinemia, reduzindo a capacidade de transporte do oxigênio pelo sangue (L'HIRONDEL e L'HIRONDEL, 2001). É bem conhecido também que a hipóxia tissular ocorre como resultado de qualquer agente que interfere na capacidade de transporte do oxigênio do sangue. A hipóxia estimula a hematopoiese. Aparentemente, quando foi adicionado mais de 50 ppm de nitrito de sódio, o nitrito residual na bologna causou um estímulo que resultou em hematopoiese mais rápida e produziu uma alteração na eficiência da utilização do ferro, comparada com a bologna elaborada com menos de 50 ppm de nitrito.

Da mesma forma, esse efeito pode ser sugerido para os resultados deste segundo ensaio. A mortadela foi elaborada com uma adição de nitrito da ordem de 150 a 200 ppm, o que pode ter garantido o nível de nitrito residual superior ao valor de 5,6 ppm. PEREIRA (2000) encontrou um nível de nitrito residual de 17,90 ppm para mortadela formulada com 20% de sangue líquido tratado com CO.

Em um primeiro momento e conforme já discutido, parece que os resultados apresentados nas Tabelas 16 e 17 foram abaixo do esperado. Todavia, diversos estudos reportam que a biodisponibilidade de ferro em carnes e frações do sangue é inferior àquela conseguida com o sulfato ferroso, o que foi verificado, neste trabalho, somente para as mortadelas de 0 a 15% (nível de 24 ppm), considerando o ganho de hemoglobina, e nas mortadelas de 5, 15 e 20%, no caso da biodisponibilidade de ferro medida pelo valor de HRE.

DUARTE et al. (1999) avaliaram a biodisponibilidade de ferro em fração celular de sangue e em um complexo heme-carboximetilcelulose. As dietas utilizadas na fase de repleção foram elaboradas para fornecer 36 mg de ferro/kg de dieta. Os resultados encontrados para HRE foram estatisticamente maiores para dieta controle contendo sulfato ferroso ($P < 0,05$) do que para as outras duas dietas. Valores de HRE (%) para as duas fontes de ferro do sangue representaram 65-70% da biodisponibilidade do sulfato.

Os valores de HRE obtidos neste estudo variaram de 68,53 a 58,61% (Tabela 17), para o sulfato ferroso, de acordo com o nível de ferro testado, e foram superiores aos 48% encontrados por DUARTE et al. (1999) e aos 50,6% reportados por CABRAL e SGARBIERI. (1992). RANGARAJAN et al. (1998) encontraram valores de HRE de 55, 73 e 63% para as dietas de sulfato ferroso suplementadas com níveis de 5, 15 e 25 ppm, respectivamente.

ROTRUCK e LUHRSEN (1979) compararam a biodisponibilidade de ferro de produtos de soja e de carne bovina cozida. As dietas foram preparadas de modo a conterem 4, 8 e 12 ppm de ferro. Os animais foram mantidos em períodos de depleção e repleção com duração de 5 e 2 semanas, respectivamente. Os resultados mostraram que a biodisponibilidade de ferro do isolado protéico de soja variou de 82 a 100%, quando comparada ao sulfato ferroso. Já a biodisponibilidade do ferro da dieta de carne cozida variou de 26 a 55%, comparada ao sulfato ferroso. Os valores encontrados para HRE (Tabela 17), relativos ao sulfato ferroso, em todas as mortadelas estudadas, foram superiores e variaram de 75 a 100%, sendo também maior do que os 60% reportado por ZHANG et al. (1989), para o ferro da carne bovina. Estudos realizados por Bannerman (1965), citado por ROTRUCK e LUHRSEN (1979), também confirmaram os resultados de que a absorção do ferro da carne foi cerca de 50% daquela do sulfato ferroso em todos os níveis testados, em animais não-anêmicos, e variou de um terço a metade da absorção do sulfato ferroso, em animais anêmicos.

RANGER e NEALE (1984) avaliaram a biodisponibilidade de ferro de amostras de proteína de soja, carne bovina e de aves e combinações de soja e carne, comparando com o sulfato ferroso através do método de recuperação da eficiência

de hemoglobina. Os níveis de hemoglobina alcançados com 3 a 4 semanas de depleção foram de 5 a 6 g/dL. As dietas utilizadas na fase de repleção, de 7 dias de duração, foram elaboradas para fornecer 25 mg de ferro/kg de dieta. Comparados ao sulfato ferroso (55%), a biodisponibilidade de ferro variou de 29 a 57% para as dietas à base de soja, de 32 a 39% para as dietas a base de carne e de 61 a 92% para os produtos da combinação de carne mais soja.

PARK et al. (1983) determinaram a biodisponibilidade de ferro heme de hemoglobina suína e bovina fresca, liofilizada, cozida e nitrosilada, utilizadas para ajustar conteúdo de ferro em 30 ppm. Os resultados encontrados mostraram que a biodisponibilidade das hemoglobinas foram cerca de um terço da obtida para o sulfato ferroso, independente do tratamento conferido a hemoglobina. O ganho de hemoglobina para os ratos alimentados com as dietas de hemoglobina foram inferiores a 1,0 g/dL, enquanto os ratos que receberam a dieta de sulfato ferroso ganharam de 4 a 6g/dL.

ZHANG et al. (1991) mediram a biodisponibilidade de ferro de carne bovina, isolado protéico de soja (IPS) e misturas proporcionais de carne bovina e IPS em ratos anêmicos (5,6 g/dL) e saudáveis (11,4 g/dL), cujo conteúdo de ferro das dietas foi ajustado para 25 ppm. A biodisponibilidade de ferro, medida pela HRE, foi de 37% para os ratos anêmicos e 42% para os ratos saudáveis, quando receberam dieta à base de carne bovina, e de 56 e 42% para dieta a base de IPS para ratos anêmicos e não-anêmicos, respectivamente. O valor de HRE foi de 71 e 44% para os ratos anêmicos e saudáveis, respectivamente, quando alimentados com dieta de sulfato ferroso e mantidos por um período de repleção de 10 dias.

JANSUITTIVECHAKUL et al. (1985) reportaram valores de HRE de 60 e 37%, relativos ao sulfato ferroso, para carne bovina e hemoglobina, respectivamente, em um período de repleção de 10 dias.

FARMER et al. (1977) avaliaram a biodisponibilidade de carne bovina manualmente e mecanicamente desossada em dietas formuladas com 20 ppm de ferro, durante um período de repleção de 11 dias. Os ratos alimentados com a dieta de sulfato ferroso tiveram maior valor final (11,24 g/dL) e maior ganho de hemoglobina (6,29 g/dL), do que as dietas de carnes manualmente (8,95 e 3,96

g/dL) e mecanicamente (7,97 e 2,98 g/dL) desossadas. O mesmo foi confirmado pelos autores para o valor de HRE, que apresentaram, em relação ao sulfato ferroso, 59 (manualmente) e 79% (mecanicamente) da biodisponibilidade de ferro.

ALLRED et al. (1990) obtiveram valores de eficiência na recuperação de hemoglobina de 40, 39 e 55%, respectivamente, para carne de peru mecanicamente desossada, manualmente desossada e sulfato ferroso. O ganho de hemoglobina foi, na mesma seqüência, de 3,22, 2,83 e 4,47 g/dL, mostrando que o sulfato ferroso apresentou melhor biodisponibilidade de ferro.

Estudo conduzido por FLY e CZARNECKI-MAULDEN (2000) determinou a biodisponibilidade de ferro da hemoglobina e da “hemin” utilizando níveis de ferro de 0 a 18 ppm, para a dieta de sulfato ferroso, e 9 e 18 ppm, para as dietas de “hemin” e hemoglobina bovina. Em relação ao sulfato ferroso, a “hemin” mostrou um valor de 22%, enquanto a biodisponibilidade de ferro da dieta de hemoglobina foi de 68%, em relação ao sulfato ferroso.

A biodisponibilidade de ferro de sulfato ferroso, do grupo heme preparado a partir da hemoglobina (HIP) e de músculo vermelho do peixe bonito (liofilizado, aquecido e liofilizado, aquecido e defumado) foi determinada em ratos anêmicos ($4,5 \pm 0,3$ g/dL), usando o método de eficiência na recuperação de hemoglobina (HRE), por MATSUMOTO et al. (2003). As dietas foram elaboradas para fornecerem 17 ppm de ferro e oferecidas aos animais por 14 dias. Os ratos que receberam sulfato ferroso tiveram maior HRE (75%) que os outros quatro grupos mencionados, cujo valor foi de aproximadamente 80%, em relação ao sulfato. A biodisponibilidade do HIP, em relação ao sulfato, foi de apenas 22%.

De acordo com os resultados reportados na literatura para a biodisponibilidade de ferro de carnes e da hemoglobina sempre inferiores ao do sulfato ferroso, pode-se concluir que todas as mortadelas tiveram um bom desempenho na recuperação do nível de hemoglobina (HRE), sendo comparável ao do sulfato ferroso, com exceção das mortadelas com 5, 15 e 20% de adição de sangue, no nível de 24 ppm, que apresentaram valores inferiores (Tabela 17).

A boa biodisponibilidade de ferro produzida pelas mortadelas adicionadas de sangue nos animais pode ser devida ao efeito denominado fator carne. Esse fator

pode ter contribuído para aumentar a biodisponibilidade de ferro não-heme, proveniente de outros constituintes da dieta, da própria carne e do sangue (MARTÍNEZ et al., 1999; MULVIHILL et al., 1998; GARCIA et al., 1996; ROGOV et al., 1989). A deficiência da hemoglobina, rica em ferro heme, em promover valores altos de HRE não foi observada neste estudo, à medida que se aumentou o nível de sangue nas mortadelas. Apesar de a literatura reportar que o ferro heme da hemoglobina é absorvido com menor eficiência do que o da carne, a substituição de carne por sangue não afetou o valor de HRE. Uma possível explicação para isso encontra-se no fato de as mortadelas conterem maior teor de ferro heme, pela adição do sangue, além do fator carne presente.

Ferro heme, fornecido como hemoglobina, mostrou-se 3 a 7 vezes mais biodisponível que o ferro não-heme em humanos quando administrado em refeições contendo carne (SOUTH et al., 2000). Outros estudos mostram que 2 a 3 vezes mais ferro heme é absorvido de refeições contendo carne quando comparado com refeições sem carne (MARTÍNEZ-TORRES e LAYRISSE, 1971).

Alguns autores têm atribuído o fator carne à ação de peptídios sulfurados, derivados da digestão das proteínas da carne contendo cisteína, presentes nos tecidos musculares do boi, porco, cordeiro, frango peixe e fígado. A ação desses peptídios sulfurados se daria por duas vias: pelo efeito redutor do grupo sulfidril (-SH) sob o íon férrico (Fe^{+3}), nas condições do lúmen intestinal, aumentando a concentração de ferro ferroso (Fe^{+2}) que é mais bem absorvido, e pela formação de um quelato solúvel entre a cisteína e o ferro, reduzindo a ação dos interferentes da dieta e melhorando a sua absorção (HIGGS, 2000; MULVIHILL e MORRISEY, 1998a; HURRELL, 1997; KAPSOKEFALOU e MILLER, 1991). Assim, as proteínas da carne aumentam a absorção de ferro em 2 a 4 vezes. Como resultado, a assimilação do ferro não-heme da carne não é de 3 a 5%, como no caso de alimentos derivados de vegetais, mas de 10 a 12% (ROGOV et al., 1989).

GARCIA et al. (1996) afirmam que, embora haja importantes alterações na proporção de ferro heme/não heme com o cozimento da carne, o fator presente na carne, responsável por melhorar a absorção de ferro não-heme, não é afetado.

Outra explicação plausível para a boa biodisponibilidade de ferro das mortadelas pode estar associada com o efeito protetor exercido pelo nitrito frente ao processo de cozimento e secagem das mesmas. Há evidências de que a complexação de mioglobina e hemoglobina com nitrito, utilizado em produtos cárneos, estabiliza as hemeoproteínas, em especial o núcleo porfirínico, contra o calor, prevenindo a conversão do ferro heme para a forma não-heme (GRAY e PEARSON, 1987; LOVE, 1987; SCHRICKER e MILLER, 1983). Neste caso, a redução de ferro heme é de 25% para a mioglobina e de 10% para a hemoglobina, após o cozimento (ROGOV, 1989), o que poderá implicar em uma maior biodisponibilidade de ferro do produto.

É oportuno destacar que o pigmento carboxiemoglobina (COHb), originado da reação da hemoglobina com o CO, é mais resistente à oxidação devido à forte ligação do CO ao núcleo porfirínico da molécula de hemoglobina. Baseado nesses princípios, FONTES et al (2004) mostraram que o sangue suíno saturado com CO gera um produto de cor vermelha estável e de considerável estabilidade. Isso permite concluir que, da mesma forma que para o nitrito, o CO estabiliza a hemoglobina do sangue e também diminui a conversão do ferro heme do sangue para a forma não-heme e, conseqüentemente, melhora a biodisponibilidade de ferro das mortadelas.

O uso do rato como modelo animal tem sido questionado para a avaliação da biodisponibilidade de ferro em humanos. No entanto, os resultados dos estudos são contraditórios.

O ferro heme é considerado bem absorvido por humanos e pouco utilizado por ratos (PARK et al, 1983). Bannerman (1965), citado por ROTRUCK e LUHRSEN (1979) mostraram que o ferro da carne (que é predominantemente heme) é utilizado com um terço à metade da eficiência do sulfato ferroso. Eles concluíram que a habilidade do rato em utilizar ferro heme foi previamente subestimada.

Estudos em humanos com níveis normais de ferro mostraram que o ferro heme é absorvido tão bem, senão melhor, do que o ferro de origem inorgânica, como o sulfato ferroso. Contudo, em pessoas com deficiência de ferro, o ferro heme

é absorvido com somente um terço da eficiência do ferro inorgânico (ROTRUCK e LUHRSEN, 1979). Assim, os dados de absorção que comparam ferro heme e ferro inorgânico em indivíduos deficientes e animais estão de acordo, mostrando que os dados provenientes de ensaios com ratos na verdade concordam com os dados de humanos. Além disso, os dados sugerem que a carne ou o ferro heme pode não ser tão boa fonte de ferro como previamente suposta.

Por outro lado, os ratos, ao contrário dos humanos, absorvem íons férrico e ferroso de maneira similar (REDDY e COOK, 1991), produzem vitamina C, a qual interfere positivamente na biodisponibilidade do ferro, além de possuir fitase, enzima capaz de desfazer quelatos do tipo fitato-minerais, aumentando a biodisponibilidade do mineral para absorção intestinal (WIENK, et al., 1999). Portanto, é possível que ao utilizar ratos como modelos, a biodisponibilidade em relação a humanos possa ser superestimada.

Finalizando, o método de repleção de hemoglobina utilizado para avaliar a biodisponibilidade de ferro nas mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue permitiu observar que as dietas de mortadelas tiveram uma eficiência na recuperação de hemoglobina comparável à da dieta padrão e também semelhante entre si, sendo que as mortadelas de 5, 15 e 20% apresentaram a menor biodisponibilidade no nível de 24 ppm. Observou-se incremento no ganho de hemoglobina proporcional à adição de ferro na dieta, embora, no período de 14 dias, as dosagens de 24 ppm não fossem suficientes para restituir os níveis normais de hemoglobina dos ratos.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A fim de buscar novas alternativas para o aproveitamento do sangue animal, foi estudado o efeito da adição de sangue líquido tratado com CO, em diferentes níveis (0, 5, 10, 15 e 20%), em mortadelas, sobre o valor protéico, a biodisponibilidade de ferro e parâmetros bioquímicos séricos e histológicos em ratos.

No que se refere à composição centesimal, lipídios e proteínas não foram afetados significativamente ($P > 0,05$) pelo aumento de sangue na mortadela. O teor de ferro da mortadela aumentou ($P < 0,05$) com a adição de níveis crescentes de sangue, com um ligeiro aumento entre os níveis de 10 e 15%.

As mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue tratado com CO possuem um perfil de aminoácidos que atende os requerimentos do padrão FAO/WHO/UNU. Os resultados do PDCAAS para as mortadelas foram semelhantes ou superiores ao da carne.

Com relação à avaliação da qualidade protéica, as mortadelas promoveram o mesmo crescimento dos animais em comparação com a dieta-padrão de caseína. Observou-se que os índices PER e NPR tiveram desempenho igual ao da caseína, sendo que entre as mortadelas houve diferença estatística ($P < 0,05$). A digestibilidade das mortadelas foi inferior àquela obtida para a caseína, com ligeiro decréscimo desse índice com a adição crescente de sangue.

Apesar desses resultados, os valores em torno de 90% para a digestibilidade das mortadelas contendo sangue são relativamente altos, o que, aliado ao perfil balanceado de aminoácidos, garantiu a alta qualidade das proteínas desses produtos.

Pelo que foi observado, a adição de sangue não trouxe benefícios para a qualidade protéica da mortadela, entretanto, permitiu concluir que a substituição de carne por sangue, nos níveis testados, não prejudicou o valor nutritivo das mesmas. Isso permite a possibilidade de uma maior quantidade de adição de sangue tratado com CO a produtos cárneos emulsionados, como fonte barata de proteína e, ao mesmo tempo, diminuir a poluição ambiental e aumentar a eficiência da indústria de carnes.

O ensaio para avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos e histológicos dos ratos alimentados com mortadelas adicionadas de sangue tratado com CO concluiu-se com 100% de sobrevivência dos animais. Por meio da observação do comportamento dos animais durante os 14 dias experimentais, pode-se constatar que eles não apresentaram desvio de comportamento. Este ensaio mostrou que somente os animais alimentados com a dieta contendo 20% de sangue tratado com CO, cresceram menos, comparado com o grupo que recebeu caseína. Quando se compara entre as mortadelas, verifica-se um ligeiro decréscimo tanto no ganho de peso quanto no consumo alimentar com o aumento dos níveis crescentes de sangue.

Apesar dos testes estatísticos terem evidenciado diferenças, os dados significativos de colesterol total entre os grupos da caseína e das mortadelas, e as alterações nos valores obtidos com os índices de glicose, creatinina, AST e ALT, entre os níveis testados, encontram-se dentro da esperada faixa de normalidade. Dessa forma, as variações encontradas parecem relacionar-se mais à variabilidade biológica dos animais de laboratório do que a manifestações toxicológicas do monóxido de carbono. Com esses estudos pode-se concluir que a substância testada não alterou os parâmetros bioquímicos analisados.

O exame macro e microscópico dos animais não mostrou alteração anatomopatológica que pudesse ser atribuída ao efeito do CO sobre, órgãos e tecidos.

Quanto à avaliação dos dados de hemoglobina, eles se mostraram dentro do intervalo de normalidade, evidenciando que não houve estado anêmico dos animais submetidos às dietas de mortadelas contendo sangue tratado com CO.

Não houve efeito do CO ingerido por meio das mortadelas adicionadas de sangue tratado com CO sobre os níveis sanguíneos de COHb nos ratos.

Conclui-se que nas condições empregadas, o ensaio com ratos mostrou que os animais alimentados com dietas de mortadela contendo níveis crescentes de sangue tratado com CO não apresentaram alterações significativas no peso corporal, no consumo alimentar e na concentração sanguínea de COHb. Este fato é importante por ser indicativo da inocuidade do CO quando empregado em carnes. No entanto, seria útil a realização de estudos, dentro dos protocolos de ensaios toxicológicos *in vivo*, a fim de que o CO possa ser registrado como aditivo de uso em carnes.

O método de repleção de hemoglobina utilizado para avaliar a biodisponibilidade de ferro nas mortadelas adicionadas de níveis crescentes de sangue permitiu observar que as dietas de mortadelas tiveram uma eficiência na recuperação de hemoglobina comparável à da dieta-padrão e também semelhante entre si, sendo que as mortadelas de 5, 15 e 20% apresentaram a menor biodisponibilidade no nível de 24 ppm. Observou-se incremento no ganho de hemoglobina proporcional à adição de ferro na dieta, demonstrando que grande parte do ferro fornecido por essas mortadelas foi absorvido, embora as dietas com dosagens de 24 ppm de ferro não fossem suficientes para restituir os níveis normais de hemoglobina dos ratos, no período de 14 dias. Com o estudo de biodisponibilidade de ferro também foi possível concluir que o ganho de hemoglobina não foi afetado pela presença de nitrito na mortadela. O presente estudo sugere que as mortadelas adicionadas de sangue são efetivas fontes dietéticas de ferro biodisponível. O nível de 20% de adição de sangue tratado com CO mostrou-se, pelas análises bioquímica, hematológica e nutricional, o

mais satisfatório para utilização nas mortadelas por proporcionar maior aproveitamento desse subproduto da indústria cárnea.

6. RECOMENDAÇÕES FUTURAS

Com base nos resultados apresentados, é possível a recomendação dos seguintes itens para estudos futuros em mortadelas adicionadas de sangue:

- Avaliar a qualidade protéica e biodisponibilidade de ferro em mortadelas com e sem sangue tratado com CO, utilizando para confecção das dietas experimentais mortadelas liofilizadas.
- Determinar a composição de ferro heme e não-heme nas mortadelas cozidas e nas submetidas à secagem para elaboração das dietas experimentais.
- Avaliar sensorialmente e microbiologicamente embutidos adicionados de sangue tratado com monóxido de carbono.
- Realizar avaliação nutricional da mistura de sangue com soro de leite.
- Realizar testes toxicológicos com as mortadelas adicionadas de sangue tratado com CO, segundo as exigências dos protocolos atuais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AZIS, S., HUSSEIN, L., ESMAIL, S., EI-AWADI, N. *In vivo* rat assay for true protein digestibility and protein quality of beef and meat products extended with soy protein. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v.48, p.51-56, 1997.

ABERLE, E.D., FORREST, J.C., GERRARD, D.E., MILLS, E. **Principles of meat science**. 4. ed. Iowa: Kendall/Hunt Publishing, 2001. 354p.

ADICON - Indústria e Comércio de Aditivos Ltda. **Mortadela**. São Bernardo do Campo, SP. [199_] (Boletim Técnico).

ALCÂNTARA, H.R. **Toxicologia clínica e forense**. 2.ed. São Paulo: Andrei, 1985. 427p.

ALLRED, L.C., HENDRICKS, D.G., MAHONEY, A.W., ZHANG, D., BELL, D.E. Protein quality and iron bioavailability of mechanically and hand-deboned turkey meat fed to rats. **Poultry Science**, v.69, p.341-347, 1990.

AMAYA, H., ACEVEDO, E., BRESSANI, R. Efecto del recalentamiento sobre la disponibilidad de hierro y el valor nutritivo de la proteína del frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) cocido. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.41, n.2, p.222-237, Jun. 1991.

ANALISA DIAGNÓSTICA. **Técnicas analíticas**. Belo Horizonte, MG, 2003 (Instrução de Uso).

ANDREWS, N.C. Medical progress: disorders of iron metabolism. **N. Engl. J. Med.**, v.341, n.26, p.1986-1995, 1999.

Anemia Consultative Group (INACG)/WHO/UNICEF. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, 1998.

ANSEJO, J.A., AMAR, M., CARTAGENA, N., KING, J., HICHE, E., STEKEL, A. Use of a bovine heme iron concentrate in the fortification of biscuits. **Journal of Food Science**, v.50, n.3, p.795-799, 1985.

ANTONINI, E., BRUNORI, M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. In: NEUBERGER, A., TATUM, E.L. (Eds.). **Frontiers of Biology**. Amsterdam: 1971. v.21. 436p.

ANUALPEC 2005. **Anuário da pecuária brasileira**. 11.ed. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio. 340p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed. Washington, D.C., 1996.

AUTIO, K., KIESVAARA, M., MALKKI, Y., KANKO, S. Chemical and functional properties of blood globin prepared by a new method. **Journal of Food Science**, v.49, n.3, p.859-862, 1984.

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

BATES, R.P., WU, L.C., MURPHY, B. Use of animal blood and cheese whey in bread: nutritive value and acceptance. **Journal of Food Science**, v.39, p.585-587, 1974.

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

BATRA, V., BHOWMICK, A., BEHERA, B.K., RAY, A.R. Sustained release of ferrous sulfate from polymer-coated gum arabica pellets. **J. Pharm. Sci.**, v.83, n.5, p.632-635, 1994.

BEARD, J.L., DAWSON, H., PIÑERO, D.J. Iron metabolism: a comprehensive review. **Nutrition Reviews**, v.54, n.10, p.295-317, 1996.

BELKOT, Z. The nutritional value of cattle blood. **Medycyna Weterynaryjna**, v.57, n.6, p.412-414, 2001.

BENDER, A.E., DOELL, B.H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **British Journal of Nutrition**, v.11, p.138-143, 1957.

- BENDER, F.E., DOUGLAS, L.W., KRAMER, A. **Statistical methods for food and agriculture**. Westport: Avi Publishing Company, 1982. p.91-94.
- BENITEZ, M.A., GRIJALVA, M.I., VALENCIA, M.E. Total and soluble iron content and effect of certain inhibitors present in select varieties of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). **Journal of Agricultural Chemistry**, v.42, p.1300-1302, 1994.
- BENITO, P., MILLER, D. Iron absorption and bioavailability: an updated review. **Nutrition Research**, v.18, n.3, p.581-603, 1998.
- BEUTLER, E., WEST, C. Simplified determination of carboxyhemoglobin. **Clinical Chemistry**, v.30, n.6, p.871-874, 1984.
- BIANCHI, M.L.P., SILVA, H.C., OLIVEIRA, J.E.D. Considerações sobre a biodisponibilidade do ferro dos alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.42, n.2, p.94-100, 1992.
- BOGUNJOKO, F.E., NEAB, R.J., LEDWARD, D.A. Availability of iron from chicken meat and liver given to rats. **Br. J. Nutr.**, v.50, n.3, p.511-520, 1983.
- BÖNI, R.E., HUCH BONI, R.A., GALBRAITH, R.A., DRUMMOND, G.S., KAPPAS, A. Tin-mesoporphyrin inhibits heme oxygenase activity and heme-iron absorption in the intestine. **Pharmacology**, v.47, n.5, p.318-329, 1993.
- BÓS, C., GAUDICHON, C., TOMÉ, D. Nutritional and physiological criteria in the assessment of milk protein for humans. **Journal of the American College of Nutrition**, v.19, n.2, p.191S-205S, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Área técnica de alimentação e nutrição**, 2002. Disponível em: [<http://www.saude.gov.br/sps/areastecnicas/carencias/index/html>] Acessado em: 03/02/2002.
- BRASIL. Resolução - RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. **Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico**. Diário Oficial da União, Brasília, 18 de dezembro de 2002.
- BRESSANI, R., ELIAS, L.G. All vegetable protein mixtures for human feeding. **Journal of Food Science**, v.31, p.626-630, 1983.
- BREWER, M.S., WU, S., FIELD, R.A., RAY, B. Carbon monoxide effects on color and microbial counts of vacuum packaged beef steaks in refrigerated storage. **Journal of Food Quality**, v.17, p.231-236, 1994.

BRITISH NUTRITION FOUNDATION. **Iron nutritional and physiological significance.** London: Chapman & Hall, 1995. 186p.

CABRAL, M.M.V.N., SGARBIERI, V.C. Hemoglobin repletion in anemia rats fed a new bean cultivar (*Phaseolus vulgaris* L.) as source of iron. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v.38, p.481-491, 1992.

CALDIRONI, H.A., OCKERMAN, H.W. Incorporation of blood proteins into sausage. **Journal of Food Science**, v.47, p.405-408, 1982.

CARDOSO, M.A., PENTEADO, M.V.C. Intervenções nutricionais na anemia. **Cadernos de Saúde Pública**, v.10, p.231-240, 1994.

CAREGARO, L., ALBERINO, F., AMODIO, P., MERKEL, C., BOLOGNESI, M., ANGELI, P., GATTA, A. Malnutrition in alcoholic and virus-related cirrhosis¹⁻³. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.63, n.4, p.602-609, 1996.

CARPENTER, C.E., MAHONEY, A.W. Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.31, n.4, p.333-367, 1992.

CARPENTER, K.J. Background paper 2: possible importance of protein digestibility and bioavailability of amino acids. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.40, n.3, p.675-685, 1984.

CENDON, S.P., BATTLEHNER, C., LORENZI-FILHO, G., DOHLNIKOFF, M., PEREIRA, P.M, CONCEIÇÃO, G.M.S., BEPPU, O.S., SALDIVA, P.H.N. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. Emphysema in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p.1241-1247, 1997.

CHEN, C.C., PEARSON, A.M., GRAY, J.I., FOOLADI, M.H., KU, P.K. Some factors influencing the nonheme iron content of meat and its implication in oxidation. **J. Food Sci.**, v.49, p.581-584, 1984.

CLARK, D.S., LENTZ, C.P., ROTH, L.A. Use of carbon monoxide for extending shelf-life of prepackaged fresh beef. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.9, n.3, p.114-117, 1976.

CLYDESDALE, F.M., CHIN TAN HO LEE, C.Y., MONDAY, N.I., SHEWFELT, R.L. The effects of postharvest treatment and chemical interactions on the bioavailability of ascorbic acid, thiamin, vitamin A, carotenoids and minerals. **Critical Reviews of Food and Science Nutrition**, v.30, p.599-638. 1991.

CLYDESDALE, F.M. Physicochemical determinants of iron bioavailability. **Food Technology**, v.37, n.10, p.133-144, 1983.

COBURN, R.F., FORSTER, R.E., KANE, P.B. Considerations of the physiological variables that determine the blood carboxyhemoglobin in man. **Journal of Clinical Investigations**, v.44, p.1899-1910, 1965.

COLLI, C., MANCINI FILHO, J., CINTRA, R.G., SOARES, S., MIRANDA, M.S. Avaliação da estabilidade de biscoitos fortificados com hemoglobina bovina e sulfato ferroso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 14, 1994, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: 1994. p.51.

CONCEIÇÃO, E.C., SHUHAMA, T., IZUMI, C., FREITAS, O. Iron supplementation prevents the development of iron deficiency in rats with omeprazole-induced hypochlorhydria. **Nutrition Research**, v.21, p.1201-1208, 2001.

CONNOR, S.L., GUSTAFSON, J.R., SEXTON, G., BECKER, N., ARTAUDWILD, S., CONNOR, W.E. The diet habit survey: a new method of dietary assessment that relates to plasma cholesterol changes. **J. Am. Dietetic Assoc.**, v.92, p.41-47, 1992.

CONRAD, M.E., UMBREIT, J.N., MOORE, E.G. A role for mucin in the absorption of inorganic iron and other metal cations. **Gastroenterology**, v.100, p.129-136, 1991.

CONRAD, M.E., UMBREIT, J.N., MOORE, E.G. Iron absorption and transport. **Am. J. Med. Sci.**, v.318, n.4, p.213-229, 1999.

CONRAD, M.E., WEINTRAUB, L.R., SEARS, D.A., CROSBY, W.H. Absorption of hemoglobin iron. **Am. J. Physiol.**, v.211, n.5, p.1123-1130, 1966.

COOK, J.D., CARRIAGA, M., KAHN, S.G., SCHALCH, W., SKIKNE, B.S. Gastric delivery system for iron supplementation. **Lancet**, v.335, n.8698, p.1136-1139, 1990.

COOK, J.D., DASSENKO, S.A., WHITTAKER, P. Calcium supplementation: effect on iron absorption. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.53, p.106-11, 1991.

COOK, J.D., MONSEN, E.R. Food iron absorption in human subjects. III. Comparison of the effect of animal proteins on nonheme iron absorption. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.29, p.859-867, 1976.

COZZOLINO, S.M.F.; PEDROSA, L.F.C. Grupo de trabalho: biodisponibilidade de nutrientes. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.1, p.53-56, jan./jun. 1995.

CRISPENS Jr., C.G. **Handbook on the laboratory mouse**. Library of Congress, Illinois, p.114-121, 1975.

DA SILVA, S.B., MELLADO, M. Elaboração de um biscoito de chocolate enriquecido com sangue bovino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 14, 1994, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: 1994. p.86.

DALLMAN, P.R., REEVES, J.D. Diagnóstico de laboratório de la deficiencia de hierro. In: EL HIERRO en la alimentacion del lactente y del niño. **Nestlé Nutrition**, 1984. p.11-20.

DAMODARAN, S. Amino acids, peptides, and proteins. In: FENNEMA, O.R. (Ed.). **Food Chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p.321-429.

DAVIDSSON, L., MACKENZIE, J., KASTENMAYER, P. Dietary fiber in weaning cereals: a study of the effect on stool characteristics and absorption of energy, nitrogen, and minerals in healthy infants. **J. Pediatr. Gastroenterl. Nutr.**, v.22, p.167-179, 1996.

DE ANGELIS, R.C. Digestão e absorção de nutrientes. In: DUTRA-DE-OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.S. (Eds.). **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998. p.3-17.

DE ANGELIS, R.C. **Fome oculta, impacto para a população do Brasil**. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. 236p.

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

DELANEY, R.A.M. Protein concentrates from slaughter animal blood. I. Preparation and purification of red blood cell concentrates. **Journal of Food Technology**, v.12, p.339-354, 1977.

DELANEY, R.A.M. The nutritive value of porcine blood plasma concentrates prepared by ultrafiltration and spray drying. **Journal of Science and food Agriculture**, v.26, p.303-310, 1975.

DELANEY, R.A.M., DONNELLY, J.K., BENDER, L.D. Concentration and characterisation of porcine blood plasma. **Lebensmittel-wissenschaft und technologie**, v.8, n.1, p.20-24, 1975.

DEXTER, D.T., CARAYON, A., AVOY-AGID, F., AGID, Y., WELL, F.R., DANIEL, S.E., LEES, A.J., JENNER, P., MARSDEN, C.D. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other

- neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. **Brain**, v.114, p.1953-75, 1991.
- DILL, C.W. Plasma in edible meat products. **The National Provisioner**, p.56-62, 1976.
- DILL, C.W., LANDMANN, W.A. Food grade proteins from edible blood. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (Eds.). **Advances in meat research**. New York: Elsevier Applied Science, 1988. v.5. p.127-145.
- DOKKUM, W.V. Significance of iron bioavailability for iron recommendations. **Biological Trace Element Research**, v.35, p.1-11, 1992.
- DOMENE, S.M.A. Utilização de sangue bovino para alimentação humana. **Revista de Nutrição da PUCCAMP**, v.1, p.163-179, 1988.
- DUARTE, R.T., SIMÕES, M.C.C., SGARBIERI, V.C. Bovine blood components: fractionation, composition, and nutritive value. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.231-236, 1999.
- EL-BADAWI, A.A., CAIN, R.F., SAMUELS, C.E., ANGLEMEIER, A.F. Color and pigment stability of packaged refrigerated beef. **Food Technology**, v.18, n.5, p.159-166, 1964.
- ERBERSDOBLER, H.F. Nutrition physiological importance of meat. **Ernahrung**, v.19, n.12, p.611-614, 1995.
- FAIRBANKS, V.F. Iron in medicine and nutrition. In: SHILS, M.E., OLSON, J.A., SHIKE, M. (Eds.). **Modern nutrition in health and disease**. 8.ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1994. v.1. p.185-213.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Bioavailability of trace elements. **Food Chemistry**, v.43, p.213-217, 1992.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J. The effect of different levels of wheat bran on iron absorption in rats from bread containing similar amounts of phytate. **British Journal of Nutrition**, v.47, p.243-249, 1982.
- FANELLI, A.R., ANTONINI, E., CAPUTO, A. Hemoglobin and myoglobin. **Advances in Protein Chem.**, v.19, p.74-213, 1964.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Protein quality evaluation**. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Roma, 1990.

FAO. Animal blood-processing and utilization. Rome: **FAO Agricultural Services Bulletin**, 1982. 101p.

FAO. **Necesidades de vitamina A, hierro, folato y vitamina B12**: informe de una consulta mista FAO/OMS de expertos. Roma, 1991. 121p. (Serie Estudios FAO Alimentación y Nutrición).

FAO/WHO. **Protein requirements**. Report of a joint FAO/WHO Expert Group. FAO Nutrition Meetings Report nº 37. Roma, 1965.

FAO/WHO/UNU. **Energy and protein requirements**. Report of the joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report Series nº 724, FAO/WHO and the United Nations University, Geneva, 1985.

FARMER, B.R., MAHONEY, A.W., HENDRICKS, D.G., GILLET, T.A. Iron bioavailability of hand-deboned and mechanically deboned beef. **J. Food Sci.**, v.42, n.6, p.1630-1632, 1977.

FERREIRA, V.L.P., FERNANDES, S.V., YOTSUYANAGI, K. The colour of chicken and pork meat loaf with added cured bovine blood as evaluated by the Rab, Hunter Lab, L* a* b* and XYZ CIE systems. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v.34, n.3, p.311-322, 1994.

FINCH, C.A., COOK, J.D. Iron deficiency. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.39, n.3, p.471-477, 1984.

FINCH, C.A., DEUBELBEISS, K., COOK, J.D., ESCHBACH, J.W., HARKER, L.A., FUNK, D.D., MARSAGLIA, G., HILLMAN, R.S., SLICHTER, S., ADAMSON, J.W., GANZONI, A., BIBLETT, E.R. Ferrokinetics in man. **Medicine**, v.49, n.1, p.17-53, 1970.

FLY, A.D., CZARNECKI-MAULDEN, G.L. Iron bioavailability from hemoglobin and hemin in chick, rat, cat, and dog: a comparative study. **Nutrition Research**, v.20, n.2, p.237-248, 2000.

FONTES, P.R. **Estudo da estabilidade da cor do sangue suíno tratado com monóxido de carbono**. Viçosa, MG: UFV, 1999, 140p. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, 1999.

FONTES, P.R., GOMIDE, L.A.M., RAMOS, E.M., STRINGHETA, P.C., PARREIRA, J.F.M. Color evaluation of carbon monoxide treated porcine blood. **Meat Science**, v.68, p.507-513, 2004.

FREIRE, W. B. Strategies of the Pan American Health Organization/World Health Organization for control of iron deficiency in Latin America. **Nutr. Rev.**, v.55, n.6, p.183-188, 1997.

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. **J. Agric. Food chem.**, v.44, p.6-29, 1996.

FRIEDMAN, M. **Protein nutritional quality of food and feeds: nutrition and clinical nutrition**. New York: Marcel Dekker, 1975, v.1. 626p.

FRITZ, J.C., PLA, C.W., ROBERTS, T. Biological availability in animals of iron from common dietary sources. **J. Agric. Food Chem.**, v.18, p.647-651, 1970.

GARCIA, M.N., MARTINEZ-TORRES, C., LEETS, I., TROPPER, E., RAMIREZ, J. LAYRISSE, M. Heat treatment on heme iron and iron-containing proteins in meat: iron absorption in humans from diets containing cooked meat fractions. **J. Nutr. Biochem.**, v.7, p.49-54, 1996.

GARCÍA-CASAL, M.N. LAYRISSE M., SOLANO, L. BARÓN, M.A., ARGUELLO, F., LLOVERA, D., RAMÍREZ J., LEETS, I., TROPPIER, E. Vitamin A and β -carotene can improve nonheme iron absorption from rice, wheat and corn by humans. **J. Nutr.**, v.128, p.646-650, 1998.

GARCÍA-CASAL, M.N., LAYRISSE, M. Absorción del hierro de los alimentos: papel de la vitamina A. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.48, n.3, p.191-195, 1998.

GEIL, P.B., ANDERSON, J.W. Nutrition and health implications of dry beans: a review. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.13, n.6, p.549-558, 1994.

GIBSON, R.S. Technological approaches to combatting iron deficiency. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.51, p.25-27, 1997. (Suppl., 4S).

GIDDINGS, G.G. The basis of color in muscle foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.**, v.8, p.81-113, 1977.

GILL, C.O. Microbiology of edible meat by-products. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (Eds.). **Advances in meat research**. New York: Elsevier Applied Science, 1988. v.5. p.73-74.

GILLOOLY, M., BOTHWELL, T.H., CHARLTON, R.W. et al. Factors affecting the absorption of iron from cereals. **British Journal of Nutrition**, v.51, p.37-46, 1984.

GORBATOV, V.M. Collection and utilization of blood proteins for edible purposes in the USSR. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (Eds.). **Advances in meat research**. New York: Elsevier Applied Science, 1988. v.5, p.167-195.

GORDON, A. Animal blood as a source of proteins in food products. **Food Trade Review**, v.41, n.4, p.29-30, 1971.

GORDON, D.T.; CHAO, L.S. Relationship of components in wheat bran and pinach to iron bioavailability in the anemic rat. **Journal of Nutrition**, v.114, p.526-535, 1984.

GOYCOOLEA, F., MEJÍA, E.G., BARRÓN, J.M. et al. Efecto de los tratamientos caseros en la preparación de frijol Pinto (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre el contenido de taninos y valor nutritivo de las proteínas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.40, n.2, p.263-274, 1990.

GRAY, J.I., PEARSON, A.M. Rancidity and warmed-over flavor. In: Pearson, A.M., Dutson, T.R. (Eds.). **Advances in meat research**. New York: Elsevier Applied Sciences, 1987. v.3. p.221-269.

GROFF, J.L., GROPPER, S.S., HUNT, S.M. **Advanced nutrition and human metabolism**. West Publishing Company:USA, 1995. 575p.

GUERRA, M.O., PETERS, V.M. Morfometria de ratos wistar: peso e medidas corporais. **Revista Ciências Biomédicas de São Paulo**, v.15, p.65-74, 1995.

GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Tratado de fisiología médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1014p.

HAAST, J., MORRESSEY, P.A., FOX, P.F Protein co-precipitates from milk and blood plasma: preparation and investigation of some functional properties. **Journal of Science of Food and Agricultural**, v.39, p.253-265, 1987.

HACKLER, L.R. Background paper 3: rat bioassay methods for assessing protein quality of meat and poultry products. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.40, n.3, p.711-717, 1984.

HALLBERG, L. Bioavailability of dietary iron in man. **Annual Review Nutrition**, v.1, p.123-147, 1981.

HALLBERG, L. Results of surveys to assess iron status in Europe. **Nutr. Rev.**, v.53, n.11, p.314-322, 1995.

HALLBERG, L., BENGTSSON, C., LAPIDUS, L., LINDSTEDT, G., LUNDBERG, P.A., HULTEN, L. Screening for iron deficiency: An analysis based on bone-marrow examinations and serum ferritin determinations in a population sample of women. **British Journal of Haematology**, v.85, p.787-798, 1993.

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

- HALLBERG, L., HULTHEN, L. Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, p.1147-60, 2000.
- HALLBERG, L., ROSSADER-HULTEN, L., BRUNE, M., GLEERUP, A. Inhibition of haem-iron absorption in man by calcium. **British Journal of Nutrition**, v.69, p.533-540, 1992a.
- HALLBERG, L., ROSSANDER-HULTHEN, L., BRUNE, M., GLEERUP, A. Calcium and iron absorption mechanism of action and nutritional importance. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.49, p.317-327, 1992b.
- HALLBERG, L., SÖLVELL, L. Absorption of hemoglobin iron in man. **Acta Med. Scand.**, v.181, n.3, p.335-54, 1967.
- HALLIDAY, D.A. Blood - A source of proteins. **Process Biochemistry**, v.8, n.12, p.15-17, 1973.
- HALLIDAY, D.A. Blood - A source of proteins. **Process Biochemistry**, v.10, n.4, p.11-12, 1975.
- HAN, D., McMILLIN, K.W., GODBER, J.S., BIDNER, T.D., YOUNATHAN, M.T., MARSHALL, D.L., HART, L.T. Iron distribution in heated beef and chicken muscles. **J. Food Sci.**, v.58, n.4, p.697-700, 1993.
- HAZARIKA, M., BIRO, G. Effect of incorporation of blood proteins into sausage. **Journal of Food Science and Technology**, v.30, n.5, p.380-381, 1993.
- HAZELL, T., LEDWARD, D.A., NEALE, R.J. Iron availability from meat. **British Journal of Nutrition**, v.39, p.631-638, 1978.
- HEGSTED, D.M. Protein quality and its determination. In: WHITAKER, J.R., TANNENBAUM, S.R. (Eds.). **Food proteins**. Westport: AVI Publishing, 1977, p.347-362.
- HENLEY, E.C., KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. **Food Technology**, v.48, n.4, p.74-77, 1994.
- HERNANDEZ, M., MONTALVO, I., SOUZA, V., SOTELO, A. The protein efficiency ratios of 30:70 mixtures of animal vegetable protein are similar or higher than those of animal foods alone. **J. Nutr.**, v.126, p.574-581, 1996.
- HIGGS, J.D. The changing nature of red meat: 20 years of improving nutritional quality. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p85-95, 2000.

HOWELL, N.K., LAWRIE, R.A. Functional aspects of blood plasma proteins. I. Separation and characterization. **Journal of Food Technology**, v.18, n.6, p.747-762, 1983.

HURRELL, R.F., COOK, J.D. Strategies for iron fortification of foods. **Food Sci. Technol.**, v.53, n.1, p.56-61, 1990.

HURRELL, R.F., LYNCH, S.R., TRINIDAD, T.P., DASSENKO, S.A., COOK, J.D. Iron absorption in humans: bovine serum albumin compared with beef muscle and egg white. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.47, n.1, p.102-107, 1988.

HURRELL, R.F. Bioavailability of iron. **The European Journal of Clinical Nutrition**, v.51, p.4-8, 1997. (Suppl., 1).

INTERNATIONAL NUTRITIONAL ANEMIA CONSULTATIVE GROUP. INACG Symposium. 12 March 1999, Durban South Africa, p.1-60. ILSI Research Foundation, Washington, 2000.

IOST, C., NAME, J.J., JEPPSEN, R.B., ASHMEAD, H.W. Repleting hemoglobin in iron deficiency anemia in young children through liquid milk fortification with bioavailable iron amino acid chelate. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.17, n.2, p.187-194, 1998.

JANSUITTIVECHAKUL, O., MAHONEY, A.W., CORNFORTH, D.P., HENDRICKS, D.G., KANGSADALEMPAI, K. Effect of heat treatment on bioavailability of meat and hemoglobin iron fed to anemic rats. **J. Food Sci.**, v.50, p.407-409, 1985.

JANSUITTIVECHAKUL, O., MAHONEY, A.W., CORNFORTH, D.P., HENDRICKS, D.G., SISSON, D.V. Effect of heat treatment on meat enhancement of dietary iron bioavailability of meat/ferrous sulfate and meat/hemoglobin mixtures fed to anemic rats. **J. Food Sci.**, v.51, n.2, p.263-267, 1986.

JAYASINGH, P., CORNFORTH, D.P., CARPENTER, C.E., WHITTIER, D. Evaluation of carbon monoxide treatment in modified atmosphere packaging or vacuum packaging to increase color stability of fresh beef. **Meat Science**, v.59, p.317-324, 2001.

JEWELL, D.K., KENDRICK, J.G., SATTERLEE, L.D. The DC-PER assay: a method for predicting protein quality solely from amino acid compositional data. **Nutr. Rep. Int.**, v.21, p.25-38, 1980.

JOHN, L., CORNFORTH, D., CARPENTER, C.E., SORHEIM, O., PETTEE, B.C., WHITTIER, D.R. Color and thiobarbituric acid values of cooked top

sirloin steaks packaged in modified atmospheres of 80% oxygen, or 0.4% carbon monoxide, or vacuum. **Meat Science**, v.69, p.441-449, 2005.

KAPSOKEFALOU, M., MILLER, D.D. Effects of meat and selected food components on the valence of nonheme iron during *in vitro* digestion. **Journal of Food Science**, v.56, n.2, p.352-355, 1991.

KAPSOKEFALOU, M., MILLER, D.D. Iron speciation in intestinal contents of rats fed meals composed of meat and nonmeat sources of protein and fat. **Food Chemistry**, v.52, p.47-56, 1995.

KAPSOKEFALOU, M., MILLER, D.D. Lean beef and beef fat interact to enhance nonheme iron absorption in rats. **J. Nutr.**, v.123, n.3, p.1429-1434, 1993.

KARMAS, E. Fresh meat technology. **Food Technology Review**, n.23, p.129-135, 1975.

KIM, M., ATALLAH, M. Structure of dietary pectin, iron bioavailability and hemoglobin repletion in anemic rats. **J. Nutr.**, v.122, p.2298-2305, 1992.

KIMMEL, E.C., CARPENTER, R.L., REBOULET, J.E., STILL, K.R. A physiological model for predicting carboxyhemoglobin formation from exposure to carbon monoxide in rats. **J. Appl. Physiol.**, v.86, n.6, p.1977-1983, 1999.

KNIFE, C.L. Production and use of animal blood and blood protein for human food. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (Eds.). **Advances in meat research**. New York: Elsevier Applied Science, 1988. v.5, p.147-163.

KOCOVSKI, T., MATEKALO, S.V., PETROVIC, L., MRDANOV, J., STARCEVIC, G. Possibilities of blood and hemoglobin use in production of dietetic and products enriched with iron. **Technologija Mesa**, v.35, n.3, p.95-100, 1994.

KRAUSE, T.R., SEBRANEK, J.G., RUST, R.E., HONEYMAN, M.S. Use of carbon monoxide packaging for improving the shelf life of pork. **Journal of Food Science**, v.68, p.2596-2603, 2003.

KRISTENSEN, L., PURSLOW, P.P. The effect of processing temperature and addition of mono- and di-valent salts on the heme- nonheme-iron ratio in meat. **Food Chemistry**, v.73, p.433-439, 2001.

KRISTINSSON, H.G., MONY, S., DEMIR, N., BALABAN, M.O., OTWELL, S. The effect of carbon monoxide and filtered smoke on the properties of aquatic muscle and selected muscle components. In: **Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference**, 1, 2003, Reykjavik-Iceland. p.27-29.

L'HIRONDEL, J., L'HIRONDEL, J.-L. **Nitrate and man: toxic, harmless or beneficial**. New York: CABI Publishing, 2001.

LANDMANN, W.A., DILL, C.W., YOUNG, C.R. Nutritive value of globin-amino acid and complementary globin-cereal mixtures. **Journal of Nutrition**, v.110, p.2254-2262, 1980.

LANIER, T.C., CARPENTER, J.A., TOLEDO, R.T., REAGAN, J.O. Metmyoglobin reduction in beef systems as affected by aerobic, anaerobic and carbon monoxide-containing environments. **Journal of Food Science**, v.43, n.6, p.1788-1796, 1978.

LATUNDE-DADA, G.O., NEALE, R.J. Review: availability of iron from foods. **Journal of Food Technology**, v.21, p.255-268, 1986.

LAWRIE, R. **Developments in meat science - 2**. Applied Science Publishers, 1981. 299p.

LAYRISSE, M., GARCÍA-CASAL, M.N. Strategies for the prevention of iron deficiency through foods in the household. **Nutrition Reviews**, v.55, p.233-239, 1997.

LEDWARD, D.A. Scanning calorimetric studies of some protein-protein interactions involving myoglobin. **Meat Science**, v.2, p.241-249, 1978.

LEHNINGER, A.L. **Principles of biochemistry**. New York: Worth, 1982. 725p.

LIMA, A.O., SOARES, J.B., GRECO, J.B., GALIZZAI, J., CANÇADO, J.R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretações**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.699. 1985.

LIVINGSTON, D.J., BROWN, W.D. The chemistry of myoglobin and its reactions. **Food Technology**, p.244-252, 1981.

LONNERDAL, B, SANDBERG, A.S., KUNZ, C. Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rate. **Journal of Nutrition**, v.119, n.2, p.211-214, 1980.

LOOKER, A.C., DALLMAN, P.R., CARROLL, M.D., GUNTER, E.W., JOHNSON, C.L. Prevalence of iron deficiency in the United States. **Jama**, v.277, n.12, p.973-976, 1997.

LOVE, J.D. Mechanism of iron catalysis of lipid oxidation in warmed-over flavor of meat. In: ANGELO, A. J. S., BAILEY, M. E. (Eds). **Warmed-over flavor of meat**. New York: Academic Press, 1987. p.19-40.

LUÑO, M., RONCALÉS, P., DJENANE, D., BELTRÁN, J.A. Beef shelf life in low O₂ and high CO₂ atmospheres containing different low CO concentrations. **Meat Science**, v.55, p.413-419, 2000.

LYNCH, S.R. Interaction of iron with other nutrients. **Nutrition Reviews**, v.55, n.4, p.102-110, 1997.

LYNCH, S.R. The effect of calcium on iron absorption. **Nutrition Research Reviews**, v.13, p.141-158, 2000.

MAcNURLAN, M.A., GARLICK, P.J. Proteins synthesis and degradation. In: STIPANUK, M.H. (Ed.). **Biochemical and physiological aspects of human nutrition**. [S. l.]: W.B. Saunders Company, 2000. p.212.

MAHAN, L.K., ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9.ed. São Paulo: Roca, 1998. 1179p.

MAHONEY, A.W., HENDRICKS, D.G., GILLET, T.A., BUCK, D.R., MILLER, C.G. Effect of sodium nitrite on the bioavailability of meat iron for the anemic rat. **J. Nutr.**, v.109, p.2182-2189, 1979.

MAHONEY, A.W., Van ORDEN, C.C., HENDRICKS, D.G. Efficiency of converting food iron into hemoglobin by anemic rat. **Nutr. Metabol.**, v.17, p.223-230, 1974.

MARQUEZ, E., BARBOZA, Y., IZQUIERDO, P., TORRES, G. Studies on the incorporation of bovine plasma in emulsion type of meat product. **Journal of Food Science and Technology**, v.34, n.4, p.337-339, 1997.

MARSHALL, M.D., KALES, S.N., CHRISTIANI, D.C., GOLDMAN, R.H.. Are reference intervals for Carboxyhemoglobin appropriate? A survey of Boston area laboratories. **Clin. Chem.**, v.41, p.1434-1438, 1995.

MARTÍNEZ, C., ROS, G., PERIAGO, M.J., LÓPEZ, G. Biodisponibilidad del hierro de los alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.49, n.2, p.106-113, 1999.

MARTÍNEZ-NAVARRETE, N., CAMACHOA, M.M., MARTÍNEZ-LAHUERTAB, J., MARTÍNEZ-MONZÓ, J., FITO, P. Iron deficiency and iron fortified foods - a review. **Food Research International**, v.35, p.225-231, 2002.

MARTÍNEZ-TORRES, C., LAYRISSE, M. Iron absorption from veal muscle. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.24, p.521-540, 1971.

MATSUMOTO, J., MORI, N., DOI, M., KISHIDA, T., EBIHARA, K. Evaluation of iron bioavailability from bonito dark muscle using anemic rats. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.4478-4482, 2003.

MELBY Jr., E.C., ALTMAN, N.H. **Handbook of laboratory animal science**. Cleveland: CRC Press, 1977. v.3, 943p.

MIELNIK, J., SLINDE, E. Sausage color measured by integrating sphere reflectance spectrophotometry when whole blood or blood cured by nitrite is added to sausages. **Journal of Food Science**, v.48, n.5, p.1723-1725, 1983.

MILLER, D.D. Minerals. In: FENNEMA, O.R. (Ed.). **Food chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p.617-649.

MILLER, J. Assessment of dietary iron availability by rat hemoglobin repletion assay. **Nutr. Rep. Int.**, v.26, p.993-1005, 1982.

MITEVA, E., GADZHEVA, D., NESTOROV, N., GAKEV, A. Objective assesment of colour stability in sausages manufactured with powdered blood pigment. **Food Science and Technology Abstracts.**, v.18, n.8, p.168, 1986.

MITRUKA, M.B., RAWNSLEY, H.M. **Clinical, biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans**. 2.ed. New York: Masson Publishing, 1981. 314p.

MONTEIRO, C.A., SZARFARC, S.C., MONDINI, L. Tendência secular da anemia na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Revista de Saúde Pública**, v.34, n.6 supl., p.62-72, 2000.

MORCK, T.A., LYNCH, S.R., COOK, J.D. Inhibition of food iron absorption by coffee. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.37, p.416-420, 1983.

MORRIS, E.R.; ELLIS, R. Isolation of monoferric phytate from wheat bran and its biological value as an iron source to the rat. **Journal of Nutrition**, v.106, p.753-760, 1976.

MOURE, F., RENDUELES, M., DÍAZ, M. Aprovechamiento del plasma procedente de sangre de mataderos. **Alimentaria**, n.290, p.41-50, 1998.

MULVIHILL, B., KIRWAN, F.M., MORRISEY, P.A., FLYNN, A. Effect of myofibrillar muscle proteins on the *in vitro* bioavailability of non-haem iron. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v.49, p.187-192, 1998.

MULVIHILL, B., MORRISEY, P.A. An investigation of factors influencing the bioavailability of non-haem iron from meat systems. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v.37, p.219-226, 1998a.

MULVIHILL, B., MORRISEY, P.A. Influence of the sulphhydryl content of animal proteins on *in vitro* bioavailability of non-haem iron. **Food Chemistry**, v.61, n.1, p.1-7, 1998b.

MUSCLE pigment-mioglobin, bood pigment-haemoglobin. **Fleischwirtsch**, Frankfurt, v.66, n.3, p.355-358, 1986.

NAKAMURA, R., HAYAKAWA, S., YASUDA, K., SATO, Y. Emulsifying properties of bovine blood globin: a comparison with some proteins and their improvement. **Journal of Food Science**, v.49, n.1, p.102-104, 1984.

NAS. **Carbon Monoxide**. Washington: Division of Medical Sciences Asembly of Life Sciences National Research Council, 1977. 239p.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Evaluation of protein quality**. Washington DC. 1963. 74p.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES-NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NAS-NCR. **Evaluation of protein quality**. Washington, D.C., 1963. 74p.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES-NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NAS-NCR. **Nutrient requeriment of domestic animals**. 3.ed. Washington, D.C., 1978. 117p.

NEELAKANTAN, S. Preparation and nutritive value of serum and whole blood protein meals from slaughter house blood. **J. food. Sci. Technol.**, v.12, p.289-291, 1975.

NELSON, D., MORRIS, M. Exame básico do sangue. In: HENRY, J.B.(Ed.). **Diagnósticos clínicos & tratamento. Por métodos laboratoriais**. 1.ed. São Paulo: Editora Manole, 1995. p.641-699.

NOGUEIRA, N.N., COLLI, C., COZZOLINO, S.M.E. Controle da anemia ferropriva em pré-escolares por meio da fortificação de alimento concentrado de hemoglobina bovina (estudo preliminar). **Cadernos de Saúde Pública**, v.8, p.459-465, 1992.

OCKERMAN, H.W., HANSEN, C.L. **Industrialización de subproductos de origem animal**. Zaragoza: Acribia, 1994. 387p.

OELLINGRATH, I.M., SLINDE, E. Color, pigment and iron content of meat loaves with blood, blood emulsion, or mechanically deboned meat added. **Journal of Food Science**, v.50, n.6, p.1551-1555, 1985.

OLOGUNDE, M.O., MORRIS, J.B., SHEPARD, R.L. et al. Bioavailability to rats of iron from fortified grain amaranth. **Plant Foods Humn nutrition**, v.45, p.191-201, 1994.

OMS – ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. **Monóxido de carbono**. México, 1980. (Cráterios de Salud Ambiental, n.13).

ORTEGA, R.M., LÓPEZ-SOBALER, A.M., REQUEJO, A.M., QUINTAS, M.E., GASPAR, M.J., ANDRÉS, P., NAVIA, B. The influence of meat consumption on dietary data, iron status and serum lipid parameters in young women. **Internat. J. Vit. Nutr. Res.**, v.68, p.255-262, 1998.

ORTEN J.M., NEWHAUS, O.W. **Human biochemistry**. [S.l.]: 1975. p.770-791.

PARK, Y.W., MAHONEY, A.W., CORNFORTH, D.P., COLLINGE, S.K., HENDRICKS, D.G. Bioavailability to anemic rats of iron from fresh cooked or nitrosylated hemoglobin and myoglobin. **Journal of Nutrition**, v.113, p.680-687, 1983.

PARK, Y.W., MAHONEY, A.W., CORNFORTH, D.P., COLLINGE, S.K., HENDRICKS, D.G. Bioavailability to anemic rats of iron from fresh cooked or nitrosylated hemoglobin and myoglobin. **J. Nutr.**, v.113, p.680-687, 1983.

PELLETT, P.L., YOUNG, V.R. Background paper 4: evaluation of the use of amino acid composition data in assessing the protein quality of meat and poultry products. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.40, n.9, p.718-736, 1984.

PELLETT, P.L., YOUNG, V.R. **Nutritional evaluation of protein foods**. Tokyo: United Nations University Press, 1980. 162p.

PEREIRA, A.D. **Efeito da adição de sangue tratado com monóxido de carbono sobre as características químicas e de cor de mortadela**. Viçosa, MG: UFV, 2000, 98p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.

PISKE, D. Aproveitamento de sangue de abate para alimentação humana. **Boletim do Ital**, v.19, n.3, p.253-308, 1982.

PIZARRO, F., OLIVARES, M., HERTRAMPF, E., MAZARIEGOS, D.I., ARREDONDO, M. Heme-iron absorptions is saturable by heme-iron dose in women. **J. Nutr.**, v.133, p.2214-2217, 2003.

POWELL J.J, WHITEHEAD M.W, LEE S, THOMPSON R.P.H. Mechanisms of gastrointestinal absorption: Dietary minerals and the influence of beverage ingestion. **Food Chemistry**, v.51, p.381-388, 1994.

PRICE, J.F., SCHWEIGERT, B. **Ciencia de la carne y de los productos cárnicos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1994. 581p.

PURCHAS, R.W., RUTHERFURD, S.M., PEARCE, P.D., VATHER R., WILKINSON, B.H.P. Cooking temperature effects on the forms of iron and levels of several other compounds in beef semitendinosus muscle. **Meat Science**, v.68, p.201-207, 2004.

PURCHAS, R.W., SIMCOCK, D.C., KNIGHT, T.W., WILKINSON, B.H.P. Variation in the form of iron in beef and lamb meat and losses of iron during cooking and storage. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.38, p.827-837, 2003.

RADMILI, M., BARAS, J., MATEKALO, S.V., RADISIC, D. Assessment of possibilities of powdered hemoglobin use in formed meat products. **Technologija Mesa**, v.36, n.5, p.313-316, 1995.

RAEKER, M.O., JOHNSON, L.A. Thermal and functional properties of bovine blood plasma and egg white proteins. **Journal of Food Science**, v.60, n.4, p.685-706, 1995.

RAFFIN, S.B., WOO, C. H., ROOST, K.T., PRICE, D.C., SCHMID, R. Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase. **J. Clin. Invest.**, v.54, n.6, p.1344-1352, Dec. 1974.

RANGARAJAN, A., CHENOWETH, W.A., KELLY, J.F., AGEE, K.M. Iron bioavailability from *Amaranthus* species: 2 – Evaluation using haemoglobin repletion in anaemic rats. **J. Sci. Food Agric.**, v.78, p.274-280, 1998.

RANGER, C.R., NEALE, R.J. Iron availability from soy, meat and soy/meat samples in anemic rats with and without prevention of coprophagy. **J. Food Sci.**, v.49, p.585-589, 1984.

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

REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.

REINHOLD, J.G., GARCIA, L.J.S., GARZON, P. Binding of fiber of wheat and maize. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.34, p.1384-1391, 1981.

RITSKES-HOITINGA, M., CHWALIBOG, A. Nutrient Requirements, experimental design, and feeding schedules in animal experimentation. In: HAU,

J., Van HOOSIER, G.L. (Eds.). **Handbook of Laboratory Animal Science**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2003. v.1, p.1-30.

ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S., KUMAR, V. **Pathologic basis of disease**. 5.ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1995. 1400p.

ROBERTS, S.K., HENDERSON, R.W., YOUNG, G.P. Modulation of uptake of heme by rat small intestinal mucosa in iron deficiency. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.28, p.G712-G718, 1993.

ROGERS, A.D. Nutrition. In: BAKER, H.J., LINDSAY, J.R., WEISBROTH, S.H. (Eds.). **The laboratory rat**. New York: Academic Press, 1979. v.1. p.124-152.

ROGOV, J.A., KOVALEV, Y.I., TOKAEV, E.S. Iron absorption from meat and meat products: part I - theoretical foundations for estimating available iron. **Meat Science**, v.25, p.221-226, 1989.

ROSSANDER-HULTEN, L., BRUNE, M., SANDSTROM, B., LONNERDAL, B., HALLBERG, L. Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.54, p.152-156, 1991.

ROTRUCK, J.T. LUHRSEN, KR. A comparative study in rats of iron bioavailability from cooked beef and soybean protein. **J. Agric. Food Chem.**, v.27, n.1, p.27-33, 1979.

RUST, R.E. Formulated meat products using edible meat by-products. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (Eds.). **Advances in meat research**. New York: Elsevier Applied Science, 1988. v.5. p.341-356.

SAMMÁN, N., FARÍAS, R.N. A 28-h method for estimating protein nutritional quality. **J. Agric. Food Chem.**, v.41, n.1, p.52-56, 1993.

SANT'ANA, L.F.R. **Multimistura alimentar: biodisponibilidade de cálcio, zinco e ferro e seu efeito no estado nutricional relativo ao ferro em pré-escolares**. Viçosa, MG: UFV, 2002, 98p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2002.

SANTOS, V., BIANCHI, M., LATUNDE-DADA., DANFLUZZI, J. Bioavailability of iron from have prepared weaning foods. **Nutr. Res.**, v.16, n.9, p.1601-1605, 1996.

SARWAR, G., PEACE, R.W., BOTTING, H.G., BRULE, D. Digestibility of protein and amino acids in selected foods as determined by a rat balance method. **Plant Foods Human Nutrition**, v.1, p.23-32, 1989.

- SAS. USER'S GUIDE: **basic and statistic**. Cary: 1995. 1686p.
- SATTERLEE, L.D. Improving utilization of animal by-products for human foods- a review. **Journal of Animal Science**, v.41, n.2, p.687-697, 1975.
- SCHAAFSMA, G. The protein digestibility-corrected amino acid score. **J. nutr.**, v.130, p.1865S-1867S, 2000.
- SCHRICKER, B.R., MILLER, D.D. Effects of cooking and chemical treatment on heme and nonheme iron in meat. **J. Food Sci.**, v.48, p.1340-1343, 1983.
- SCHRICKER, B.R., MILLER, D.D., STAUFFER, J.R. Measurement and content of nonheme and total iron in muscle. **J. Food Sci.**, v.47, p.740- , 1982.
- SELIGMAN, P.A., MOORE, G.M., SCHLEICHER, R.B. Clinical studies of HIP: an oral heme-iron product. **Nutrition Research**, v.20, n.9, p.1279-1286, 2000.
- SGARBIERI, V.C. **Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento**. 1. ed. São Paulo: Almed, 1987. 387 p.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**. São Paulo: Varela, 1996. 517p.
- SHAHIDI, F., NACZK, M., RUBIN, L.J., DIOSADY, L.L. Functional properties of blood globin. **Journal of Food Science**, v.49, n.2, p.370-372, 1984.
- SHARP, P.E., La REGINA, M.C. **The laboratory rat**. Boca Raton: CRC Press, p.1-19. 1998.
- SILVA, L.S.M, GIUGLIAN, 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, 2001.
- SIMMONS, W.K., COOK, J.D., BINGHAM, K.C., THOMAS, M., JACKSON, J., JACKSON, M., AHLUWALIA, N., KAHN, S.G., PATTERSON, A.W. Evaluation of a gastric delivery system for iron supplementation in pregnancy. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.58, n.5, p.622-626, 1993.
- SIMÕES, M.C.C., MOURA, E.C., SGARBIERI, V.C., FIGUEIREDO, D.B. Avaliação do impacto de um suplemento nutricional rico em ferro hemático. **Cad. Saúde Pública**, v.15, n.4, p.871-881, 1999.
- SINGH, K., FONG, Y.F., ARULKUMARAN, S. Anaemia in pregnancy - a cross-sectional study in Singapore. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.52, p.65-70, 1998.

SIQUEIRA, M.E.P.B., MARTINS, I., COSTA, A.C., ANDRADE, E.L. Valores de referência para carboxiemoglobina. **Rev. de Saúde Pública**, v.31, n.6, p.618-623, 1997.

SLINDE, E., MARTENS, M. Changes in sensory properties of sausages when small amounts of blood replace meat. **Journal of Science of Food and Agricultural**, v.33, p.760-762, 1982.

SMITH, C., MITCHINSON, M.J., ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. **Biochem. J.**, v.286, n.pt3, p.901-905, 1992.

SØRHEIM, O., AUNE, T., NESBAKKEN, T. Technological, hygienic and toxicological aspects of carbon monoxide used in modified-atmosphere packaging of meat. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.307-312, 1997.

SØRHEIM, O., NISSEN, H., AUNE, T., NESBAKKEN, T. Use of carbon monoxide in retail meat packaging. In: **Proceedings of the Reciprocal Meat Conference**, 54, 2001. p.47-51.

SØRHEIM, O., NISSEN, H., NESBAKKEN, T. The storage life of beef and pork packaged in an atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide. **Meat Science**, v.52, p.157-164, 1999.

SOUTH, P.K., LEI, X., MILLER, D.D. Meat enhances nonheme iron absorption in pigs. **Nutrition Research**, v.20, n.12, p.1749-1759, 2000.

SOUZA, M. Economicamente melhor para o sistema carne. **Revista Nacional da Carne**, p.16, 1992.

STEKEL, A., AMAR, R.M., PIZARRO, F., CALVO, E., CHADUD, P., HERTRAMPF, E., LLAGUNO, S., OLIVARES, M. Nutritional significance of interactions between iron and food components. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.33, p.33-41, 1983.

STIEBING, A. Blood sausage technology. **Fleischwirtsch International**, v.3, p.34-40, 1990.

STOLTZFUS, R.J., DREYFUSS, M.L. Guidelines for the use of iron supplements to prevent and treat iron deficiency anemia. International Nutritional Anemia Consultative Group (INACG)/WHO/UNICEF. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, 1998.

STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1000p.

SZARFACS, S.C., DE SOUZA, S.B. Prevalência e fatores de risco na deficiência de ferro e anemia. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.47, n.2, p.35-38, 1997.

TACKMAN, J.M., TEWS, J.K., HARPER, A.E. Dietary disproportions of amino acids in the rat: effects on food intake, plasma and brain amino acids and brain serotonin. **Journal of Nutrition**, v.120, p.521-533, 1990.

TAKANO, T., MIYAZAKI, U.Y., SHIMOYAMA, H., MAEDA, H., OKEDA, R., FUNATA, N. Direct effects of carbon monoxide on cardiac function. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v.49, n.1, p.35-40, 1981.

TAYLOR, P.G., MARTÍNEZ-TORRES, C., ROMANO, E.L., LAYRISSE, M. The effect of cysteine-containing peptides released during meat digestion on iron adsorption in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.43, p.68-71, 1986.

THANNOUN, A.M., MAHONEY, A.W., BUCHOWSKI, M.S., HENDRICKS, D. Heme and nonheme iron absorption from meat and meat loaf by anemic and healthy rats. **Nutrition Reports International**, v.37, n.3, p.487-497, 1988.

THOM, S.R., KEIM, L.W. Carbon monoxide poisoning: a review epidemiology, pathophysiology, clinical findings, and treatment options including hyperbaric oxygen therapy. **Clin. Toxicol.**, v.27, n.3, p.141-156, 1989.

TORRES, M.C.L., VALENTE, G.F.S., COSTA, N.M.B., PEREIRA, A.D., GOMIDE, L.A.M. **Avaliação do efeito da adição de sangue suíno na qualidade protéica da mortadela**. Campinas, 1999. (Resumo do III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 16 a 19 novembro).

TORRES, M.R., RAMOS, A.J., SORIANO, E. Aspectos funcionales y nutricionales de las proteínas sanguíneas: empleo en la industria cárnica. **Alimentaria**, n.282, p.63-69, 1997.

TSENG, M., CHAKRABORTY, H., ROBINSON, D.T., MENDEZ, M., KOHLMEIER, L. Adjustment of iron intake for dietary enhancers and inhibitors in population studies: bioavailable iron in rural and urban residing Russian women and children. **The Journal of Nutrition**, v.127, n.8, p.1456-1462, 1997.

TYBOR, P.T., DILL, C.W., LANDMANN, W.A. Effect of decolorization and lactose incorporation on the emulsification capacity of spray-dried blood protein concentrates. **Journal of Food Science**, v.38, p.4-6, 1973.

TYBOR, P.T., DILL, C.W., LANDMANN, W.A. Functional properties of proteins isolated from bovine blood by a continuous pilot process. **Journal of Food Science**, v.40, p.155-159, 1975.

UZEL, C., CONRAD, M.E. Absorption of heme iron. **Semin. Hematol.**, v.35, n.1, p.27-34, 1998.

VIANA, E.S., GOMIDE, L.A.M., VANETTI, M.C.D. Effect of modified atmospheres on microbiological, color and sensory properties of refrigerated pork. **Meat Science**, v.71, p.696-705, 2005.

VICKERY, J.R. The recovery and utilization of edible proteins from blood and trash fish. **Food Technology in Australia**, v.20, n.7, p.315-319, 1968.

VITAKON, P. Oxalate in vegetable amaranth (*Amaranthus gangeticus*) forms, contents and their possible implications for human health. **Journal Science Agricultural**, v.48, p.469-474, 1986.

WALKER, A.R. The remedying of iron deficiency: What priority should it have? **British Journal of nutrition**, v.79, p.227-235, 1998.

WANG, F.S., LIN, C.W. The effects of heating and chemical treatment on the haem and non-heme iron content of heat-induced porcine blood curd. **Journal of Science of Food and Agricultural**, v.65, n.2, p.209-213, 1994.

WEISSBLUTH, M. Hemoglobin: cooperativity and electronic properties. In: KLEINZELLER, A., SPRINGER, G.F., WITTMANN, H.G. (Eds.). **Molecular biology biochemistry and biophysics**. New York: Springer-Verlag, 1974. v.15. 175p.

WHITE MARTINS. **Folha de dados de segurança de produto**. [s.l.]: 1989. 4p.

WHITE, P. Degradação da hemoglobina. In: WILLIAMS, W.J., BEUTLER, E., ERSLEV, A.J., RUNDLES, R.W. (Eds.) **Hematologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. p.156-161.

WHO/UNU/UNICEF. **Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control; a guide for programme managers**, 2001. Disponível em: [<http://www.micronutrient.org/idpas/pdf/731|DAAssessment.pdf>]. Acesso em: 14/03/2005.

WIENK, K., MARX, J., BEYNEN, A. The concept of iron bioavailability and its assessment. **Eur. J. Nutr.**, v.38, p.51-75, 1999.

WILLIAMS, S.R. **Fundamentos de nutrição e dietoterapia**. 6.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

WISMER-PEDERSEN, J. Use a hemoglobin in foods - A review. **Meat Science**, v.24, n.1, p.31-45, 1988.

WISMER-PEDERSEN, J. Utilization of animal blood in meat products. **Food Technology**, v.38, n.8, p.76-80, 1979.

WOLFE, S.K. Use of CO- and CO₂- enriched atmospheres for meats, fish, and produce. **Food Technology**, v.34, n.3, p.55-58, 1980.

WOLFORD, S.T, SCHROER, R.A, GOHS, F.X, GALLO, P.P, BRODECK, M., FALK, H.B., et al. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. **J. Toxicol. Environm. Health**, v.18, p.161-188, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Nutrition progame (nut), malnutrition worldwide - Iron deficiency anaemia**, 1998. p.7-8. Disponível em: [<http://www.who.int/nut/malnutrition>]. Acesso em: 11/02/2004.

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

YANG, J.H., LIN, C.W. Effects of various viscosity enhancers and pH on separating haem from porcine red blood cells. **Journal of Science of Food and Agricultural**, v.70, n.3, p.364-368, 1996.

YBARRA, L.M., COSTA, N.M.B., FERREIRA, C.L.L.F.. Interação cálcio e ferro. **Nutrire: Revista Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v.22, p.85-107, 2001.

YIP, R. The challenge of improving iron nutrition: limitations and potentials of major intervention approaches. **The European Journal of Clinical Nutrition**, v.51, p.16-24, 1997.

YOUNG, C.R., LEWIS, W., LANDMANN, W.A., DILL, C.W. Nutritive value of globin and plasma protein fractions from bovine blood. **Nutrition Reports International**, v.8, n.4, p.211-217, 1973.

ZBINDEN, G. Predictive value of animal studies in toxicology. **Regulat. Toxicol. Pharmacol.**, v.14, p.167-177, 1991.

ZHANG, D., HENDRICKS, D.G., MAHONEY, A.W. Bioavailability of total iron from meat, spinach (*Spinacea oleracea* L.) and meat-spinach mixtures by anemic and non-anaemic rats. **Br. J. Nutr.**, v.61, p.331-343, 1989.

ZHANG, D., HENDRICKS, D.G., MAHONEY, A.W., YU, Y., THANNOUN, A.M., SISSON, D.V. Bioavailability of total dietary iron from beef and soy protein isolate, alone or combined, in anemic and healthy rats. **Cereal Chemistry**, v.68, n.2, p.194-200, 1991.

ZIJP, I.M., KORVER ,O., TIJBURG, L.B.M. Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.40, n.5, p.371-398, 2000.

APÊNDICE

APÊNDICE

Tabela 1A - Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais da composição centesimal das mortadelas adicionadas de diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono

Fonte de Variação	G.L	Quadrado Médio				
		Proteína	Umidade	Lipídio	Cinzas	Carboidratos
Regressão linear	1	1,3341 ^{n.s}	5,3161*	0,02494 ^{n.s}	0,008511 ^{n.s}	1,1772 ^{n.s}
Regressão quadrática	1	0,4336 ^{n.s}	0,1697*	0,04413 ^{n.s}	0,02755*	2,0924*
Regressão cúbica	1	0,2360 ^{n.s}	0,01128 ^{n.s}	0,09213 ^{n.s}	0,001448 ^{n.s}	0,001445 ^{n.s}
Regressão 4º grau	1	0,08309 ^{n.s}	0,01790 ^{n.s}	0,01073 ^{n.s}	0,01533 ^{n.s}	0,1956 ^{n.s}
(Níveis de sangue)	(4)	0,5217 ^{n.s}	1,3793*	0,04298 ^{n.s}	0,01320*	0,8666 ^{n.s}
Resíduo	10	0,4288	0,009940	0,06900	0,003728	0,3924

* significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2A - Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais do teor de ferro das mortadelas adicionadas de diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono

Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Médio
Regressão linear	1	4955,9880*
Regressão quadrática	1	13,3172 ^{n.s}
Regressão cúbica	1	29,4426*
Regressão 4º grau	1	274,1029*
(Níveis de sangue)	(4)	1318,2127*
Resíduo	10	4,6087

* significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3A - Resumo da análise de variância das variáveis ganho de peso, consumo alimentar, proteína consumida e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais alimentados com dietas contendo caseína e mortadelas com sangue tratado com monóxido de carbono durante o ensaio de qualidade protéica

F. V.	G.L.	Quadrado Médio			
		Ganho de peso	Consumo alimentar	Proteína consumida	CEA
Rato	5	29,1611	184,2115	1,7135	0,0005244
Dieta	5	61,2278 ^{n.s}	314,7071 ^{n.s}	2,7100 ^{n.s}	0,0005911*
Resíduo	25	30,4944	168,5361	1,5703	0,0002164

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4A - Resumo da análise de variância do PER, NPR, digestibilidade (DIG), PERR, NPRR e digestibilidade relativa (DIGR) das dietas de caseína e de mortadelas com sangue tratado com monóxido de carbono

F. V.	G.L.	Quadrado Médio					
		PER	NPR	DIG	PERR	NPRR	DIGR
Rato	5	0,05695	0,07477	1,0885	15,1494	15,6052	0,9792
Dieta	5	0,09864*	0,1938*	14,9426*	60,7197*	50,8075*	16,9240*
Resíduo	25	0,02497	0,02482	0,9062	12,8364	12,0457	1,01647

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 5A - Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais do ganho de peso, consumo alimentar, proteína consumida e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais alimentados com dietas contendo mortadelas com sangue tratado com monóxido de carbono durante o ensaio de qualidade protéica

Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Médio			
		Ganho de peso	Consumo alimentar	Proteína consumida	CEA
Regressão linear	1	2,8167 ^{n.s}	263,3415 ^{n.s}	6,2509 ^{n.s}	0,000449 ^{n.s}
Regressão quadrática	1	44,2976 ^{n.s}	97,4168 ^{n.s}	3,8179 ^{n.s}	0,000172 ^{n.s}
Regressão cúbica	1	147,2667*	70,3084 ^{n.s}	0,9659 ^{n.s}	0,001956*
Regressão 4º grau	1	111,0857 ^{n.s}	1090,067*	1,8113 ^{n.s}	0,000108 ^{n.s}
Ratos	5	34,4000	253,4701	2,3527	0,0002788
Níveis de sangue	(4)	76,3667 ^{n.s}	380,2834 ^{n.s}	3,2119 ^{n.s}	0,0006698 ^{n.s}
Resíduo	20	29,1667	182,6241	1,7018	0,0002338

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 6A - Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais do PER, NPR, digestibilidade (DIG), PERR, NPRR e digestibilidade relativa (DIGR) das mortadelas com sangue tratado com monóxido de carbono

F. V.	G.L.	Quadrado Médio					
		PER	NPR	DIG	PERR	NPRR	DIGR
Regressão linear	1	0,1858*	0,3973*	5,4604*	113,3039*	122,4981*	6,1810*
Regressão quadrática	1	0,007763 ^{n.s}	0,002848 ^{n.s}	2,8015 ^{n.s}	4,7328 ^{n.s}	10,9190 ^{n.s}	3,1712 ^{n.s}
Regressão cúbica	1	0,1806*	0,3946*	1,9067 ^{n.s}	110,0815*	71,8216*	2,1584 ^{n.s}
Regressão grau	4°	0,07644 ^{n.s}	0,1648*	5,7032*	46,6030 ^{n.s}	24,1993 ^{n.s}	6,4559*
Rato	5	0,02977	0,04334	1,0359	18,1685	18,7300	1,1730
Níveis de sangue	(4)	0,1127*	0,2402*	3,9675*	68,6795*	57,3611*	4,4918*
Resíduo	20	0,02507	0,02633	1,0777	15,2910	14,2777	1,2195

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 7A - Resumo da análise de variância das variáveis ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais alimentados com dietas contendo caseína e mortadelas com sangue tratado com monóxido de carbono após 28 dias de ensaio

F. V.	G.L.	Quadrado Médio		
		Ganho de peso	Consumo alimentar	CEA
Rato	5	13,6944	131,5101	0,0001269
Dieta	5	315,2944*	1553,0742 ^{n.s}	0,001253*
Resíduo	25	110,1344	624,6298	0,0001822

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 8A - Resumo da análise de variância das variáveis Colesterol, glicose, triacilglicerol, AST, ALT, Albumina, bilirrubina, creatinina e hemoglobina de ratos submetidos a dietas de caseína e de mortadelas com diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono após 28 dias de ensaio

F. V.	G.L.	Quadrado Médio								
		Colesterol	Glicose	Triacilglicerol	AST	ALT	Albumina	Bilirrubina	Creatinina	Hemoglobina
Rato	5	0,3955	752,4944	852,7333	9,9383	29,4277	0,01039	0,003611	0,003611	0,1600
Dieta	5	589,9778*	579,5611 ^{n.s}	1968,4667 ^{n.s}	53,3055*	24,7812 ^{n.s}	0,07817 ^{n.s}	0,006278 ^{n.s}	0,01228*	0,5724 ^{n.s}
Resíduo	10	150,2178	252,9611	1045,3200	11,1774	17,0371	0,07051	0,004278	0,004144	0,6370

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 9A - Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais das variáveis colesterol, glicose, triacilglicerol, AST, ALT, albumina, bilirrubina, creatinina e hemoglobina de ratos submetidos a dietas de mortadelas com diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono após 28 dias de ensaio

Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Médio								
		Colesterol	Glicose	Triacilglicerol	AST	ALT	Albumina	Bilirrubina	Creatinina	Hemoglobina
Regressão linear	1	84,0167 ^{n.s}	16,0167 ^{n.s}	38,4000 ^{ns}	13,9394 ^{n.s}	1,5488 ^{n.s}	0,0742 ^{n.s}	0,0082 ^{n.s}	0,0000 ^{n.s}	0,0282 ^{n.s}
Regressão quadrática	1	204,2976 ^{n.s}	90,1071 ^{n.s}	2952,4286 ^{n.s}	89,6107*	9,9567 ^{n.s}	0,0009 ^{n.s}	0,0011 ^{n.s}	0,0476*	0,5668 ^{n.s}
Regressão cúbica	1	24,0667 ^{n.s}	1530,1500*	11,2700 ^{n.s}	18,9700 ^{n.s}	75,8900*	0,0252 ^{n.s}	0,0135 ^{n.s}	0,0042 ^{n.s}	0,4002 ^{n.s}
Regressão 4º grau	1	969,1524*	888,8595*	2400,0381 ^{n.s}	19,9688 ^{n.s}	31,8616 ^{n.s}	0,0978 ^{n.s}	0,0019 ^{n.s}	0,0029 ^{n.s}	0,1069 ^{n.s}
(Níveis de sangue)	(4)	320,3833 ^{n.s}	631,2833*	1350,5333 ^{n.s}	35,6230*	29,8149 ^{n.s}	0,04953 ^{n.s}	0,006167 ^{n.s}	0,01367 ^{n.s}	0,2755 ^{n.s}
Rato	5	182,4533	525,8400	902,0533	8,2088	21,2189	0,02774	0,004333	0,003200	0,3344
Resíduo	20	165,3033	175,3233	1113,0533	10,5320	15,4108	0,06653	0,005167	0,004867	0,5909

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 10A - Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais das variáveis ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) de ratos submetidos a dietas de mortadelas com diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono após 28 dias de ensaio

Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Médio		
		Ganho de peso	Consumo alimentar	CEA
Regressão linear	1	516,2667*	2814,6750*	0,000226 ^{n.s}
Regressão quadrática	1	144,0476 ^{n.s}	164,1643 ^{n.s}	0,000316 ^{n.s}
Regressão cúbica	1	8,8167 ^{n.s}	337,2510 ^{n.s}	0,000384 ^{n.s}
Regressão 4º grau	1	167,2024 ^{n.s}	4258,4727*	0,000281 ^{n.s}
(Níveis de sangue)	(4)	209,0833 ^{n.s}	1893,6383*	0,0003023 ^{n.s}
Ratos	5	44,7533	422,6255	0,00008819
Resíduo	20	80,5033	571,6676	0,0001830

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 11A - Resumo da análise de variância das variáveis peso do fígado, % fígado, peso do rim direito (g) e % rim direito de ratos submetidos a dietas de caseína e de mortadelas com diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono após 28 dias de ensaio

F. V.	G.L.	Quadrado Médio			
		Peso do fígado (g)	% Fígado	Peso do rim direito (g)	% Rim direito
Ratos	5	0,7360	0,1268	0,009638	0,002151
dietas	5	3,1927 ^{n.s}	0,3322 ^{n.s}	0,01328 ^{n.s}	0,002778 ^{n.s}
Resíduo	25	1,3791	0,1686	0,008252	0,001600

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 12A - Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais das variáveis peso do fígado, % fígado, peso do rim direito (g) e % rim direito de ratos submetidos a dietas de mortadelas com diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono após 28 dias de ensaio

Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Médio			
		Peso do fígado (g)	% Fígado	Peso do rim direito (g)	% Rim direito
Regressão linear	1	5,4904*	0,5706*	0,02860 ^{n.s}	0,001438 ^{n.s}
Regressão quadrática	1	2,8786 ^{n.s}	0,3972 ^{n.s}	0,00163 ^{n.s}	0,00000285 ^{n.s}
Regressão cúbica	1	0,7707 ^{n.s}	0,2400 ^{n.s}	0,02688 ^{n.s}	0,008473 ^{n.s}
Regressão 4º grau	1	0,1227 ^{n.s}	0,006146 ^{n.s}	0,00924 ^{n.s}	0,000382 ^{n.s}
Ratos	5	1,5156	0,2052	0,01406	0,002349
Níveis de sangue	(4)	2,3156 ^{n.s}	0,3014 ^{n.s}	0,01659 ^{n.s}	0,002445 ^{n.s}
Resíduo	20	0,7883	0,1088	0,007932	0,001611

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 13A - Resumo da análise de variância das variáveis ganho de peso, consumo alimentar e teor de carboxiemoglobina (COHb) dos animais alimentados com dietas contendo mortadelas com sangue tratado com monóxido de carbono após 14 dias de ensaio

Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Médio		
		Ganho de peso	Consumo alimentar	COHb
ratos	7	49,3143	198,1792	0,1070
Dietas	4	213,1625*	202,6841 ^{n.s}	0,003109 ^{n.s}
Resíduo	28	49,8054	183,7043	0,07659

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 14A - Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais das variáveis ganho de peso, consumo alimentar e teor de carboxiemoglobina (COHb) de ratos submetidos a dietas de mortadelas com diferentes níveis de sangue tratado com monóxido de carbono após 14 dias de ensaio

Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Médio		
		Ganho de peso	Consumo alimentar	COHb
Regressão linear	1	551,2500*	20,4627 ^{n.s}	0,00018 ^{n.s}
Regressão quadrática	1	48,8929 ^{n.s}	38,8222 ^{n.s}	0,000175 ^{n.s}
Regressão cúbica	1	211,2500*	482,9971 ^{n.s}	0,000101 ^{n.s}
Regressão 4º grau	1	41,2571 ^{n.s}	268,4548 ^{n.s}	0,011979 ^{n.s}
Ratos	7	49,3143	198,1792	0,1070
Níveis de sangue	(4)	213,1625*	202,6841 ^{n.s}	0,003109 ^{n.s}
Resíduo	28	49,8054	183,7043	0,07659

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 15A - Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais para o ganho de peso, em função de diferentes níveis de ferro nas dietas experimentais

F. V.	G.L.	Quadrado Médio					
		Sulfato	0%	5%	10%	15%	20%
Regressão linear	1	20,0119 ^{n.s}	21,5030 ^{n.s}	32,8125 ^{n.s}	28,5833 ^{n.s}	6,5744 ^{n.s}	11,4405 ^{n.s}
Regressão quadrática	1	20,57143 ^{n.s}	2,58035 ^{n.s}	10,9375 ^{n.s}	7,00003 ^{n.s}	0,00893 ^{n.s}	0,147853 ^{n.s}
Rato (bloco)	7			86,0317			
Dieta	5			12,8167 ^{n.s}			
Ferro	2			1,0208 ^{n.s}			
Dieta*Ferro	10			16,0125 ^{n.s}			
Resíduo	119			59,9456			

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 16A - Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais para o consumo alimentar, em função de diferentes níveis de ferro nas dietas experimentais

F. V.	G.L.	Quadrado Médio					
		Sulfato	0%	5%	10%	15%	20%
Regressão linear	1	25,8521 ^{n.s}	42,8000 ^{n.s}	26,2585 ^{n.s}	112,5785 ^{n.s}	215,2961 ^{n.s}	704,5563*
Regressão quadrática	1	63,6014 ^{n.s}	62,1032 ^{n.s}	50,1295 ^{n.s}	41,7851 ^{n.s}	88,1110 ^{n.s}	480,4471 ^{n.s}
Rato (bloco)	7	276,2714					
Dieta	5	114,1076 ^{n.s}					
Ferro	2	66,7221 ^{n.s}					
Dieta*Ferro	10	177,9075 ^{n.s}					
Resíduo	119	146,7397					

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 17A - Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais para coeficiente de eficiência alimentar, em função de diferentes níveis de ferro nas dietas experimentais

F. V.	G.L.	Quadrado Médio					
		Sulfato	0%	5%	10%	15%	20%
Regressão linear	1	0,0000954 ^{n.s}	0,00126 ^{n.s}	0,000219 ^{n.s}	0,0000163 ^{n.s}	0,000098 ^{n.s}	0,00082 ^{n.s}
Regressão quadrática	1	0,0000377 ^{n.s}	0,000118 ^{n.s}	0,0000150 ^{n.s}	0,000514 ^{n.s}	0,000220 ^{n.s}	0,00128 ^{n.s}
Rato (bloco)	7	0,002488					
Dieta	5	0,0004638 ^{n.s}					
Ferro	2	0,0002343 ^{n.s}					
Dieta*Ferro	10	0,0004224 ^{n.s}					
Resíduo	119	0,0009303					

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 18A - Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais para o ganho de hemoglobina, em função de diferentes níveis de ferro nas dietas experimentais

F. V.	G.L.	Quadrado Médio					
		Sulfato	0%	5%	10%	15%	20%
Regressão linear	1	42,4296*	15,5316*	18,6686*	23,0476*	22,7136*	23,3419*
Regressão quadrática	1	0,01244 ^{n.s}	0,3388 ^{n.s}	0,1666 ^{n.s}	0,08251 ^{n.s}	0,1008 ^{n.s}	0,1157 ^{n.s}
Rato (bloco)	7	4,2056					
Dieta	5	18,8188*					
Ferro	2	141,8534*					
Dieta*Ferro	10	4,6964 ^{n.s}					
Resíduo	119	0,6048					

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 19A - Resumo da análise de variância para o valor de hematócrito, em função de diferentes níveis de ferro nas dietas experimentais

Fonte de Variação	G.L	Quadrado Médio
Dieta	5	33,8085*
Ferro	2	468,9717*
Dieta*ferro	10	10,1270 ^{n.s}
Resíduo	85	6,9903

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 20A - Resumo da análise de variância para a eficiência na recuperação de hemoglobina (HRE%) e HRE (% do controle) dos ratos anêmicos para os níveis de ferro determinados nas dietas experimentais

Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Médio	
		HRE	HRE (% do controle)
Rato	7	175,2656	930,1202
Dieta	5	405,1236*	871,2260*
Ferro	2	2442,2209*	889,5979 ^{n.s}
Dieta*ferro	10	83,3232 ^{n.s}	222,0273 ^{n.s}
Resíduo	119	145,9224	360,2786

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 21A - Resumo da análise de regressão através de polinômios ortogonais para o ganho de hemoglobina, em função de diferentes níveis de ferro nas dietas experimentais

Fonte de Variação	G.L.	Ganho de Hemoglobina		
		Quadrado Médio		
		Sulfato	Com nitrito	Sem nitrito
Regressão linear	1	18,2570*	15,9158*	5,1144*
Regressão quadrática	1	0,5513 ^{n.s}	21,6181*	0,03885 ^{n.s}
Rato (bloco)	7		3,1371	
Dieta	2		6,5101*	
Ferro	2		20,7522*	
Dieta*Ferro	4		4,9977*	
Resíduo	56		1,1938	

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 22A - Resumo da análise de variância para o valor de hematócrito, em função de diferentes níveis de ferro nas dietas experimentais

Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Médio
Dieta	2	50,4720 ^{n.s}
Ferro	2	128,4550*
Dieta*ferro	4	18,0076 ^{n.s}
Resíduo	41	18,5009

* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 23A - Valores médios (e desvios-padrão) dos níveis sanguíneos de carboxiemoglobina (COHb) dos animais alimentados com dietas à base de mortadelas formuladas com sangue tratado com monóxido de carbono

Tratamento	Carboxiemoglobina (%)
0% de sangue	1,665±0,22
5% de sangue	1,694±0,26
10% de sangue	1,645±0,28
15% de sangue	1,686±0,38
20% de sangue	1,661±0,26

Tabela 24A - Resumo da análise de variância para os coeficientes de inclinação das curvas de regressão (ganho de Hb/mg de ferro), em função de diferentes níveis de ferro nas dietas experimentais

Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Médio
Rato	7	0,002043
Dieta	7	0,004675 ^{n.s}
Resíduo	35	0,003504

^{n.s} Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.